

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET**

**MAJA R. LAZAREVIĆ**

**CITOGENETIČKA, PALINOLOŠKA I  
FILOGEOGRAFSKA ISTRAŽIVANJA RODA  
*RAMONDA* (GESNERIACEAE) NA BALKANSKOM  
POLUOSTRVU**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**BEOGRAD, 2012.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY**

**MAJA R. LAZAREVIĆ**

**CYTOGENETICS, PALYNOLOGY AND  
PHYLOGEOGRAPHY OF GENUS *RAMONDA*  
(GESNERIACEAE) IN THE BALKAN PENINSULA**

PhD THESIS

BELGRADE, 2012.



**Podaci o mentoru i članovima komisije:**

**Mentor:**

**dr Vladimir Stevanović**

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, dopisni član SANU

**Komentor:**

**dr Sonja Siljak-Yakovlev**

direktor-istraživanja, Univerzitet Paris-Sud, CNRS, Orsay, Francuska

**Članovi komisije:**

**dr Branka Stevanović**

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**dr Marjan Niketić**

viši naučni saradnik, kustos, Prirodnjački muzej u Beogradu

**Datum odbrane:**



*Za moje zlato,  
moju dušu,  
moju sreću i  
moju ljubav najveću*

## ZAHVALNICA

---

Istraživanja citogenetike, palinologije i filogeografije tri vrste roda *Ramonda* obavljena su u nekoliko laboratorija i institucija i u okviru nekoliko naučnih projekata:

- Univerzitet Paris-Sud, Odeljenje Ecologie, Systématique et Evolution (ESE), Orsay, Francuska,
- Laboratorija Service de Cytométrie en Flux, Dynamique de la Compartimentation Cellulaire, Institut des Sciences du Végétal (ISV), Gif-sur-Yvette, Francuska,
- Univerzitetski centar za elektronsku mikroskopiju, Univerzitet u Novom Sadu,
- Laboratorija za elektronsku mikroskopiju, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu,
- Katedra za ekologiju i geografiju biljaka, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu,
- Projekat br. 143015 „Diverzitet flore i vegetacije centralnog Balkana – ekologija, horologija i konzervacija“, Ministarstvo nauke Republike Srbije,
- Projekat br. 173030 „Biodiverzitet biljnog sveta Srbije i Balkanskog poluostrva – procena, održivo korišćenje i zaštita“, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja,
- „Studija biljaka sa sposobnošću oživljavanja sa Balkanskog poluostrva: ekofiziološki, citološki i filogeografski pristup“, Program integrisanih aktivnosti „Pavle Savić“,
- „Globalni biodiverzitet i promene životne sredine u mediteranskom basenu“, NATO Science for Peace and Security Programme,
- „Uticaj stresa životne sredine na genom, epigenom i glikomiju nekoliko vrsta biljaka“, AUF.

Moj boravak u laboratorijama u Francuskoj bio je moguć i zahvaljujući stipendijama koje sam u dva navrata dobila od Ambasade Francuske u Beogradu, na čemu zahvaljujem ljubaznom osoblju iz Francuskog Instituta u Beogradu, gospodinu Frédéric Remy-u, Vesni Adamović i Biljani Komatović.

Moj rad na izradi ove doktorske disertacije trajao je punih 6 godina. Za to vreme upoznala sam se i saradivala sa velikim brojem ljudi i svi oni su svojim znanjem i predusretljivošću doprineli kvalitetu ovih istraživanja, ali i formiranju mene kao istraživača.

Zahvaljujem se prof. dr Vladimiru Stevanoviću, svom mentoru, na poverenju koje mi je ukazao uključivši me u ovo interesantno istraživanje, na znanju koje mi je preneo i strpljenju koje je u radu sa mnom imao. Sve ovo vreme, on mi je nesebično pomagao i u terenskim istraživanjima i u tumačenju rezultata koje smo dobili, uvek bio tu za mojih hiljadu pitanja, nikada me ne ostavivši bez odgovora.

Rad na ovoj doktorskoj tezi značio je i blisku saradnju sa mojim drugim mentorom dr Sonjom Šiljak – Yakovlev. Imala sam tu čast i privilegiju da u ovih 6 godina više puta boravim, radim i učim u njenoj laboratoriji. Koliko god mi svaki put to bilo teško, jer sam napuštala svoje najbliže, bilo mi je i neizmerno zadovoljstvo, jer sam znala da me tamo čeka Sonja, da me nesebično upućuje u tajne hromozoma. Hvala Vam na neizmernoj toploti, strpljenju, razumevanju, znanju i iskustvu koje ste sa mnom podelili!

*Neizmernu zahvalnost dugujem prof. dr Branki Stevanović što mi je ukazala tu čast da me uvede u neobični, misteriozni svet ramondi. Moram naglasiti da je za mene ona mentor u istoj meri u kojoj i moja prethodna dva draga profesora. Posvetila mi je ogromno strpljenje, poverenje, provela puno vremena sa mnom diskutujući rezultate, išla na terene, „gurala“ i pružala podršku u svakom trenutku.*

*Imala sam to zadovoljstvo i privilegiju da moju tezu vode tri vrhunska naučnika i profesora, ali, pre svega tri izuzetna čoveka u kojima sam stekla i svoje velike prijatelje. Hvala Vam na tome!*

*Postoji još jedna osoba čiji je doprinos ovoj tezi neprocenljiv. To je dr Thierry Robert, koji je imao puno strpljenja, poverenja i entuzijazma da me uvede u tehnike molekurne biologije i genetike. Pružio mi je veliku podršku u laboratorijskom radu, a potom i u temeljnim analizama dobijenih podataka. A hvala mu i što me je „naterao“ da progovorim francuski jezik.*

*Veliko hvala dugujem i dr Spenceru Brown-u što mi je omogućio da u njegovoj laboratoriji uradim opsežna merenja veličine genoma tečnom citometrijom, ali i prva istraživanja ramondi na najnovijim konfokalnim i multi-foton mikroskopima.*

*Hvala kolegama u Francuskoj na predusretljivosti, razumevanju i pomoći koju su mi ukazali: Odile Robin, Françoise Lamy, Ghayas Lakis, Olivier Catrice, Michael Bourg, Samah Rekyma, Christian Raquin, Agathe Sanino i Cécile Nivet.*

*Prof. dr Vladi Matevskom hvala na nesebičnoj pomoći u terenskom radu u Makedoniji.*

*Veliku zahvalnost dugujem i dragim kolegama sa ovih prostora koji su mi pomogli da sakupim materijal iz što većeg dela areala. U tom smislu pre svega hvala dr Marjanu Niketiću, dr Gordani Tomović i dr Bojanu Zlatkoviću, koji su mi u više navrata donosili biljke iz raznih populacija, ali i išli sa mnom u terenska istraživanja. Veliku zahvalnost za sakupljeni materijal dugujem i dragim kolegama: dr Dmitru Lakušiću, dr Snežani Vukojčić, dr Tamari Rakić, dr Kseniji Jakovljević, mr Šemiji Duraki i Neveni Kuzmanović, ali i prijateljima Danku Joviću i Rastku Ajtiću za pomoć u realizaciji nekih od mojih terenskih istraživanja.*

*Puno se zahvaljujem dr Jasmini Šinžar Sekulić za izradu geografskih karti koje prate ovu doktorsku disertaciju, kao i za nesebične „statističke“ savete.*

*Hvala na podršci, razumevanju i prijateljstvu svim kolegama sa Katedre za ekologiju i geografiju biljaka.*

*Konačno, posebnu, bezgraničnu zahvalnost dugujem mojim dragim roditeljima i mom bratu, koji su sve ovo izdržali zajedno sa mnom, pomagali mi, podržavali me i bez čije ogromne pomoći ovog rada ne bi ni bilo.*

*I na kraju, neizmerno, najiskrenije hvala mom Peđi i mojoj Lenki za nesebičnu ljubav, podršku i strpljenje koje mi pružaju sve ovo vreme.*

*Hvala!*





**Citogenetička, palinološka i filogeografska istraživanja roda *Ramonda*  
(*Gesneriaceae*) na Balkanskom poluostrvu**

**REZIME**

Familija *Gesneriaceae* obuhvata biljne vrste pretežno rasprostranjene u tropskim i subtropskim oblastima Starog i Novog sveta. Samo mali broj vrsta naseljava umerene oblasti, a među njima je i jedinih 5 vrsta ove familije u Evropi: *Ramonda myconi*, endemit Pirinejskog poluostrva, kao i *R. nathaliae*, *R. serbica*, *Haberlea rhodopensis* i *Jankaea heldreichii*, četiri endemične vrste Balkanskog poluostrva. Svih pet vrsta su relikti Tercijera, vremena kada je klima u Evropi bila toplija i vlažnija. Za vreme Ledenog doba, one su našle skrovište u klisurama i kanjonima gde ih najčešće nalazimo i danas. Ovi „živi fosili“ danas nepovoljne uticaje spoljašnje sredine u velikoj meri preživljavaju zahvaljujući poikilohidričnosti, pa se još nazivaju i „biljke koje vaskrsavaju“.

Danas se dve balkanske vrste roda *Ramonda* odlikuju disjunktним arealima. *Ramonda nathaliae* zastupljena je u Makedoniji, S Grčkoj, na obroncima planine Šare na Kosovu i u JI Srbiji. Najveći deo areala vrste *R. serbica* nalazi se u Albaniji, a prisutna je i na SZ Grčke, u Z Makedoniji, JZ i SI Crnoj Gori, JZ, JI i SI Srbiji, kao i na SZ Bugarske. Jedina zona u kojoj se areali dve vrste susreću nalazi se u JI Srbiji, gde na dva lokaliteta, Oblik i Radovanski Kamen, obrazuju simpatrijske populacije. Obe vrste prevashodno naseljavaju krečnjačku podlogu, s tim što se *R. nathaliae* može naći i na serpentinitu, škriljcima i granitu. Ova vrsta, takođe, bolje podnosi otvorenija staništa, a njene populacije se mogu naći i na većem rasponu nadmorskih visina, zbog čega se smatra otpornijom i tolerantijom.

Ciljevi ovog rada su višestruki: da se utvrde morfološke osobine polena i semena sve tri vrste roda *Ramonda*, jer detalji njihove građe do sada nisu istraživani; da se procene vijabilnost njihovog polena i klijavost semena; da se utvrdi broj hromozoma, kao i veličina genoma kod tri vrste; da se proveriti da li postoje hibridne jedinice u simpatrijskim populacijama; da se pomoću molekularnih markera utvrdi stepen sličnosti i filogeografske veze između vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica*. U tu svrhu, polen i seme analizirani su pomoću svetlosnog i scanning elektronskog mikroskopa, broj

hromozoma određen je standardnim kariološkim tehnikama, veličina genoma procenjena je pomoću protočne citometrije, a genetički diverzitet primenom molekularne AFLP tehnike.

*Ramonda myconi* i *R. nathaliae* su diploidi sa  $2n = 48$ , dok je *R. serbica* heksaploid sa  $2n = 144$  hromozoma. U jednoj populaciji ustanovljeno je i postojanje nekoliko individua sa većim brojem hromozoma ( $2n = 8x = 192$  i  $2n = 10x = \sim 230$ ). Prosečna veličina genoma kod *R. myconi* je  $2C = 2,55$  pg, *R. nathaliae*  $2C = 2,34$  pg i *R. serbica*  $2C = 7,85$  pg, s tim što retki dekaploidi ove vrste imaju  $2C = 11,65$  pg. Monoploidne veličine genoma *R. myconi* ( $1Cx = 1,27$  pg) i *R. serbica* ( $1Cx = 1,31$  pg) su slične, dok *R. nathaliae* ima manju vrednost ovog parametra ( $1Cx = 1,17$  pg).

Polenova zrna sve tri vrste su mala, 3–kolporatna, uglavnom sferoidnog oblika. Kod diploidnih vrsta su slične veličine (*R. myconi*  $E = 12,57$   $\mu\text{m}$ ; *R. nathaliae*  $E = 15,19$   $\mu\text{m}$ ), dok su kod heksaploidne *R. serbica* veća ( $E = 19,80$   $\mu\text{m}$ ) u skladu sa većom veličinom genoma. Egzina je mikoretikularno-perforatna, kod *R. nathaliae* više perforatna, kod *R. serbica* sa krupnim lumenima unutar kojih je veliki broj perforacija, dok je kod *R. myconi* intermedijarna između dve balkanske rodake.

Semena su sitna, izduženog oblika, kod *R. myconi* u proseku duga  $814,47$   $\mu\text{m}$  i široka  $217,77$   $\mu\text{m}$ , kod *R. nathaliae* duga  $639,23$   $\mu\text{m}$ , a široka  $228,09$   $\mu\text{m}$  i kod *R. serbica* prosečne dužine  $714,36$   $\mu\text{m}$  i širine  $254,84$   $\mu\text{m}$ . Na površini semena uočljive su trouglaste strukture najupadljivije kod *R. myconi* (visine  $46 - 87$   $\mu\text{m}$ ), nešto manje kod *R. serbica* ( $32 - 44$   $\mu\text{m}$ ), a najmanje kod *R. nathaliae* ( $21 - 30$   $\mu\text{m}$ ), čija je moguća uloga bolje pričvršćivanje za podlogu. Masa semena je umereno korelisana sa veličinom genoma i brojem hromozoma. Veličine polena i semena ne predstavljaju dobre karaktere za razlikovanje tri vrste roda *Ramonda*. Razlike koje se mogu koristiti u tu svrhu su karakteristike površine egzine polena, kao i površinske strukture semenjače.

Zahvaljujući opsežnim istraživanjima u simpatrijskim populacijama, otkriveni su prirodni hibridi nastali ukraštanjem *R. nathaliae* i *R. serbica*. Hibridne individue su najčešće tetraploidi sa  $2n = 96$  hromozoma i prosečnom veličinom genoma od  $2C = 5,14$  pg. Pronađen je i mali broj individua čija veličina genoma odgovara penta ( $2C = 6,19$  pg) i oktoploidima ( $2C = 10,04$  pg). Polen hibridnih individua je veoma heterogen po broju kolpi (3-, 9- i 12-kolporatna zrna) i veličini polenovih zrna, a semena su

izuzetno sitna, 2–3 puta manja od semena roditeljskih vrsta i veoma male klijavosti (1%). Ovi rezultati pokazuju da se u simpatrijskim populacijama dešavaju složeni procesi ukrštanja dve reliktnne vrste, introgesije i dupliciranja genoma.

U ekološkom pogledu, veoma interesantna je populacija *R. nathaliae* sa serpentinita čije se individue odlikuju manjim prečnikom rozete, najmanjim polenovim zrnima, tanke egzine i slabe vijabilnosti, najmanjim semenima, pa čak i najmanjom veličinom genoma među ispitivanim populacijama ove vrste.

AFLP analiza genetičke strukture populacija dve vrste potvrdila je jasnu taksonomsku razdvojenost *R. nathaliae* i *R. serbica*. Kao endemične vrste kod kojih nema samooprašivanja, ali je prisutno vegetativno razmnožavanje, one se odlikuju malim genetičkim diverzitetom, tako da su vrednosti očekivane heterozigotnosti (H) kod *R. nathaliae* od 0,062 do 0,128, a kod *R. serbica* od 0,087 do 0,140. Varijabilnost unutar populacija (*R. nathaliae* 72%, *R. serbica* 86%) veća je od varijabilnosti između populacija (*R. nathaliae* 28%, *R. serbica* 14%). Genetičke distance i indeksi fiksacije su veći između populacija *R. nathaliae*, na osnovu čega se može zaključiti da je ona starija vrsta čije su populacije duže vreme međusobno izolovane.

Današnji genetički diverzitet populacija ovih reliktnih i endemičnih vrsta sa Balkanskog poluostrva oslikava kako uticaj ledenog doba tako i recentnih uslova na njihovim staništima. Obe vrste su svakako imale više refugijalnih staništa u kojima su preživle nepovoljne klimatske prilike tokom glacijacije. Iz njih su, nakon otopljanja ponovo počele da šire svoj areal, a novoobrazovane populacije odlikuju se manjim genetičkim diverzitetom usled efekta osnivača i uskog grla. Kako su takve populacije podložnije nepovoljnim uticajima spoljašnje sredine, neophodno je sprovesti njihovu adekvatnu zaštitu.

**Ključne reči:** *Ramonda*, *Gesneriaceae*, endemiti, relikti, Balkan, poliploidija, hibridi, citometrija, AFLP.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Ekologija i geografija biljaka

**UDK broj:**

582.916.61:[581.9+581.5]:[576.316+575.222.7]:[581.46+581.48]:575.17(497)(043.3)

## **Cytogenetics, palynology and phylogeography of genus *Ramonda* (Gesneriaceae) in the Balkan Peninsula**

### **ABSTRACT**

Family Gesneriaceae comprises plant species mostly distributed in the tropics and subtropics of both the Old and New Worlds. Only a small number of species inhabits temperate regions. Among them, there are the only 5 species of this family in Europe: *Ramonda myconi*, endemic of the Iberian Peninsula, as well as *R. nathaliae*, *R. serbica*, *Haberlea rhodopensis* i *Jankaia heldreichii*, four endemic species of the Balkan Peninsula. All five species are Tertiary relicts, remnants from the times when the climate was much warmer and more humid. During the Ice Age, they have found shelter in canyons and gorges where can be often found today as well. These „living fossils“ are poikilohydric, „resurrection plants“ what helps them survive the inhospitable environmental conditions.

Balkan species of the genus *Ramonda* are today characterized by disjunct distribution. *Ramonda nathaliae* is restricted to Macedonia, N Greece, slopes of Mt. Šara in Kosovo and few localities in SE Serbia. The largest part of the *R. serbica* range is situated in Albania, but is also present in NW Greece, W Macedonia, SW and NE Montenegro, SW, SE and NE Serbia and NE Bulgaria. The ranges of two species co-occur only in two localities in SE Serbia, Oblik and Radovanski Kamen, establishing sympatric populations. Both species prefer limestone rocks, but *R. nathaliae* can also be found on serpentine, schist and granite. This species is often found in more open habitats and in higher altitudes why it is considered as more resistant and tolerant than *R. serbica*.

The aims of this study are: to investigate morphology of both pollen and seeds of three *Ramonda* species; to estimate pollen viability and germination capacity of their seeds; to determine chromosome numbers and genome size of three species; to explore if there are hybrids in sympatric populations; to look into genetic diversity and phylogeography of *R. nathaliae* and *R. serbica*. Pollen grains and seeds were examined by light and scanning electron microscopy, chromosome number by standard

karyological techniques, genome size was estimated by flow cytometry and genetic diversity by molecular AFLP method.

*Ramonda myconi* and *R. nathaliae* are diploids with  $2n = 48$ , while *R. serbica* is a hexaploid with  $2n = 144$  chromosomes. Few individuals with larger chromosome numbers were detected in one population ( $2n = 8x = 192$  and  $2n = 10x = \sim 230$ ). Average genome size in *R. myconi* is  $2C = 2.55$  pg, *R. nathaliae*  $2C = 2.34$  pg and *R. serbica*  $2C = 7.85$  pg, while rare decaploids of this last species have  $2C = 11.65$  pg. Monoploid genome sizes of *R. myconi* ( $1Cx = 1.27$  pg) and *R. serbica* ( $1Cx = 1.31$  pg) are similar, while this parameter has a lower value in *R. nathaliae* ( $1Cx = 1.17$  pg).

Pollen grains of three *Ramonda* species are small, 3-colporate, mostly spheroidal in shape. They are of similar size in diploid species (*R. myconi*  $E = 12.57$   $\mu\text{m}$ ; *R. nathaliae*  $E = 15.19$   $\mu\text{m}$ ), while *R. serbica*, as a hexaploid with larger genome size, has larger pollen grains as well ( $E = 19.80$   $\mu\text{m}$ ). Exine ornamentation is microreticulate-perforate, in *R. nathaliae* more perforate, in *R. serbica* with larger lumens with more perforations, while *R. myconi* exine ornamentation characteristics are intermediary between two Balkan relatives.

Seeds are small, elongated,  $814.47$   $\mu\text{m}$  long and  $217.77$   $\mu\text{m}$  wide in *R. myconi*,  $639.23$   $\mu\text{m}$  long and  $228.09$   $\mu\text{m}$  wide in *R. nathaliae* and with  $714.36$   $\mu\text{m}$  average length and  $254.84$   $\mu\text{m}$  width in *R. serbica*. There are auriculate structures on the seed surface, most pronounced in *R. myconi* ( $46 - 87$   $\mu\text{m}$  high), little bit smaller in *R. serbica* ( $32 - 44$   $\mu\text{m}$ ) and least high in *R. nathaliae* ( $21 - 30$   $\mu\text{m}$ ). Their possible role is better surface adhesion. Seed mass is moderately correlated to genome size and chromosome number. While size of pollen grains and seeds are not good characters for differentiation of three *Ramonda* species, differences in fine pollen exine and seed surface ornamentations can be used for this purpose.

Natural hybrids between *R. nathaliae* and *R. serbica* are found in the scope of extensive research performed in sympatric populations. Hybrid individuals are tetraploid with  $2n = 96$  chromosomes and average genome size of  $2C = 5.14$  pg. Small number of individuals could be penta ( $2C = 6.19$  pg) or octoploids ( $2C = 10.04$  pg) on the basis of their  $2C$ -values. Pollen from hybrids is very heterogeneous in number of colpi (3-, 9- and 12-colporate) and the size of the grains. Seeds are very small, 2-3 times smaller than those from parental species and germinate weakly (c. 1%). These

results reveal complex processes of hybridisation between two relict species, introgression and genome duplications.

Population of *R. nathaliae* from serpentine substrate is ecologically very interesting. Plants have smaller rosettes, smallest pollen grains with thin exine and lower viability, smallest seeds and even smallest genome size among investigated populations of this species.

AFLP analysis of genetic population structure confirmed clear taxonomic differentiation of *R. nathaliae* and *R. serbica*. As endemics without self-fertilisation, but with vegetative reproduction present, they are characterized by small genetic diversity. Expected heterozygosity (H) ranges from 0.062 to 0.128 in *R. nathaliae* populations and from 0.087 to 0.140 in *R. serbica*. Variability within populations (*R. nathaliae* 72%, *R. serbica* 86%) is higher than among populations (*R. nathaliae* 28%, *R. serbica* 14%). Genetic distances and fixation indices are higher among *R. nathaliae* populations suggesting that this is an older species whose populations are separated for a longer period of time.

Today's genetic population diversity of these relic and endemic species from the Balkan Peninsula reflects the influences of the Ice Age, but of more recent conditions in their habitats as well. Both species had several refugia where they survived harsh conditions during glaciations. They began spreading from there after climate warming, so newly established populations have lower genetic diversity because of the founder and bottleneck effects. They can be more sensitive to environmental stress and therefore must be adequately protected.

**Key words:** *Ramonda*, *Gesneriaceae*, endemics, relicts, Balkan, polyploidy, hybrids, cytometry, AFLP.

**Scientific field:** Biology

**Field of scientific specialization:** Ecology and geography of plants

**UDC number:**

582.916.61:[581.9+581.5]:[576.316+575.222.7]:[581.46+581.48]:575.17(497)(043.3)





## SADRŽAJ

---

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1. 1. FAMILIJA Gesneriaceae Dumort. 1822. – KARAKTERISTIKE, TAKSONOMSKI POLOŽAJ I POREKLO.....	1
1. 1. 1. Opšte karakteristike i rasprostranjenje.....	1
1. 1. 2. Taksonomski položaj i podela familije Gesneriaceae.....	4
1. 1. 3. Poreklo familije Gesneriaceae .....	5
1. 2. EVROPSKI PREDSTAVNICI FAMILIJE Gesneriaceae .....	7
1. 2. 1. Otkrića evropskih predstavnika familije Gesneriaceae.....	9
1. 2. 2. Osnovne karakteristike evropskih predstavnika familije Gesneriaceae.....	11
1. 3. KARAKTERISTIKE VRSTA RODA <i>RAMONDA</i> NA BALKANSKOM POLUOSTRVU .....	14
1. 4. RASPROSTRANJENJE VRSTA RODA <i>Ramonda</i> NA BALKANSKOM POLUOSTRVU.....	17
1. 4. 1. Simpatrijske populacije.....	23
1. 5. HIPOTEZE O POREKLU, ODNOSIMA I RASPROSTRANJENJU <i>R. nathaliae</i> I <i>R. serbica</i> .....	25
1. 6. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA VRSTA <i>R. nathaliae</i> I <i>R. serbica</i> .....	26
1. 6. 1. Fitocenološka istraživanja roda <i>Ramonda</i> na Balkanskom poluostrvu.....	26
1. 6. 2. Anatomska i ekofiziološka istraživanja roda <i>Ramonda</i> .....	28
1. 6. 3. Citološka istraživanja roda <i>Ramonda</i> .....	30
1. 7. FAKTORI UGROŽAVANJA I MERE ZAŠTITE .....	30
<b>2. CILJEVI.....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>34</b>
3. 1. BILJNI MATERIJAL .....	34
3. 2. KARTE RASPROSTRANJENJA .....	37
3. 3. BROJ HROMOZOMA.....	37
3. 4. MERENJE VELIČINE GENOMA I ODREĐIVANJE NUKLEOTIDNOG SASTAVA DNK POMOĆU TEČNE CITOMETRIJE.....	38
3. 5. MORFOLOGIJA I VIJABILNOST POLENA.....	39
3. 6. MORFOLOGIJA, KLIJAVOST I MASA SEMENA .....	41

3. 7. AFLP.....	41
3. 7. 1. Sakupljanje materijala i ekstrakcija DNK.....	42
3. 7. 2. AFLP fingerprinting .....	43
3. 8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	46
3. 8. 1. Statistička obrada podataka molekularnih analiza .....	47
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>49</b>
4. 1. BROJ HROMOZOMA I VELIČINA GENOMA .....	49
4. 1. 1. Broj hromozoma kod roda <i>Ramonda</i> .....	49
4. 1. 2. Veličina genoma kod roda <i>Ramonda</i> .....	54
4. 1. 3. Korelacije između veličine genoma i geografskog položaja populacija.....	65
4. 2. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE POLENA .....	68
4. 2. 1. Vijabilnost polena .....	80
4. 2. 2. Korelacija karakteristika polena sa veličinom genoma i geografskim položajem .....	80
4. 3. KARAKTERISTIKE MORFOLOGIJE SEMENA .....	84
4. 3. 1. Kljavost semena .....	88
4. 3. 2. Korelacija karakteristika semena sa veličinom genoma i geografskim položajem .....	90
4. 4. REZULTATI AFLP ANALIZE .....	94
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>110</b>
5. 1. KARIOLOŠKE I CITOGENETIČE KARAKTERISTIKE ISPITIVANIH VRSTA .....	110
5. 2. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE POLENA .....	115
5. 2. 1. Polen roditeljskih vrsta i hibridnih individua u simpatrijskim populacijama .....	117
5. 2. 2. Korelacija karakteristika polena sa veličinom genoma i geografskim položajem .....	118
5. 3. KARAKTERISTIKE MORFOLOGIJE SEMENA .....	119
5. 3. 1. Kljavost semena .....	120
5. 3. 2. Korelacija karakteristika semena sa veličinom genoma i geografskim položajem .....	121

5. 4. GENETIČKI DIVERZITET POPULACIJA VRSTA <i>R. nathaliae</i> I <i>R. serbica</i> – EKOLOŠKI I ISTORIJSKI ASPEKT .....	123
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>129</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>133</b>
Biografija autora .....	151
Izjava o autorstvu .....	153
Izjava o istovetnosti stampane i elektronske verzije.....	154
Izjava o korišćenju .....	155



## 1. UVOD

### 1. 1. FAMILIJA *Gesneriaceae* Dumort. 1822. – KARAKTERISTIKE, TAKSONOMSKI POLOŽAJ I POREKLO

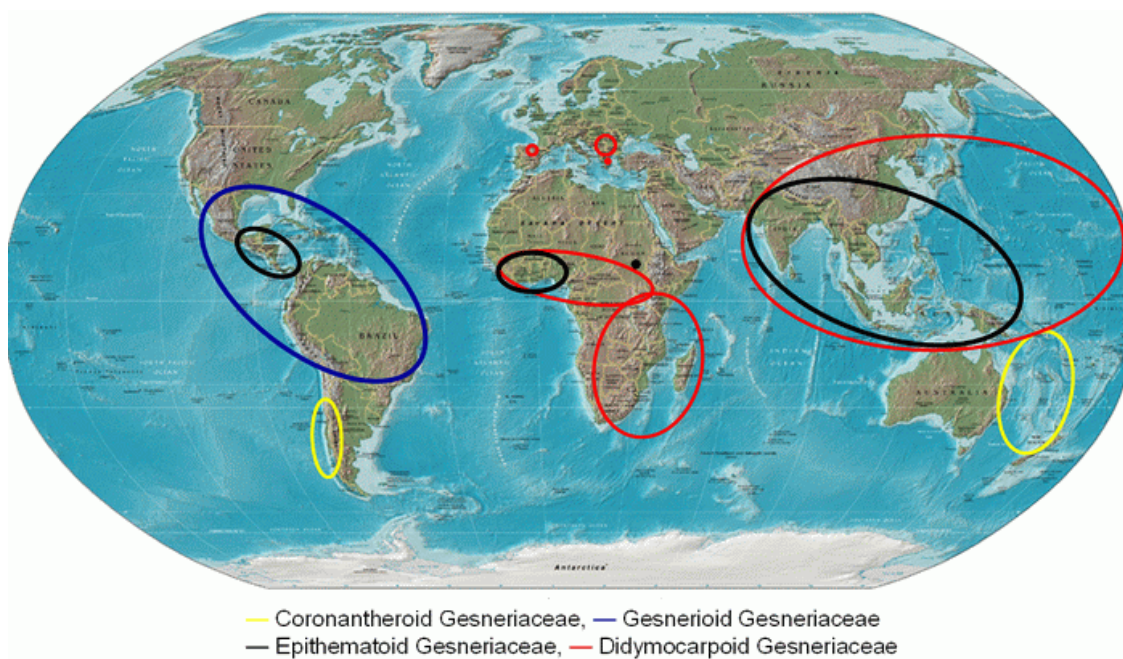
#### 1. 1. 1. Opšte karakteristike i rasprostranjenje

Familija *Gesneriaceae* (red Lamiales) obuhvata između 150 i 160 rodova i oko 3240 vrsta uglavnom višegodišnjih biljaka, ali ima i žbunova, niskog drveća, nekoliko jednogodišnjih biljaka, epifita i puzavica (WEBER, 2004; SKOG & BOGGAN, 2007).

Predstavnici ove familije rasprostranjeni su, pre svega, u tropskim i subtropskim oblastima, ali ima i vrsta koja prodiru severnije i južnije, u oblasti umerenog pojasa Južne Amerike, Evrope i severne Kine. Na slici 1 prikazano je rasprostranjenje familije *Gesneriaceae* po taksonomskim grupama.

Listovi su obično jednostavni, od lineranog preko kopljastog, eliptičnog do ovalnog oblika, sa celom ili u različitoj meri nazubljenom ivicom. Listovi su naspramno raspoređeni ili izbijaju iz osnove skraćenog stabla obrazujući rozetu.

Cvetovi su simetrični. Čašica, najčešće zelene boje, obično se sastoji od 5 čašičnih listića koji su ili slobodni ili su srasli u različitoj meri. Krunica je sa dugom ili kratkom cevju i obično sadrži 5, ređe 4 kruničnih listića. Boja kruničnih listića je veoma varijabilna, od bele preko žute, crvene, ljubičaste, zelenkaste, braon do gotovo crne. Prašnika ima 2 ili 4, dok je prisustvo 5 prašnika uvek povezano sa aktinomorfim cvetovima. Plodnik je nadcvetan ili podcvetan, sa dve jednooke karpele i sa ložama po obodu, često štrčećim. Oprašivanje je zoofilno, pomoću insekata, ptica i slepih miševa. Samooprašivanje je utvrđeno kod malog broja vrsta.



**Slika 1.** Rasprostranjenje familije *Gesneriaceae* po grupama (preuzeto iz WEBER, 2012).

Plodovi se mogu podeliti na čaure i bobice ili, pak, na one koji se otvaraju i zatvorene. Suve čaure su prisutne u svim grupama familije, tako da se smatraju primitivnim tipom. Obično se otvaraju duž uzdužnih proreza. Dalje raznošenje semena iz ovakvih plodova vrši se na različite načine: pomoću vetra, vode, životinja ili jednostavno padaju na okolnu podlogu (JOVANOVIĆ-DUNJIĆ, 1974; WEBER, 2004). Kod mnogih neotropskih predstavnika familije prisutne su mesnate čaure koje se rasejavaju pticama, slepim miševima, pa čak i majmunima. Plodovi koji se ne otvaraju, kao što su, na primer, bobice, uglavnom su prisutni kod neotropskih rodova. Među paleotropskim predstavnicima familije ima ih samo kod 3 roda (*Cyrtandra*, *Sepikea*, *Rhynchotechum*). Način njihovog rasejavanja nije u potpunosti razjašnjen, ali svakako da ptice u tome imaju značajnu ulogu.

U svakom plodu se nalazi veliki broj sitnih semena, čija je dužina manja od 1 mm, a širina manja od 0.5 mm. Semena su obično izduženog, elipsoidnog oblika. Nešto su veća kod neotropskih predstavnika familije. Ornamentacije na površini semena prisutne su samo kod grupe didimokarpoidnih *Gesneriaceae*.

Osnovni hromozomski broj još uvek nije određen za familiju kao celinu. Kod većine vrsta se kreće između  $x = 8$  i  $x = 17$ . Najniži je  $x = 4$  kod vrste *Chirita pumila*, a najveći  $x = 64$  kod *Streptocarpus hilderbrandii*. Poliploidija je kod paleotropskih predstavnika familije bitno doprinela specijaciji.

Predstavnici familije *Gesneriaceae* mogu se naći na veoma različitim tipovima staništa, na nadmorskim visinama od nivoa mora do skoro 5000 m nadmorske visine (*Corallodiscus kingianus*). Jedan od faktora koji je, po svemu sudeći, važan za opstanak svih ovih vrsta je visoka vlažnost prisutna tokom cele ili bar u određenom periodu godine. Tako se najčešće mogu naći u šumama, na vlažnim senovitim mestima, na stenama u blizini izvora, reka ili vodopada, u blizini pećina, u klisurama.

Vrstama koje žive u stalno vlažnim uslovima nisu potrebne neke posebne morfološke ili fiziološke adaptacije kako bi preživele. Međutim, problem se javlja kod onih koje žive u periodično vlažnim uslovima. Kako bi preživele nepovoljan sušni period one su morale da razviju posebne adaptacije. Tako su neke jednogodišnje, pa cvetaju i plodonose pre nepovoljnih uslova. Druge imaju rizome za skladištenje rezervnih materija, a trećima opada lišće.

Najinteresantnije rešenje, međutim, predstavlja fiziološka adaptacija koja se razvila kod nekih vrsta familije *Gesneriaceae*. Naime, kada nastupe nepovoljni sušni uslovi, dolazi do usporavanja fiziološke aktivnosti i sušenja listova, tako da biljka izgleda kao mrtva. Nakon što se povoljni vlažni uslovi ponovo uspostave, biljka se postepeno oporavlja, uspostavlja normalnu fiziološku aktivnost i ozelenjava. Ovakve biljke nazivamo „biljke koje vaskrsavaju“, a neke od vrsta iz familije *Gesneriaceae* koje imaju ovu sposobnost su: *Boea hygrometrica*, *B. hygroskopica*, *Streptocarpus revivescens*, *Haberlea rhodopensis*, *Ramonda myconi*, *R. nathaliae* i *R. serbica*.

Osnovni ekonomski značaj familije potiče od hortikulturnog uzgajanja pojedinih vrsta iz rodova *Saintpaulia*, *Streptocarpus*, *Aeschynanthus*, *Sinningia*, *Achimenes*, *Episcia*, *Columnea*, *Nematanthus* i dr.

Nijedna od vrsta nije u širokoj upotrebi kao lekovita biljka. Međutim, neke vrste koriste domoroci u tropskim delovima Amerike i Azije u različite svrhe, na primer za lečenje steriliteta, dijareje, prehlade i kašlja i u druge svrhe. Vrsta *Didymocarpus*

*aromaticus* se u severnoj Indiji i Nepal u koristi kao aromatični čaj, dok se *R. myconi* u katalonskom delu Pirineja upotrebljava za iskašljavanje (AGELET ET AL., 2002).

### 1. 1. 2. Taksonomski položaj i podela familije *Gesneriaceae*

Sve dosadašnje molekularne analize potvrdile su monofiletsko poreklo familije *Gesneriaceae*. Kao veoma bliska navodila se često familija *Scrophulariaceae*. Međutim, nijedna podgrupa ove familije nije se pokazala kao posebno srodna familiji *Gesneriaceae*. U novije vreme pojedini predstavnici familije *Gesneriaceae* uvršćeni su u molekularne analize reda Lamiales. Te analize su pokazale da *Gesneriaceae* zauzimaju jednu od bazalnih pozicija u redu, a da su rodovi *Sanango* i *Peltanthera* (*Loganiaceae*) potencijalni najbliži srodnici familije (WIEHLER, 1994; OLMSTEAD ET AL., 2001).

Današnja familija *Gesneriaceae* nastala je spajanjem dve familije: *Gesneriaceae* koja je prvobitno obuhvatala samo predstvanike koji naseljavaju Novi svet i *Didymocarpaceae* ili *Cyrtandraceae* koja je obuhvatala vrste iz Starog sveta. Ove dve familije je ROBERT BROWN 1839. godine spojio u jednu i obuhvatio ih nazivom *Gesneriaceae*.

Nakon klasifikacija BURTT-A (1963) i WIEHLER-A (1983), današnja sistematska podela potpomognuta molekularnim analizama razlikuje *Gesneriaceae* Novog i Starog sveta, sa po nekoliko podgrupa.

Predstavnici familije iz **Novog sveta** podeljeni su na dve podgrupe (SMITH, 2000; ZIMMER ET AL., 2002; SMITH ET AL., 2004; CRONK ET AL., 2005):

- **Coronantheroid *Gesneriaceae*** rasprostranjene su na južnoj hemisferi sa rodovima kao što su: *Lenbrassia*, *Fieldia*, *Negria*, *Coronanthera*, *Depanthus*, *Rhabdothamnus*, *Mitraria*, *Sarmienta*, *Asteranthera*;

- **Gesneroid *Gesneriaceae*** prisutne su u centralnom i južnom Meksiku, Centralnoj i Južnoj Americi sa tribusima Gloxiniae, Episcieae, Gesneriae, Sinnigieae, Sphaerorrhizeae, Besleriae, Napeantheae (ova dva poslednja tribusa su najprimitivniji među predstavnicima Novog sveta i međusobno su veoma srodni).



**Gesneriaceae Starog sveta** su se pokazale kao znatno komplikovanija grupa. Ranija podela na tribuse nije podržana molekularnim analizama, već su uočljive dve grupe (MAYER ET AL., 2003; MÖLLER ET AL., 2009; WANG ET AL., 2010):

- **Epithematoid Gesneriaceae**, iz Južne i Jugoistočne Azije sa po jednom vrstom u Zapadnoj Africi i Centralnoj Americi (*Epithema*, *Rhynchoglossum*);
- **Didymocarpoid Gesneriaceae** unutar koje se razlikuje nekoliko morfo-geografskih grupa:
  - osnovni azijski i evropski rodovi koji obuhvataju niz raznolikih rodova, kao što su *Jerdonia*, *Corallodiscus*, *Haberlea*, *Ramonda*, *Jankaia*, *Tetraphyllum*, *Boeica*, *Rhynchotechum*, *Platystemma*;
  - afrički rodovi koji čine jasno definisanu grupu sa rodom *Streptocarpus* kao najprimitivnijim od koga su, najverovatnije, nastali ostali afrički rodovi;
  - napredni azijski rodovi (kao što su *Henckelia*, *Chirita*, *Didymocarpus*, *Aeschynanthus* i dr.):
    - ❖ rodovi sa uvrnutim čaurama (što ih čini sličnim afričkim rodovima),
    - ❖ rodovi sa pravim čaurama ili nepucajućim plodovima.

### 1. 1. 3. Poreklo familije *Gesneriaceae*

Iako je familija *Gesneriaceae* veoma dobo proučavana, još uvek se ne zna sa sigurnošću gde je familija nastala i kako se iz centra porekla dalje širila. Iako danas većina vrsta ima tropsko rasprostranjenje, smatra se da je familija nastala izvan današnjih tropskih predela (WEBER, 2012).

Po jednoj teoriji, familija potiče iz Kine. Kao argument navodi se da danas u tom delu sveta postoji 31 endemična roda ove familije, kao i da je broj rodova unutar azijskog kontinenta 3 puta veći nego u JI Aziji. Kritičari ove teorije navode nekoliko kontraargumenata:

- 1) da je koncept mnogih kineskih rodova veoma uzak,
- 2) da se centar evolucione diverzifikacije nekritički izjednačava sa centrom porekla,

- 3) da je teorija bazirana samo na azijskim rodovima familije i da uopšte ne uzima u obzir predstavnike iz Novog sveta.

Druga teorija je zasnovana na povezivanju današnjeg rasprostranjenja različitih grupa familije *Gesneriaceae* sa pomeranjem kontinenta (BURTT, 1998). Osnovna postavka je da familija vodi poreklo sa južne hemisfere, sa kontinenta Gondvane, pri čemu bi grupa Coronantheroidnih *Gesneriaceae* bila reliktna, najstarija grupa familije. Odatle su se proširile u Ameriku preko Antarktika i od njih su nastale ostale grupe *Gesneriaceae* Novog sveta.

Od Coronantheroidnih *Gesneriaceae* po ovoj teoriji poreklo vode i paleotropski predstavnici familije. One su se proširile ka severu sa kretanjem indijske ploče i vrlo rano su se podelile na Epithematoidne i Didymocarpoidne *Gesneriaceae*.

Epithematoidna grupa, nekada mnogo šire rasprostranjena u Aziji i Africi, danas je veoma mala. *Epithema tenue* bi bila poslednji predstavnik grupe u Africi, dok je rod *Rhynchoglossum* dospelo iz Afrike, iz koje je danas potpuno iščezao, u Ameriku.

Didymocarpoidna grupa se, napredujući ka severu, proširila na Madagaskar, a odatle je naselila i Afriku. Spajanjem indijske ploče sa Azijom, proširila se i na ovaj kontinent. Ovde je došlo do podele na dve grupe, severnu i južnu, verovatno kao posledica pojave suše i prilagođavanja biljaka na takve uslove. Severna grupa se proširila, s jedne strane ka istoku i jugoistoku u Kinu i susedne oblasti, a s druge strane ka zapadu u Evropu. Južna grupa se proširila dalje ka JI Aziji i Indoneziji.

Brojne su kritike i ove teorije o poreklu familije *Gesneriaceae*.

- 1) Veliko je pitanje da li je familija dovoljno stara da vodi poreklo još iz vremena postojanja Gondvane. Naime, starost familije je procenjena na 65 - 70 miliona godina (RAVEN & AXELROD, 1974; BREMER ET AL., 2004), dok je razdvajanje Gondvane započelo pre oko 150 miliona godina (STOREY ET AL., 1995).
- 2) Molekularne analize nisu ni na koji način povezale Coronantheroidne *Gesneriaceae* sa Epithematoidnom ili Didymocarpoidnom grupom, već ukazuju samo da su one deo predstavnika familije *Gesneriaceae* u Novom svetu, koje su u Americi i nastale, pa su se odatle preko Antarktika proširile ka JZ Pacifiku (CRONK ET AL., 2005).

- 3) Današnja disjunktna distribucija rodova *Epithema* i *Rhynchoglossum* mnogo verovatnije je nastala kao posledica relativno skorašnje introdukcije nego usled pomeranja kontinenata. Naime, ispostavilo se da je američka vrsta *R. azureum* vrlo bliska nekim južnoindijskim vrstama, što ukazuje da je ova vrsta relativno skoro naselila Ameriku, verovatno sa migracijama ranih Polinežana (MAYER ET AL., 2003). Lokaliteti koje danas naseljava ova vrsta u Americi upravo se nalaze duž pacifičke obale u blizini mesta gde su prvi migranti osnivali svoja naselja.
- 4) Molekularne analize nisu podržale ni hipotezu o ranijem postanku afričkih u odnosu na azijske predstavnike familije. Zapravo, po ovim analizama afrički rodovi nastali su od predačke euroazijske grupe, čiji su poslednji preživeli predstavnici osnovni azijsko-evropski rodovi.

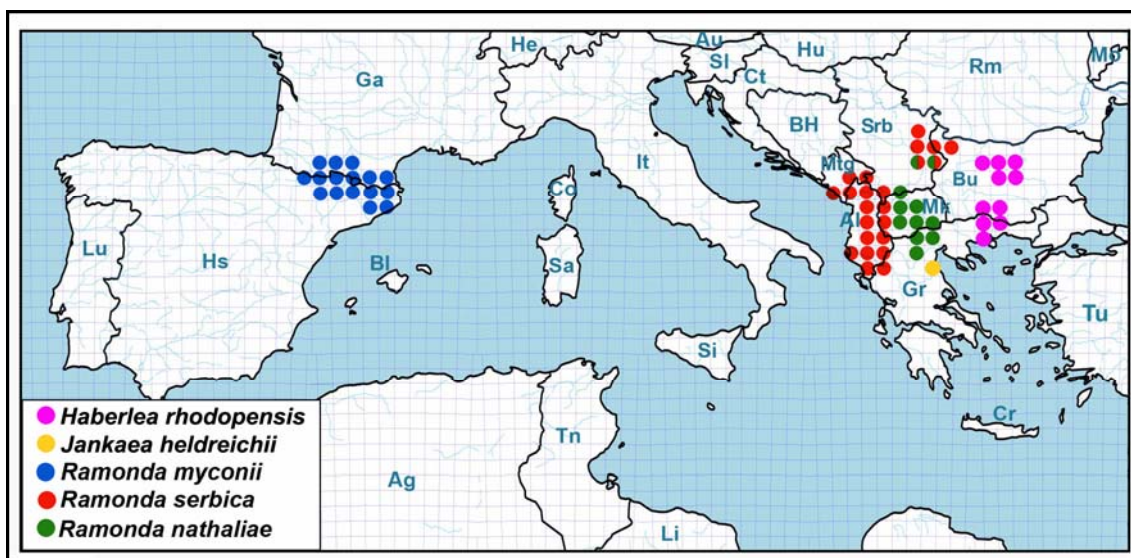
Dakle, pravog odgovara o poreklu i putevima širenja familije *Gesneriaceae* još uvek nema. Iako po mnogim karakteristikama predstavnici Novog sveta deluju kao primitivnija i starija grupa, samo razdvajanje od rođaka iz Starog sveta moralo se desiti veoma rano.

## 1. 2. EVROPSKI PREDSTAVNICI FAMILIJE *Gesneriaceae*

Familija *Gesneriaceae* u Evropi predstavljena je sa 5 vrsta u okviru 3 monotipska i oligotipska roda. Oligotispki rod *Ramonda* L. C. M. Richard obuhvata 3 vrste od kojih je *R. myconi* (L.) Reichenb. endemit Pirinejskog, dok su druge dve vrste, *R. nathaliae* Pančić & Petrović i *R. serbica* Pančić endemiti Balkanskog poluostrva. Osim vrsta iz roda *Ramonda*, u Evropi, takođe na Balkanu, prisutna su i dva monotipska roda iz iste familije, *Haberlea* Friv. (*H. rhodopensis* Friv.) i *Jankaea* Boiss. (*J. heldreichii* (Boiss.) Boiss.) (Karta 1).

*Haberlea rhodopensis* rasprostranjena je u Bugarskoj i Grčkoj. U Bugarskoj je prisutna na Predbalkanu i Srednjoj Staroj planini, Trakijskoj niziji (ogranci Rodopa prema Trakijskoj niziji) i na Rodopima. U Grčkoj se javlja u severoistočnom delu zemlje na planinama Pangeon, Falakron i na Rodopima. Zastupljena je, pre svega, na

krečnjaku, ali i na silikatima (VELČEV ET AL., 1992), na nadmorskim visinama skoro od nivoa mora do 1950 m (STRID, 1991).



**Karta 1.** Distribucija pet vrsta familije *Gesneriaceae* u Evropi predstavljena na UTM karti 50 x 50 km (preuzeto iz SILJAK-YAKOVLEV ET AL., 2008, prerađeno i dopunjeno).

*Jankaea heldreichii*, lokalni endemit planine Olimp u Grčkoj, naseljava krečnjačke stene i klisure, na nadmorskim visinama od 400 do 2400 m (STRID, 1991).

*Ramonda myconi* naseljava senovite klisure Pirineja i druge krečnjačke masive centralne i zapadne Katalonije (PICÓ & RIBA, 2002), a nedavno su otkrivene i njene populacije smeštene južnije, u blizini mora (CALDUCH ET AL., 2007). Populacije su međusobno izolovane. Međutim, rastojanje između najudaljenijih populacija je svega oko 300 km (PICÓ ET AL., 2002).

*Ramonda nathaliae* ima manje više kompaktan areal koji se najvećim delom nalazi u Makedoniji, a manjim u Grčkoj i na Kosovu na planini Šari. Jedina disjunkcija je u jugoistočnoj Srbiji.

Druga balkanska vrsta ovog roda, *R. serbica* ima najveći areal koji se prostire od severozapadne Grčke, preko Albanije, zapadne Makedonije, jugoistočne i severoistočne Crne Gore, jugozapadne, jugoistočne i severoistočne Srbije, do severozapadne Bugarske.

Svi predstavnici familije *Gesneriaceae* u Evropi su relikti tercijerne starosti. U većem delu Tercijera klima je u mnogim delovima srednje, a posebno južne Evrope bila subtropska, odnosno znatno vlažnija i toplija nego danas. Nije poznato kakvo je bilo njihovo rasprostranjenje ovih biljaka u Tercijeru, jer fosilnih ostataka nema. No, pretpostavlja se da su bile znatno šire rasprostranjene. Krajem Tercijara dolazi do zahlađenja na severnoj hemisferi i počinje Ledeno doba. Ove biljke se tada, najverovatnije, spuštaju južnije i na niže nadmorske visine i naseljavaju refugijalna staništa u kojima pronalaze pribežište od nepovoljnih klimatskih prilika.

Na takvim skrovitim mestima nalazimo svih pet vrsta, najčešće, i danas. Naseljavaju klisure i kanjone u brdsko - planinskim predelima, jer su tu mikroklimatski uslovi, a pre svega, vlažnost i temperatura povoljniji za opstanak ovih subtropskih predstavnika u Evropi. Često su u blizini prisutni planinski potoci ili reke koje pružaju dovoljnu vlažnost vazduha za ove biljke. Osim toga, mogu se naći i na strmim, stenovitim planinskim stranama. Po pravilu, svoje zajednice grade na severno eksponiranim stranama i pre svega, na krečnjačkoj podlozi. Izuzetke predstavljaju *H. rhodopensis* koja se može naći i na silikatima (VELČEV ET AL., 1992) i *R. nathaliae* koja se, osim na krečnjaku, može naći i na škriljcu, serpentinitu i granitu (KOŠANIN, 1921). Biljke su najčešće „ušuškane u tepih“ od mahovina, naročito dok su još mlade (Sl. 2), što im pruža povoljnije uslove za razvoj na strmim stenama sa minimumom zemljišta.

### 1. 2. 1. Otkrića evropskih predstavnika familije *Gesneriaceae*

Svih pet vrsta otkriveno je u 19. veku. Prvo je 1805. godine francuski botaničar RICHARD na padinama istočnih Pirineja otkrio vrstu koju je nazvao *Ramondia pyrenaica*. Samo ime roda dao je u čast francuskog botaničara Ramonda koji je krajem 18. veka izučavao floru Pirineja. U to vreme, otkriće nove biljne vrste koja je, pri tom, predstavljala ostatak tropske flore na tlu Evrope, bilo je senzacionalno otkriće.

Sledeća je opisana *H. rhodopensis* sa Rodopa u Bugarskoj (FRIVALDSKZY, 1835). S obzirom da se radilo o novom rodu i vrsti familije *Gesneriaceae* u Evropi, interesovanje evropskih botaničara bilo je veliko.



**Slika 2.** Odrasle individue vrste *R. serbica* sa lokaliteta Radovanski Kamen (A) i mlade jedinike sa lokaliteta Oblik (B), ušuškane u tepih od mahovina.

Skoro četrdeset godina kasnije, Josif Pančić je na planini Rtanj pronašao biljku za koju je prvo mislio da je *H. rhodopensis*, ali je kasnije, na osnovu detaljnijih istraživanja i poređenja, shvatio je da se radi o novoj vrsti i daje joj ime *R. serbica* (PANČIĆ, 1874). Odjek vesti o nalazu nove vrste roda *Ramonda* u Evropi bio je velik, s obzirom da se radi o reliktnoj i endemičnoj biljci koja je ukazivala na kompleksnu istoriju flore Evrope.

Već naredne godine švajcarski botaničar BOISSER (1875) otkrio je na planini Olimp u Grčkoj biljku kojoj je dao ime *Ramondia heldreichii*, ali koju je kasnije izdvojio u zaseban rod *Jankaea*.

Poslednja je pronađena i opisana *R. nathaliae* od strane dr Save Petrovića i Josifa Pančića (1882). Naime, dr Sava Petrović bio je dvorski lekar kralja Milana Obrenovića koji je, istražujući floru okoline Niša, na Visokom kamenu u Jelašničkoj klisuri i na Suvoj planini našao biljke koje su bile veoma slične ranije opisanoj vrsti *R. serbica*. Kako nije bio siguran da li se radi o istoj ili novoj vrsti, u pomoć je pozvao J. Pančića koji je zaključio da se radi o novoj vrsti roda *Ramonda* koju zajedno opisuju pod imenom *R. nathaliae* u čast kraljice Natalije Obrenović.

Prva od tri vrste roda *Ramonda* otkrivena je *R. myconi*. Otkriće druge vrste na Balkanu, *R. serbica* nije izazvalo nedoumice da li je u pitanju nova vrsta tog roda ili ne. Međutim, nakon otkrića i druge balkanske vrste *R. nathaliae*, otpočela je polemika o tome da li se zaista radi o dve dobre vrste ili je jedna samo varijetet druge (VELENOVSKY, 1898; VANDAS, 1909; HAYEK, 1917). Polemika je trajala skoro pedeset godina, a onda je čuveni botaničar NEDELJKO KOŠANIN objavio rad „Geografija balkanskih ramondija“ (1921) u kome jasno ukazuje na morfološke, horološke i ekološke razlike između *R. nathaliae* i *R. serbica*.

## 1. 2. 2. Osnovne karakteristike evropskih predstavnika familije *Gesneriaceae*

Evropski predstavnici familije *Gesneriaceae* nemaju prave rizome, već prelaznu formu korenovog sistema ka rizomima. Imaju spiralni raspored listova, koji je manje zastupljen u familiji i uglavnom je prisutan kod vrsta koje imaju rozetu, kao što je slučaj evropskim, ali i nekim rodovima iz istočne Azije. Listovi su jednostavni i celi, kod rodova *Haberlea* i *Ramonda* nazubljenih ivica, dok jedino listovi vrste *J. heldreichii* imaju celu ivicu. Listovi svih pet evropskih vrsta odlikuju se u različitoj meri izraženom dlakavošću, od blago dlakavih kod *H. rhodopensis* do izrazito dlakavih kod *J. heldreichii*. Velika razlika između tri roda je u tipu cvetova koji su kod rodova *Haberlea* i *Jankaea* zigomorfni (Sl. 3), dok su kod roda *Ramonda* aktinomorfni (Sl. 4). Plod je čaura ispunjena velikim brojem sitnih semena.

Između pet evropskih vrsta iz pomenutih rodova, osim morfoloških, postoje razlike i u broju hromozoma (Tab. 1). Za *H. rhodopensis* postoje različiti podaci u literaturi, od  $2n = 38$  do  $2n = 48$  hromozoma, dok je za vrstu *J. heldreichii* utvrđen samo broj od  $2n = 56$ . *Ramonda myconi* je diploid sa  $2n = 48$  hromozoma, kao i *R. nathaliae* za koju, međutim, postoji i podatak od  $2n = 36$  hromozoma. Kada je u pitanju vrsta *R. serbica*, ona svakako ima veći broj hromozoma od svih ostalih vrsta evropskih predstavnika *Gesneriaceae*. Za ovu vrstu su do sada u literaturi bili poznati podaci o  $2n = 72$  i  $2n = 96$  hromozoma (Tab. 1).

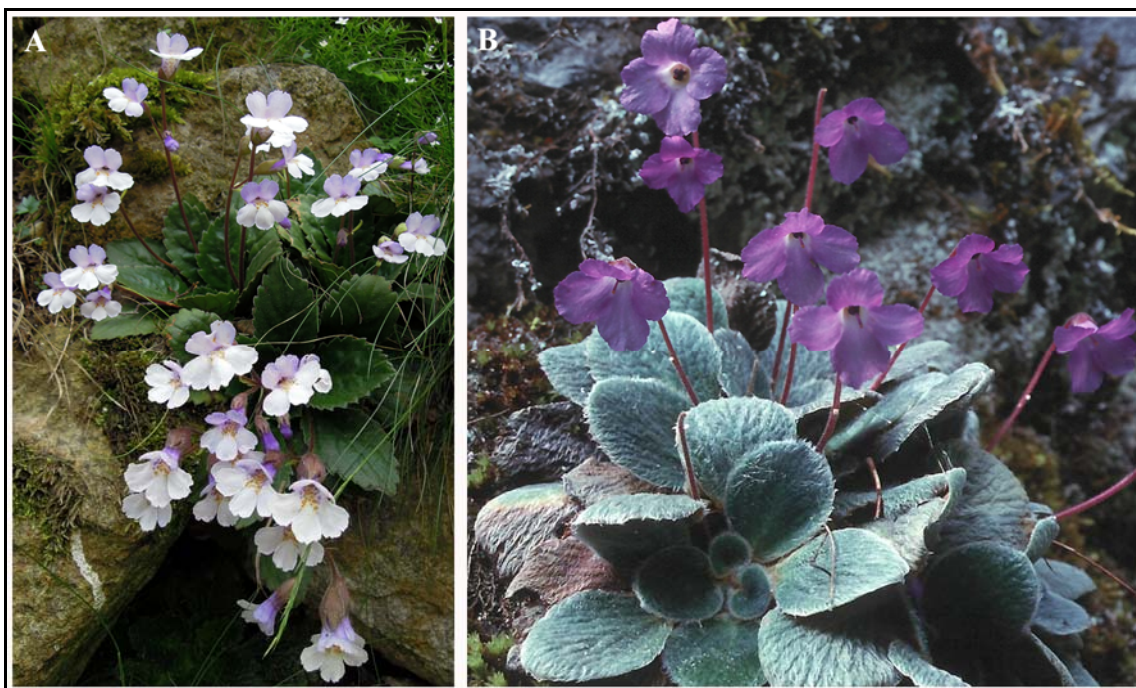
**Tabela 1.** Brojevi hromozoma poznati iz literature za evropske predstavnike familije *Gesneriaceae*.

<b>Takson</b>	<b>2n</b>	<b>Referenca</b>
<i>R. myconi</i>	48	RATTER & PRENTICE (1964) CONTANDRIOPOULOS (1966) LEPPER (1970)
<i>R. nathaliae</i>	36 48 48	GLIŠIĆ (1924) RATTER (1963) CONTANDRIOPOULOS (1966)
<i>R. serbica</i>	72 96	GLIŠIĆ (1924) CONTANDRIOPOULOS (1966)
<i>H. rhodopensis</i>	48 38 44 44	CONTANDRIOPOULOS (1966) BORHIDI (1968) LEPPER (1970) MILNE (1975)
<i>J. heldreichii</i>	56	CONTANDRIOPOULOS (1966)

Još jedna zajednička karakteristika ovih biljaka je poikilohidričnost, sposobnost da nepovoljne uslove na staništu, kao što su nedostatak vlage, visoke i niske temperature, prežive ulaskom u anabiozu, fiziološko stanje u kome se njihov metabolizam usporava, a nadzemni organi dehidriraju (Sl. 5). Kada se povoljni uslovi na staništu ponovo uspostave, one u roku od nekoliko sati do nekoliko dana ponovo uspostavljaju normalnu metaboličku aktivnost i ozelenjavaju (STEVANOVIĆ, 1986; STEFANOV ET AL., 1992; MÜLLER ET AL., 1997). Zato se još nazivaju i „biljke koje vaskrsavaju“ (eng. resurrection plants; GAFF & HALLAM, 1974).

Ovu jedinstvenu pojavu je kod roda *Ramonda* prvi uočio srpski botaničar ruskog porekla Pavel Černjavski (ČERNJAVSKI, 1918). Prema navodima samog autora, slučajno je prosuo vodu po jednom herbarskom primerku vrste *R. nathaliae*. Kada je sutradan ponovo otvorio herbar ugledao je zelenu biljku.





Slika 3. A) *Haberlea rhodopensis* Friv. iz Botaničke bašte „Jevremovac“ u Beogradu i B) *Jankaea heldreichii* (Boiss.) Boiss. (<http://www.stridvall.se/la/galleries.php>).



Slika 4. A) *Ramonda myconi* (L.) Reichenb. ([http://erick.dronnet.free.fr/belles\\_fleurs\\_de\\_france/index.htm](http://erick.dronnet.free.fr/belles_fleurs_de_france/index.htm)), B) *R. nathaliae* Pančić & Petrović sa lokaliteta Divljana i C) *R. serbica* Pančić iz Jelašničke klisure.



Slika 5. *Ramonda sp.* u anabiozi

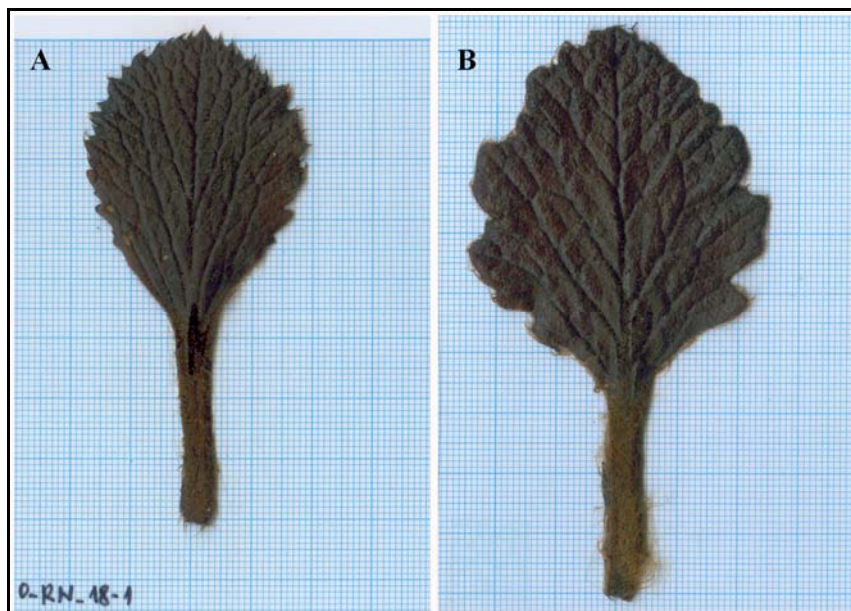
### 1. 3. KARAKTERISTIKE VRSTA RODA *Ramonda* NA BALKANSKOM POLUOSTRVU

Osnovne morfološke karakteristike sve tri vrste roda *Ramonda* prikazane su u Tabeli 2. *Ramonda myconi* se od dve balkanske vrste razlikuje po manje dlakavim listovima, špicastim anterama i nešto dužim čaurama.

S druge strane, osnovne morfološke razlike između *R. nathaliae* i *R. serbica* su u građi:

- listova (Sl. 6):
  - pravilno nazubljene ivice lista kod *R. nathaliae* u odnosu na nepravilno i izraženije nazubljene kod *R. serbica*,
  - liska se naglo sužava u lisnu dršku kod *R. nathaliae*, a postepeno kod *R. serbica*;
- cvetova (Sl. 7):
  - tanjirasti kod *R. nathaliae*, a oblika levka kod *R. serbica*,
  - listići krunice se međusobno obodom preklapaju kod *R. nathaliae*, a kod *R. serbica* ne,
  - boja listića krunice je tamnije ljubičasta kod *R. nathaliae* u poređenju sa *R. serbica*,

- o antere su obično žute kod *R. nathaliae*, a ljubičasto-plave kod *R. serbica*.



**Slika 6.** Listovi vrste *R. nathaliae* (A) i *R. serbica* (B)



**Slika 7.** Cvetovi vrste *R. nathaliae* (A) i *R. serbica* (B)

Osim morfološki, dve balkanske vrste se međusobno razlikuju i po broju hromozoma, koji je kod *R. nathaliae*  $2n = 36$  (GLIŠIĆ, 1924) ili  $2n = 48$  (RATTER, 1963; CONTANDRIOPOULOS, 1966), a kod *R. serbica*  $2n = 72$  (GLIŠIĆ, 1924) ili  $2n = 96$  (CONTANDRIOPOULOS, 1966).

**Tabela 2.** Uporedni prikaz morfoloških karakteristika tri vrste roda *Ramonda* (MICEVSKI, 1956; RIX & WEBB, 1972; JOVANOVIĆ-DUNJIĆ, 1974; STRID & TAN, 1991; ANDREEV ET AL., 2006; PEEV ET AL., 2011)

Karakter	<i>Ramonda myconi</i>	<i>Ramonda nathaliae</i>	<i>Ramonda serbica</i>
<b>listovi</b>	2-6 x 1-5 cm, rombično-sferičnog do ovalnog oblika, izbrazdani, nazubljene ivice, sa belim dlakama na naličju lista i dugim žutim na lisnoj dršci, koja je kratka i postepeno se sužava ka kraju	3-5 x 1-3 cm, eliptično-jajasti do široko jajasti, retko rombično jajasti, izbrazdani, sitno i pravilno nazubljene ivice, sa retkim crvenkastosvetlomrkim dlačicama na licu, sa crvenkasto-svetlo-mrkim dlakama na naličju lista i dugim žutim na lisnoj dršci, skraćene osnove, sa liskom koja se naglo sužava u lisnu dršku, lisna drška 1-4 cm	4-7 x 2-3.5 cm, rombično-objajasti do eliptično-rombični, izbrazdani, nepravilno i izraženije testerasto nazubljene ivice, sa retkim, belim ili pri osnovi belim, a na vrhu svetložučkastim dlačicama na licu lista, sa crvenkastomrkim dlakama na naličju lista i dugim žutim na lisnoj dršci, trouglaste osnove sa liskom koja se postepeno sužava u lisnu dršku
<b>broj listova u rozeti</b>		10-30	do 15
<b>cvetna drška</b>	6-12 cm, sa 1-6 cvetova, prekrivena žlezdanim dlačicama	6-8 cm, sa 1-4 cveta, prekrivena žlezdanim dlačicama	5-12 cm, sa 1-4 cveta, prekrivena žlezdanim dlačicama
<b>čašica</b>	režnjevi duži od tube	4-6 režnjeva, režnjevi duži od tube	režnjevi duži od tube
<b>krunica</b>	kružna, skoro aktinomorfna, sa cevi koja je jednaka ili kraća od režnjeva, 3-4 cm, tamno ljubičasta sa žutim središtem	tanjirasta, skoro aktinomorfna, sa cevi koja je jednaka ili kraća od režnjeva, režnjevi su otvoreni, ravni, 2-3.5 cm, (3-)4(-5) režnjeva koji se međusobno obodom preklapaju, lili do ljubičasti, sa narandžasto-žutim središtem	oblika levka, skoro aktinomorfna, 2-3.5 cm, sa cevi koja je jednaka ili kraća od režnjeva, režnjevi su blago uzdignuti i ne preklapaju se, bledo-ljubičasti
<b>prašnici</b>	broj jednak broju režnjeva krunice, svi fertilni	broj jednak broju režnjeva krunice, svi fertilni	broj jednak broju režnjeva krunice, svi fertilni
<b>antere</b>	slobodne, duge skoro kao filamenti, 3-4 mm, špicaste, žute	slobodne, duge skoro kao filamenti, 2.5-3 mm, zaobljene, žute, neki put sa malo plave boje	slobodne, duge skoro kao filamenti, 2.5-3 mm, zaobljene, tamno ljubičasto-plave
<b>žig</b>	ceo, glavičast	ceo, glavičast	ceo, glavičast
<b>stubić</b>	5-7 mm	c. 3 mm	c. 4-7 mm
<b>Čaura</b>	veća od čašice, c. 15 mm	veća od čašice, c. 9 mm	c. 10 mm, veća od čašice

U ekološkom pogledu čini se da se *R. nathaliae* odlikuje većom plastičnošću u odnosu na *R. serbica*. Naime, ona osim krečnjačke podloge naseljava i serpentinit (klisura reke Pčinje iznad Velesa i Raduša), škriljce (klisura reke Topolke kod Velesa) i granit (klisura Rajačke reke između Drenove i Mramora) (KOŠANIN, 1921), dok je *R. serbica* prisutna isključivo na krečnjaku.

*Ramonda nathaliae* zauzima veću visinsku amplitudu od *R. serbica*. Naime, *R. nathaliae* naseljava lokalitete koji se nalaze na nadmorskim visinama od 100 m, kao što je, na primer, u klisuri Vardara kod Demir Kapije (BORNMÜLLER, 1925/28) do 2200 m, kao što je slučaj sa populacijama na planinama Jakupici i Nidže u Makedoniji (STEVANOVIĆ ET AL., 1997). Najmanja nadmorska visina na kojoj se sreće *R. serbica* je oko 200 m na lokalitetu Malësi e Madhe, a najveća oko 1950 m na lokalitetu Mali i Çikës, oba u Albaniji (MARKU, 2007).

Osim toga, vrstu *R. nathaliae* češće pronalazimo na otvorenijim staništima, kao što je to slučaj sa populacijama kod Katlanovske banje, u klisuri reke Pčinje ili na okomitim stenama subalpijskih regiona Suve planine, Jakupice i Nidža. *Ramonda serbica*, s druge strane, uglavnom se javlja na zaštićenijim mestima, u senci žbunova ili šumskog drveća, naročito na većim nadmorskim visinama. Inače, obe vrste striktno naseljavaju severne, severozapadne i severoistočne ekspozicije bilo da se radi o otvorenim ili šumskom vegetacijom zaklonjenim staništima.

#### **1. 4. RASPROSTRANJENJE VRSTA RODA *Ramonda* NA BALKANSKOM POLUOSTRVU**

Dve vrste balkanskih ramondi naseljavaju različite oblasti na Balkanu i susreću se samo u jugoistočnoj Srbiji gde grade simpatrijske populacije na dva lokaliteta.

*Ramonda nathaliae* odlikuje se relativno kompaktnim arealom koji se svojim najvećim delom nalazi u Makedoniji. Van ove teritorije, prisutna je i na severu Grčke, obroncima planine Šare na Kosovu, a najizdvojeniji deo njenog areala je u jugoistočnoj Srbiji (Karta 2). Na zapadu, granica njenog do danas poznatog areala proteže se od Dobre Vode kod Kičeva u Makedoniji do klisure reke Gotovuše u podnožju Ljubotena

na Kosovu. Najjužnije tačke njenog rasprostranjenja nalaze se na planini Vermion u Grčkoj. Na istoku granicu predstavljaju reke Pčinja i Vardar. Severnu granicu kompaktnog dela areala predstavljaju ogranci Šar-planine i Skopske Crne Gore prema Vardaru. Van ove teritorije, *R. nathaliae* se javlja još jedino u jugoistočnoj Srbiji, na Suvoj planini i u simpatrijskim populacijama u Sićevačkoj i Jelašničkoj klisuri. Gotovo u celosti, njen areal je vezan za egejski sliv, dok samo populacije u jugoistočnoj Srbiji pripadaju crnomorskom slivu (STEVANOVIĆ ET AL., 1991).

### ***Ramonda nathaliae***

**Florni element:** balk(sk-pind(S)-mak-tes-mez(Z))

**GRČKA: S:** Kilkis (Paeonias (SZ Kastaneri)), Vermion (iznad sela Naoussa, padine SZ od Tsanakatsi), Voras (Pefkoton, Loutraki, Kresna, SZ od Loutra Arideas), Pinovon, Tzena, Smolikas (Samarina), Paiko (Gola-Tsouka, Theodorakias, Rema-Grammos, od Grive do Kastanerija), više Vodena (Vladovo).

**MAKEDONIJA:** Šara (Ljuboten (selo Vratnica, klisura reke Vratnice)), Skopska Crna Gora (manastir Sv. Ilije, manastir Sv. Arandžela), Žeden (selo Raduša (Kisela Voda)), Matka, Skoplje (Sopište), klisura reke Pčinje (iznad Katlanovske banje, na putu ka Velesu), kod brane na jezeru Mladost, klisura reke Treske (Šiševo), Karšjak, Suha Gora, klisura reke Vardar (svi tesnaci od Žedena do Gumenže, Demir Kapija), Derven, Karadžica, Golešnica planina (Begova glava), Jakupica, Drenovo (klisura Rajačke reke (Donja klisura, između Drenove i Mramora), Dautica, Kičevo (Dobra Voda), Babuna (gornji tok), Pletvar, Trojaci, Crna reka (morihovsko-tikveški deo sliva), klisura reke Topolke, Meglen, reka Blaščica (do Alšara), Kožuf, Dudica, Kozjak, Nidže.

**SRBIJA: JI:** Bela Palanka (klisura kod sela Divljana), Jelašnička klisura (Radovanski Kamen iznad sela Čukljenik), Sićevačka klisura (manastir Sveta Petka – Gradište, iznad manastira Sveta Petka, Oblik, selo Ostrovica), Suva planina (Crvena reka, Golaš (Borov

rid), Mosor, Sokolov Kamen, Trem, Rakoš); **Kosovo:** Šara (severne padine Ljubotena (klisura reke Gotovuše, kod sela Gotovuša)).

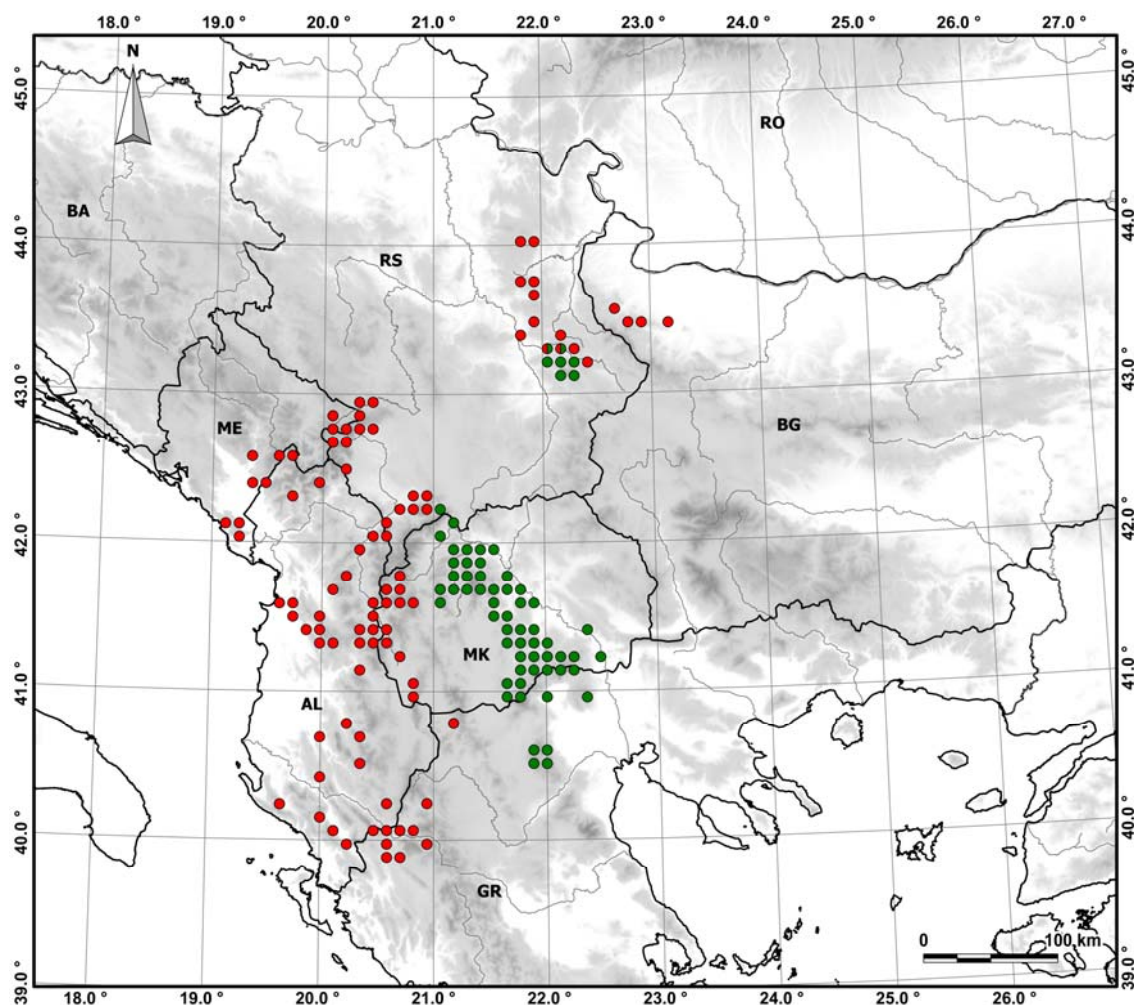
**Tip podloge:** krečnjak, serpentinit, škriljci, granit.

**Napomena:** Smolikas (Samarina) (ZAGANIARIS, 1940) je nepotvrđen nalaz i verovatno se odnosi na *R. serbica*.

**Nadmorska visina:** 100 – 2200 m.

**Reference:** PETROVIĆ, 1885; KOŠANIN, 1921; BORNMÜLLER, 1925./28.; SOŠKA, 1933; SOŠKA 1937./40.; ZAGANIARIS, 1940; MICEVSKI, 1956; TATIĆ & STEFANOVIĆ, 1976; STEVANOVIĆ & STEVANOVIĆ, 1985; STEVANOVIĆ ET AL., 1986B; STEVANOVIĆ, 1989; STRID & TAN, 1991; NIKETIĆ, 1996; STEVANOVIĆ ET AL., 1997; TOMOVIĆ, 2007; TAN ET AL., 2008.

*Ramonda serbica* ima najveći areal od svih predstavnika familije *Gesneriaceae* u Evropi i karakterišu ga dve disjunkcije (Karta 2). Najveći deo areala vezan je za klisure i kanjone Jadranskog sliva pružajući se od Epira u Grčkoj, preko čitave Albanije, zapadne Makedonije, Metohije, do JI Crne Gore. Najzapadniji deo areala je na padinama Rumije u Crnoj Gori, a najjužniji na planini Mitsikeli u Epiru. Istočne granice ovog, manje više, kompaktnog areala nalaze se u zapadnoj Makedoniji, na liniji Golema i Đandijekarska reka – Radika – klisura Crnog Drima kod sela Lukovo – Galičica (STEVANOVIĆ ET AL., 1986A). U okviru Crnomorskog sliva postoje dve grupe lokaliteta. Jednu čine klisure reke Ibra i ovaj deo areala je razdvojen od onog koji pripada Jadranskom slivu prokletijskim masivom. Tu je, u okviru terenskih istraživanja za ovu doktorsku disertaciju, pronađen i jedan novi lokalitet za *R. serbica* u klisuri Mojstirske suhovare, desne pritoke Ibra.



**Karta 2.** Karta rasprostranjenja vrsta *R. nathaliae* (zelene tačke) i *R. serbica* (crvene tačke).

Drugi deo predstavlja pravu disjunkciju koja obuhvata lokalitete u severoistočnoj i istočnoj Srbiji i severoistočnoj Bugarskoj. Ovde se oblast koju naseljava *R. serbica* proteže od Zlota na severu, preko Rtnja i klisure Miljkovačke reke na zapadu, do Jelašničke klisure na jugu i Čiflika na jugoistoku. Najistočnija nalazišta su u severoistočnoj Bugarskoj. Najveći broj staništa vrste *R. serbica* nalazi se u okviru jadranskog sliva, a manji pripada egejskom i crnomorskom slivu (STEVANOVIĆ ET AL., 1991).



***Ramonda serbica***

**Florni element:** dinar(JI)-balk(sk-pind(S-C)-mez(Z))

**GRČKA:** S Pindhos: Mitsikeli, Timfi (klisura Vikos, dolina Aoös, Mikro Papingo), Trpezitsa; SC: Bela Voda; Varnos (NP Prespa (Kalo Nero)), u blizini reke Voidomatis (između Ioannina i Konitsa).

**ALBANIJA:** Berat (Mali i Tomorit), Dibër (Fushë Studen, Klenjë, Lurë), Gjirokastrë (Kardhiq), Gramsh (Gryka e Holtës), Kolonjë (Leskovik), Korçë (Osojë), Krujë (Kala e Krujës, Mali i Krujës, Mali i Sarisalltëkut, Qafë Shtamë), Kukës (Bicaj, Mali i Gjalicës, Podbregje (Koritnik), Qafa e Keqe (Bicaj)), Librazhd (Dardhë-Mal, Sinuer (□ermenikë)), Malësi e Madhe (Dukagjin, Gryka e Rapshës, Qafa e Thores (Bogë), Rapsh), Mat (Kala e Skëndërbeut (Mali i Dejës)), Mirditë (Shkallë Konaj (Mali i Shenjtë), Përmet (Gryka e Draçovës, Këlcyrë), Shkëkodër (Cukal), Skrapar (Radesh), Tepelenë (Luzat), Tiranë (Gryka e Lusës (Mali i Dajtit), Kala e Petrelës, Mali i Dajtit, Qafë Priskë, Tufinë), Tropojë (Dragobi, Qafa e Valbonës), Vlorë (Mali i □ikës).

**MAKEDONIJA:** Bistra, Cerovačka reka, Đandijekarska reka (desna strana puta Gostivar-Kičevo), Galičica (Zli do), klisura Male reke, klisura Mavrovske reke, klisure i kanjoni reke Radike (selo Žirovnica, Barička klisura), Lukovo (klisura Crnog Drima), Zvezda (Bukovik).

**CRNA GORA:** Bukovička reka, kanjon reke Cijevne, kanjon Male Rijeke (leva pritoka Morače), između Rožaja i Ribarića, Rumija (Dobra Voda, Bijela Skala, Mali Mikulić, Lisinj, Međurečka reka, kod sela Murići), Stari Bar (Mikulić).

**SRBIJA: JZ:** Mokra Gora (klisura Crne reke (neposredna blizina manastira Crna reka kod Ribarića), klisura Mojstirske suhovare), okolina Tutina (klisura reke Godulje, neposredno pred ušće Godulje u Ibar, Špiljani); **Ji:** Bela Palanka (Čiflik), Jelašnička klisura (između sela Jelašnica i Čukljenik, Radovanski Kamen iznad sela Čukljenik),

Kravlje (Kravljansko – Miljkovačka klisura, Kravljanska reka), Sićevačka klisura (Gradištanska klisura, Kusača, iznad manastira Sv. Bogorodice, Vis, manastir Sv. Petka, Oblik, selo Ostrovica, Prosečki vis); **I:** Rtanj (*locus classicus* (Baba, Garnavica, greben, ispod vrha, iznad rudnika Rtanj, Kusak, Šiljak-Kusak), Svrljiške planine (Julijanska planina, Pernatica, Pleš); **SI:** Kučajske planine (Klancuš (blizu Mikuljske reke), Malinik (blizu Zlota, kanjon Lazareve reke (Kotlovi)); **Kosovo:** Koritnik (Dugu keč), klisure Pečke Bistrice, Prizren (klisura Prizrenske Bistrice, Duvska klisura (iznad Dušanovog grada (manastir Sv. Arandjel)), Vrbičanska reka (između Prizrena i sela Rečana)), Prokletije (Beli Drim – izvor, kod sela Radavac, Hajla (grlo Tesnac), Koprivničko-streočki masiv, Koprivnik (Bjelo polje), Lumbardska planina, Ljubenička planina (Ljubenića krš, Ljubenički potok), Mokra Gora (krš Bogotija, selo Pašina voda, Suva planina, Vrelo selo, Veliki potok, Vrelski potok, Vrelski potok – Crveni krš), Paklen (klisura reke Sušice), Rugovska klisura (klisura Grlja, Miliševski potok – kanjon, Slane poljane, kod doma), Žljeb (Maja Rusolija), Homšur, Stubica, Štedim), iznad sela Ljubinj, Šara (Kodža Balkan (Cerevački potok, klisura reke Dušnice (u blizini manastira Sv. Trojice kod sela Mušutište), klisura reke Matos (u blizini manastira Sv. Bogorodice kod sela Mušutište), klisura reke Rusenice), Ošljak (iznad sela Mušnikova i Sevca)).

**BUGARSKA:** Zapadni Predbalkan (Mitrovtsi, Prevala, Dolni Lom, Turgoviste, selo Vurbovo, kod mesta Čermušnika u blizini Mihalovgrada, između Gornje i Donje Vedrenice).

**Tip podloge:** krečnjak.

**Napomena:** Navod za ovu vrstu sa planine Voras (VOLLOTIS, 1981) se, verovatno, odnosi na *R. nathaliae*. Vrsta se pogrešno navodi za Suvu planinu (KOŠANIN, 1921), kao i za područje Šar-planine – Ljuboten (WETTSTEIN, 1892), jer se ovi lokaliteti odnose na vrstu *R. nathaliae*.

**Nadmorska visina:** 200 – 1950 m.

**Reference:** PANČIĆ, 1874; PETROVIĆ, 1885; KOŠANIN, 1921; SOŠKA, 1933; STEFANOV & GEORGIEV, 1937; ROHLENA, 1942; MICEVSKI, 1956; VELČEV ET AL., 1973; TATIĆ & STEFANOVIĆ, 1976; JANKOVIĆ & STEVANOVIĆ, 1981; PETKOVIĆ ET AL., 1985; PETKOVIĆ ET AL., 1986; STEVANOVIĆ ET AL., 1986A; STEVANOVIĆ ET AL., 1986B; STEVANOVIĆ, 1989; STRID & TAN, 1991; MARKU, 2007; TOMOVIĆ, 2007; PEEV, 2011.

#### 1. 4. 1. Simpatrijske populacije

U radovima autora s kraja 19. i početka 20. veka, pronalaze se prvi podaci koji ukazuju na mogućnost da dve balkanske vrste roda *Ramonda* žive zajedno negde u jugoistočnoj Srbiji. Naime, navodi se prisustvo obe vrste u Jelašničkoj klisuri (PETROVIĆ, 1882), kao i na Suvoj planinu (PETROVIĆ, 1882; KOŠANIN, 1921). Ipak, KOŠANIN (1939) piše: „Njihovi areli prostiranja gotovo se nigde ne poklapaju, pa čak ni na podnožju Suve Planine. Njihovi se areali tamo samo sučeljavaju, jer je *R. serbica* ograničena samo na obale reke Nišave u Sićevačkoj klisuri, gde nema *R. nathaliae*. Ova raste na ostalim delovima Suve Planine, gde opet nema *R. serbica*.“

Uprkos ovim zbunjujućim i, donekle, nedovoljno preciznim podacima, STEVANOVIĆ ET AL. (1986B) su tokom svojih istraživanja našli u Jelašničkoj i Sićevačkoj klisuri zone prave simpatrije, odnosno sintopije dve balkanske vrste roda *Ramonda*.

Jedan lokalitet zone simpatrije nalazi se na Radovanskom Kamenu iznad Jelašničke klisure i mogao bi da odgovara lokalitetu koji je opisivao PETROVIĆ (1882) kao Visoki Kamen. Obe vrste rastu na nadmorskoj visini između 450 i 500 m, na severo-severoistočnoj ekspoziciji. Jedinke dve vrste nastanjuju pukotine i uzane police ogoljenih krečnjačkih stena, kao i stene i blokove stena unutar šume belograbića (*Carpinus orientalis*). Osim toga, jedna subpopulacija koju čini samo *R. serbica* nalazi se unutar bukove šume (*Fagus moesiaca*). *Ramonda nathaliae* je zastupljena više od *R. serbica*. Kao kserotolerantnija vrsta, ona ovde raste na izloženijim mikrostaništima

kakve su okomite stene, dok *R. serbica* obrasta podnožja stena i ostenjake zaštićene šumom.

Drugi lokalitet zone simpatrije nalazi se na severnoj strani Sićevačke klisure, iznad leve obale reke Nišave, na severnim okomitim padinama vrha Obliku, na nadmorskoj visini između 350 i 700 m. Najveći broj jedinki je na teško dostupnim strmim stranicama klisure pod senkom mešovite šume koju čine *Acer intermedium*, *Carpinus orientalis*, *Corylus colurna* i *Fagus moesiaca*. Deluje da je *R. serbica* na ovom lokalitetu nešto zastupljenija od *R. nathaliae*.

U blizini ova dva simpatrijska lokaliteta postoje i čiste populacije obe vrste. Tako je *R. nathaliae* zastupljena kako na samoj Suvoj planini, tako i u njenom podnožju, nedaleko od Bele Palanke, kod sela Divljana, dok *R. serbica* raste na Svrljiškim planinama, u Sićevačkoj klisuri iznad manastira Sveta Bogorodica i u samoj Jelašničkoj klisuri.

U vreme otkrića ovih simpatrijskih populacija vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica*, autori su mislili da hibridizacije između dve vrste nema, usled genetičke inkompatibilnosti (STEVANOVIĆ ET AL., 1986B).

O nastanku simpatričkog areala postoje različita mišljenja. U vreme kada je mislio da ove dve vrste dele istu teritoriju, KOŠANIN (1921) je ponudio dva moguća objašnjenja zajedničkog staništa dve vrste u JI Srbiji. Jedno objašnjenje bi bilo da je ono ostatak njihovog, nekada mnogo većeg, zajedničkog areala. Druga mogućnost je da se *R. nathaliae* tu doselila nakon Ledenog doba.

Međutim, STEVANOVIĆ ET AL. (1986B) iznose drugačiju i detaljniju hipotezu o nastanku ovih zajedničkih populacija. Naime, po njima dve vrste su se horološki i ekološki razdvojile još u vreme Tercijera kada su bile mnogo šire rasprostranjene nego što su danas. Za vreme Ledenog doba došlo je do smanjenja njihovih areala. Između ostalog, *R. nathaliae* se sa svog staništa na Suvoj planini spustila u niže delove Sićevačke i Jelašničke klisure. Mezofilnija *R. serbica* je za vreme Tercijera verovatno bila prisutna i severnije, pa su njena današnja staništa u SZ Bugarskoj i I Srbiji zapravo ostaci tih populacija. Ona se pod uticajem hladnije klime spustila južnije i došla u kontakt sa *R. nathaliae* u okolini Niša, a pomenuta dva jedina današnja simpatrijska

lokaliteta predstavljaju ostatak refugijalnih zajednica ove dve vrste iz vremena Ledenog doba.

Postoji još jedan lokalitet sa nesigurnim podacima o rasprostranjenju ove dve vrste. Naime, VOLIOTIS (1981) navodi ove dve vrste roda *Ramonda* za planinu Voras u Grčkoj. Autor, međutim, ne pruža podatke o tome da li je u pitanju simpatrija ili su populacije dve vrste tu razdvojene. Međutim, do danas za ovu planinu dokazano je samo prisustvo *R. nathaliae* i to na više lokaliteta. Ostalo je još uvek nerazjašnjeno da li se radilo o pogrešnoj determinaciji ili u nekom delu ove planine opstaje i *R. serbica* što je malo verovatno imajući u vidu rasprostranjenje i ekologiju ove vrste.

#### **1. 5. HIPOTEZE O POREKLU, ODNOSIMA I RASPROSTRANJENJU *R. nathaliae* I *R. serbica***

Prvu pretpostavku o poreklu vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica* daje KOŠANIN (1921). Po njemu, sposobnost evropskih ramondi da rastu na znatnoj visini ukazuje na to da su one potomci tercijskih planinskih formi, koje su mogle preživeti Ledeno doba povlačeći se sa planina u niske doline. Po njemu, nekada jedinstven areal vrste *R. serbica* smanjen je i isprekidan usled izmenjenih klimatskih prilika za vreme Ledenog doba. Nakon glacijacije, ova vrsta se nije mogla u potpunosti prilagoditi novonastalim klimatskim uslovima, tako da je ostala samo u zaklonjenim refugijalnim staništima i nije proširila teritoriju. S druge strane, na osnovu neprekidnog, relativno malog areala vrste *R. nathaliae*, Košanin zaključuje da je ova vrsta mlada i da nije imala dovoljno vremena da proširi svoj areal. Kako se ove dve vrste ne razlikuju u načinu rasejavanja, to, po njemu, potvrđuje da je veći areal *R. serbica* nego *R. nathaliae*, posledica duže starosti i veće rasprostranjenosti u tercijskoj prošlosti, a ne veće sposobnosti rasejavanja u recentno doba. Po KOŠANINU (1921) ili je *R. nathaliae* direktan potomak vrste *R. serbica* ili su obe nastale od zajedničkog pretka, koji je izumro, s tim što je *R. serbica* nastala znatno ranije.

GLIŠIĆ (1924) se oslonio na Košaninove pretpostavke i dao je dodatne argumente za veću starost vrste *R. serbica*. Broj arhesporijalnih ćelija je veći kod *R. serbica* i one imaju zajedničko i istovremeno razviće do stadijuma sinapsisa, dok je kod *R. nathaliae* prisutna samo jedna ovakva ćelija. Kako se veći broj ovih ćelija kod biljaka smatra kao dokaz njihove veće starosti, to bi se moglo zaključiti da je *R. serbica* starija vrsta. Osim toga, kao drugi dokaz za ovu tvrdnju, on navodi da ovulum vrste *R. serbica* ponekad dobija istovetan izgled kao kod *R. nathaliae*.

Kasnije su TATIĆ I STEFANOVIĆ (1976) upoređujući matične stene i zemljište sa nekoliko lokaliteta vrste *R. serbica* i jednog na kome raste *R. nathaliae* (klisura reke Topolke) zaključili, na osnovu toga što *R. serbica* nastanjuje geološki starije stene sa prisutnim tragovima fosilnih ostataka faune, da je *R. nathaliae* nastala kasnije.

Prvi koji su izneli drugačiju hipotezu bili su STEVANOVIĆ I STEVANOVIĆ (1985) koji su, analizirajući fitocenoze dve vrste, uočili da su zajednice koje formira *R. nathaliae* u ekološkom i geobotaničkom poreklu raznovrsnije, što može ukazivati ne samo na veću plastičnost ove vrste, već i na njenu veću starost u odnosu na *R. serbica*.

## 1. 6. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA VRSTA *R. nathaliae* I *R. serbica*

### 1. 6. 1. Fitocenološka istraživanja roda *Ramonda* na Balkanskom poluostrvu

Fitocenološkim istraživanjima dve balkanske vrste roda *Ramonda* bavilo se više istraživača sa ovih prostora. Zahvaljujući tim autorima danas imamo podatke o fitocenoza koje izgrađuju ove endemične vrste.

Vrsta *R. nathaliae* izgrađuje nekoliko različitih zajednica: *Erysimeto-Ramondaetum nathaliae* na Suvoj planini (JOVANOVIĆ-DUNJIĆ, 1952), *Asplenio cuneifolii-Ramondaetum nathaliae* na serpentinitima kod sela Raduša (STEVANOVIĆ & STEVANOVIĆ, 1985), *Viola kosaninii-Ramonda nathaliae* na Karadžici (HORVAT, 1935), *Campanula formanekiana-Ramonda nathaliae* na Nidžama (HORVAT, 1935) i Vermionu (QUEZEL, 1967), *Ceterachi-Ramondetum serbicae ramondetosum nathaliae* u

simpatrijskim populacijama na lokalitetima Oblik i Radovanski Kamen (STEVANOVIĆ ET AL., 1987). Sve ove zajednice su na krečnjačkoj podlozi, osim one kod sela Raduša koja se nalazi na serpentinitu. Nadmorske visine su od 450 – 1700 m, ekspozicije S, S-SZ, S-SI, a nagib terena od 20 - 90°. Zemljište je tipa crnice. U zajednicama preovlađuju hemikriptofite i hamefite i uglavnom se karakterišu submediteranskim, subendemičnim i endemičnim flornim elementima.

Zajednice koje izgrađuje vrsta *R. serbica* su: *Cetereto-Ramondietum serbicae* u Sićevačkoj i Jelašničkoj klisuri, kao i na Rtnju (JOVANOVIĆ-DUNJIĆ, 1952), *Hieracio-Ramondietum serbicae* na Rumiji (LAKUŠIĆ, 1968), *Silene schwarzenbergiana-Ramonda serbica* (QUEZEL, 1968) na severnom Pindu, *Musco-Valeriano tripterae-Ramondaetum serbicae* u klisuri Matos, *Musco-Saxifrago rotundifoliae-porophyllae-Ramondaetum serbicae* u klisuri Rusenice i Dušnice, *Musco-Saxifrago alpicolae-Ramondaetum serbicae* u klisuri Vrbičanske reke, *Cetero-Achilleo aizoonis-Ramondaetum serbicae* u Duvskoj klisuri (JANKOVIĆ & STEVANOVIĆ, 1981), *Ceterachi-Ramondetum serbicae ramondetosum nathaliae* u simpatrijskim populacijama na lokalitetima Oblik i Radovanski Kamen (STEVANOVIĆ ET AL., 1987), *Musco-Polypodio-Ramondaetum serbicae* u kanjonu Bukovičke reke i klisuri Crne reke, *Valeriano officinale-Galio-Ramondaetum serbicae* takođe u kanjonu Bukovičke reke (PETKOVIĆ ET AL., 1988), *Geranio-Ramondaetum serbicae* (STEVANOVIĆ & BULIĆ, 1992). Dijapazon nadmorskih visinau kojima su zabeležene ove zajednice su od 250 – 1300 m, ekspozicije S, S-SZ, S-SI i SZ-SI, a nagibi terena od 20 - 90°. Podloga je krečnjačka, a zemljište organomineralna crnica. I ovde preovlađuju hemikriptofite i hamefite, kao i balkanski i submediteranski florni elementi, ali u manjem procentu zastupljene su i srednjeevropske i subborealne vrste.

Kako je fitocenološki obrađen relativno ograničen broj lokaliteta koje ove vrste nastanjuju, naročito za vrstu *R. nathaliae*, otvoreno je jedno široko polje za ovaj tip istraživanja koja bi bila veoma značajna, pogotovo s obzirom na refugijalni karakter njihovih staništa.

### 1. 6. 2. Anatomska i ekofiziološka istraživanja roda *Ramonda*

Ekofiziološka istraživanja na vrstama roda *Ramonda* započela su sa otkrićem njihove poikilohidričnosti (ČERNJAVSKI, 1918). Međutim, prva detaljnija anatomska i ekofiziološka istraživanja na vrstama roda *Ramonda* obavio je KOŠANIN (1939), koji je ukazao na anatomske, fiziološke i ekološke razlike između dve vrste. Između ostalog, on je eksperimentima utvrdio da je u hidratisanom stanju *R. serbica* osetljivija na visoke temperature od *R. nathaliae*, kao i da se otpornost obe vrste povećava kada su u isušenom stanju. *Ramonda serbica* je više zastupljena na mestima koja su zaštićenija od direktnog Sunčevog zračenja, velikog kolebanja vlažnosti, ali i mraza, dok *R. nathaliae* preživljava i na osunčanijim mestima, ali i na velikim nadmorskim visinama gde je izložena intenzivnom dejstvu mraza. Već je Košanin uočio da biljke prilikom dehidracije gube i do 94,4% vode, ali i da, kada im je voda ponovo dostupna, veoma brzo potpuno povrate turgescenciju, za svega 24 - 30 časova. Istraživao je, takođe, razlike u anatomskim presecima svežih i suvih listova i uočio da u suvim listovima ovih biljaka nema skroba, već je došlo do njegovog pretvaranja u ulja koja se mogu uočiti kao zrnaste mase u ćelijama, što je potvrđeno i našim preliminarnim istraživanjima konfokalnom mikroskopijom.

Tek nakon skoro 50 godina, naučnici se ponovo vraćaju fiziološkim istraživanjima dve balkanske vrste roda *Ramonda*. Tako je istraživao uticaj svetlosti i hormona na klijanje semena vrste *R. serbica* (STEVANOVIĆ ET AL., 1986), a od sredine osamdesetih godina prof. Branka Stevanović sa svojim saradnicima počinje intenzivna anatomska, ekofiziološka i biohemijska istraživanja *R. nathaliae* i *R. serbica*. Prva terenska istraživanja ovih biljaka odnosila su se na anatomiju i vodni režim dve vrste, koja su pokazala da su dnevna i sezonska variranja intenziteta transpiracije, sadržaja vode u listovima i osmotskog pritiska mala i postepena, naročito kod vrste *R. nathaliae*. Listovi su im mezomorfni, naročito kod *R. serbica*, sa malo kseromorfni karakteristika (STEVANOVIĆ, 1986; STEVANOVIĆ, 1989-1991; STEVANOVIĆ & GLIŠIĆ, 1997).



Istraživanje sastava lipida i masnih kiselina u listovima u uslovima dehidracije i rehidracije ukazalo je na veću stabilnost lipida membrane kod *R. serbica*, kao i veću sposobnost ove vrste da obnovi sastav masnih kiselina nakon rehidracije (STEVANOVIĆ ET AL., 1992). Analize elektrolita kod dve vrste potvrdile su da je *R. serbica* nešto osetljivija na sušu od *R. nathaliae* (STEVANOVIĆ ET AL., 1996; STEVANOVIĆ ET AL., 1997/1998). Usledila su istraživanja trihoma na listovima *R. serbica* (GLIŠIĆ ET AL., 1997) i lamelarnih tela u hidratizanim ćelijama mezofila (STEVANOVIĆ & ŠERBAN, 1997). Analizama aktivnosti hlorofilaze i metabolizma hlorofila tokom dehidracije i rehidracije utvrđeno je da balkanske ramonde spadaju u homojohloriflne biljke (DRAŽIĆ ET AL., 1998; DRAŽIĆ ET AL., 1999). Usledio je niz istraživanja koja su obuhvatila fotohemijske aktivnosti fotosistema II, kao i ciklusa violaksantina (AUGUSTI ET AL., 2001) i lipidnog sastava plazma membrana tokom dehidracije i rehidracije kod *R. serbica* (QUARTACCI ET AL., 2002). Istraživanja uloge fenola u antioksidativnom sastavu ove vrste su pokazala da *R. serbica* ima veći sadržaj fenolnih kiselina u odnosu na druge biljke, a potvrdila su i da je prva faza rehidracije najstresnija za biljku (SGHERRI ET AL., 2004). Proučavani su i osmotsko prilagođavanje tokom dehidracije i rehidracije kod *R. serbica* (ŽIVKOVIĆ ET AL., 2005), aktivnosti antioksidativnih enzima kod iste vrste (VELJOVIĆ-JOVANOVIĆ ET AL., 2006), kao i antioksidativni sistem i sadržaj dehidrina kod *R. nathaliae* (JOVANOVIĆ ET AL., 2011). U novije vreme pažnja je posvećena i sadržaju isparljivih jedinjenja kod dve balkanske vrste roda *Ramonda* (RADULOVIĆ ET AL., 2009), kao i proučavanju osobina zemljišta i njegovog uticaja na mineralni sastav vrste *R. serbica*, pri čemu je otkriveno prisustvo mikorize na korenovima ove biljke (RAKIĆ ET AL., 2009).

Više autora objavilo je, takođe, protokole za dobijanje i gajenje *in vitro* kultura obe vrste (KONGJIKA ET AL., 2001; SABOVLJEVIĆ ET AL., 2008; DONTCHEVA ET AL., 2009; DASKALOVA ET AL., 2012), a i dodatna istraživanja ove problematike su u toku (RAQUIN, C., Univerzitet Paris-Sud, Orsay, Francuska).

### 1. 6. 3. Citološka istraživanja roda *Ramonda*

Prvi rezultati citoloških istraživanja roda *Ramonda* prikazani su u doktorskoj disertaciji GLIŠIĆA (1924). U svojoj tezi on detaljno predstavlja embriološko razviće dve balkanske vrste i u okviru toga daje prve brojeve hromozoma za *R. nathaliae* i *R. serbica*.

Za vrstu *R. nathaliae* GLIŠIĆ (1924) navodi da je haploidan broj hromozoma na posmatranim preparatima oko  $n = 18$ , uz opasku da je to broj hromozoma koji je najčešće dobijao. Materijal za ove analize uzet je od primeraka gajenih duže vreme u Botaničkoj bašti „Jevremovac“. Broj hromozoma u diploidnom jedru  $2n = 72$  kod *R. serbica* utvrđen je na materijalu sakupljenom u Sićevačkoj klisuri GLIŠIĆ (1924). On, takođe, primećuje da je ceo tok embrionalnog razvića kod *R. serbica* sporiji nego kod *R. nathaliae*, ali da su razlike u samom procesu neznatne.

Tek kasnije, RATTER (1963) i CONTANDRIOPOULOS (1966) na materijalu *R. nathaliae* poreklom sa Vermiona i iz klisure Vardara utvrđuju da je kod ove vrste  $2n = 48$  hromozoma. CONTANDRIOPOULOS (1966) analizira i materijal *R. serbica* iz klisure Vikosa i objavljuje da je  $2n = 96$  hromozoma.

### 1. 7. FAKTORI UGROŽAVANJA I MERE ZAŠTITE

U različitim delovima svog areala, *R. nathaliae* i *R. serbica* izložene su različitim opasnostima. Zato se navode različiti faktori njihovog ugrožavanja.

- 1) Narušavanje staništa usled klimatskih promena koje se ogledaju u promenama vodnog režima staništa, isušivanju manjih reka i potoka tokom leta (VLADIMIROV, 2011).
- 2) Ljudske aktivnosti koje rezultiraju u ruderalizaciji staništa (VLADIMIROV, 2011).
- 3) Mala veličina, fragmentisanost i izolovanost populacija (VLADIMIROV, 2011) mogao bi biti razlog smanjenja njihove brojnosti usled promena u staništima koja se, inače, odlikuju specifičnom kombinacijom ekoloških faktora.

- 4) Tome treba dodati da su ovo biljke koje se odlikuju sporim rastom, tako da im je potrebno više od 10 godina da od faze klijanca sazru u reproduktivne adulte.
- 5) Izgradnja brana u klisurama i kanjonima mogla bi biti jedan od najsnažnijih negativnih faktora koji bi doveo do iščezavanja znatnog dela populacija obe vrste (BILZ, 2011). Međutim, dosadašnji slučajevi izgradnje akumulacija u kanjonima, npr. HE Matka u kanjonu Treske i HE Tikveš na Crnoj reci, oba u Makedoniji, pokazuju da su populacije *R. nathaliae* iznad zone potapanja u obe akumulacije veoma brojne. Svakako da je znatan deo populacija uništen potapanjem, ali u delu koji je iznad današnjeg nivoa akumulacija one su i dalje veoma brojne i uspešno se obnavljaju. Moguće je i to da su izgradnjom akumulacije poboljšani uslovi vazdušne vlage u takvim klisurama i kanjonima što, nema sumnje, pogoduje ovim osetljivim biljkama. Međutim, poznajući visinsku distribuciju obe vrste u određenim klisurama i kanjonima (Zlotska klisura, Jelašnička klisura, Prizrenska Bistrica, Rugovska klisura, itd.), njihovim eventualnim potapanjem uništio bi se najveći procenat populacija. Ovo se ne odnosi samo na velike akumulacije već, štaviše, na mikroakumulacije koje se planiraju na mnogim mestima, uključujući i ona na kojima žive obe vrste roda *Ramonda*.
- 6) sakupljanje biljaka u naučne ili hortikulturne svrhe svako je jedan od potencijalno snažnih ugrožavajućih faktora, pogotovu ako je nekontrolisano (BILZ, 2011). Posebno su osetljive simpatričke populacije, jer se sakupljanjem jedne ili druge vrste remeti interpopulacioni odnos i raspored obe vrste.

Opšte uzev, populacije obe vrste uglavnom su stabilne, jer obično imaju znatan broj jedinki koje često rastu na nepristupačnim mestima. Izuzetak su populacije vrste *R. serbica* u Bugarskoj koje su izrazito fragmentisane i broje svega od nekoliko desetina do nekoliko stotina individua (BILZ, 2011).

Po IUCN Crvenoj listi ugroženih vrsta, *R. serbica* verovatno zaslužuje kategoriju ranjive u većini država. No, s obzirom da je broj lokaliteta veći od 10 i da nije jasno u kojoj meri su populacije fragmentisane, zvanično je svrstana u kategoriju

vrsta koje ne zahtevaju posebnu brigu (LEAST CONCERN – LC) (BILZ, 2011). Rizik iščezavanja vrste je mali, ali je, ipak, neophodno preduzeti adekvatne mere zaštite.

Vrsta *R. serbica* zaštićena je Bernskom konvencijom. U pojedinačnim državama, u Albaniji, Grčkoj i Srbiji se vodi kao ranjiva (VU), u Bugarskoj kao ugrožena (EN), dok je u Crnoj Gori zaštićena zakonom. *Ramonda nathaliae* je, takođe, zaštićena zakonom u Grčkoj i Srbiji. U Makedoniji, za sad, nisu zaštićene ni jedna ni druga vrsta. Ono što ide u korist ramondama na Balkanskom poluostrvu je što se lokaliteti koje naseljavaju uglavnom nalaze u područjima koja su pod različitim stepenom zaštite.

Predložene mere zaštite obuhvataju:

- 1) tačnu procenu veličine populacija i površine koju zauzimaju;
- 2) zaštitu pojedinih lokaliteta, osobito onih koji su od posebne važnosti za naučna istraživanja (npr. simaptričke populacije);
- 3) obnavljanje i pojačavanje malih i prostorno ograničenih populacija zasejavanjem sakupljenog semena *in situ* u mahovinama i na pogodnim nanostaništima, budući da najveći deo semena biva spran vodom sa stena;
- 4) monitoring brojnosti i uzrasne strukture izabраниh populacija;
- 5) čuvanje semena u Nacionalnoj banci semena;
- 6) *ex situ* konzervaciju, posebno ako se ima u vidu da je moguća uspešna propagacija individua iz kulture tkiva.

## 2. CILJEVI

Predmet ove doktorske disertacije su palinološki, citogenetički i molekularni metodi istraživanja koji do sada nisu primenjeni na vrstama roda *Ramonda* sa Balkanskog poluostrva.

Iz tih razloga, ciljevi ove doktorske disertacije su sledeći:

- utvrđivanje i analiza morfoloških karakteristika polena i semena vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica* uz poređenje sa pirinejskim srodnikom *R. myconi*, pomoću svetlosnog i scanning elektronskog mikroskopa,
- određivanje vijabilnosti polena Aleksandrovim reagensom,
- procena klijavosti semena tri vrste,
- utvrđivanje broja hromozoma standardnim kariološkim tehnikama,
- određivanje veličine genoma protočnom citometrijom kod što većeg broja populacija obe vrste,
- proveravanje eventualnog postojanja hibridnih jedinki analizom polena, semena, broja hromozoma i veličine genoma kod što većeg broja individua u simpatrijskim populacijama,
- utvrđivanje stepena sličnosti i filogeografskih veza između dve vrste pomoću molekularnih markera (AFLP).

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3. 1. BILJNI MATERIJAL**

Biljni materijal sakupljan je u period od 2005. do 2008. godine, ali iz pojedinih populacija i kasnije, sve do 2011. godine. Sakupljanja su obavljena sa velikog broja lokaliteta širom Balkanskog poluostrva kako bi se pokrili što veći delovi areala obe balkanske vrste roda *Ramonda*. Tako su sakupljene biljke iz Srbije, Makedonije, Crne Gore, Bugarske, Grčke i Albanije. Zahvaljujući kolegama iz Španije, dobijen je i materijal iz nekoliko populacija vrste *R. myconi*. Kako bi bilo moguće poređenje broja hromozoma i veličine genoma kod vrsta roda *Ramonda* sa druga dva roda iz familije Gesneriaceae u Evropi, korišćene su jedinke *H. rhodopensis* iz Botaničke bašte „Jevremovac“ i listovi iz jedne populacije vrste *J. heldreichii* sa planine Olimp u Grčkoj.

Materijal za pojedinačne analize uzorkovan je na sledeći način. Za analizu polena i semena uzimani su cvetovi i potpuno zreli plodovi sa po 5-10 individua po populaciji. Iz pojedinih populacija, uzeto je 2-5 biljaka koje su, zatim, posađene u Institut za botaniku i Botaničku baštu „Jevremovac“ kako bi se odredio broj hromozoma. Za tečnu citometriju uziman je po 1 svež list sa po 5-10 individua po populaciji. Samo u retkim slučajevima uzorkovani su listovi sa manjeg broja individua. S druge strane, u simpatrijskim populacijama ovom analizom je obuhvaćen znatno veći broj individua, od 45 do, čak, 119. Za molekularne analize 1-2 lista sa 8-30 individua po populaciji stavljan je odmah u zip-kesice sa silika-gelom kako bi se materijal osušio uz što manja oštećenja DNK. Materijal je uziman na način koji ne ugrožava opstanak populacija.

Herbarijumski primerci iz proučavanih populacija zavedeni pod jedinstvenim herbarijumskim brojevima (vaučer) čuvaju se u Herbarijumu Instituta za botaniku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (BEOU, HOLMGREN ET AL., 1990). U tabeli 3 dat je detaljan pregled populacija iz kojih je sakupljen materijal, kao i tip analiza kojima je svaka od njih obuhvaćena.

**Tabela 3.** Spisak taksona i populacija roda *Ramonda* obuhvaćenih određenim istraživanjima. Broj 1 u odgovarajućoj koloni označava da su jedinke iz te populacije korišćene za određenu analizu.

Takson	Država	Lokalitet	Geografska širina	Geografska dužina	Nadmorska visina (m)	Tip podloge	Vaučer broj (BEOU)	2n	2C	polen	seme	AFLP
<i>R. myconi</i>	Španija	Katalonija, Girona, Camprodon, staza ka Sv. Antonu	N 42°19'0.1''	E 2°22'0.1''	1000	krečnjak	177a*	1	1			
<i>R. myconi</i>	Španija	Katalonija, između Barruera i Duro, blizu vodopada	N 42°30'25.85"	E 2°48'51.07"	1150	krečnjak	288 (BCN)		1			
<i>R. myconi</i>	Španija	Katalonija, između Gerri de la Sal i Enseu	N 42°19'19.34"	E 1°49'10"	620	krečnjak	285 (BCN)		1	1	1	
<i>R. myconi</i>	Španija	Katalonija, između Martinet de Cerdanya i Bastanist	N 42°21'46.81"	E 1°42'26.01"	980	krečnjak	283 (BCN)		1			
<i>R. myconi</i>	Španija	Katalonija, put od Rialb ka Queralbs	N 42°18'52"	E 2°12'40"	1200	krečnjak	290 (BCN)		1			
<i>R. nathaliae</i>	Grčka	Vermion, klisura blizu sela Sella zapadno od Naoussa	N 40°35'5.4''	E 22°1'28.5''	1000	krečnjak	20624	1	1			1
<i>R. nathaliae</i>	Makedonija	Klisura reke Vardar blizu Demir Kapije	N 41°24'32.8''	E 22°15'42.1''	163	krečnjak	31671					1
<i>R. nathaliae</i>	Makedonija	Katlanovska banja	N 41°53'48.5''	E 21°41'40.2''	223.7	krečnjak			1			
<i>R. nathaliae</i>	Makedonija	Klisura reke Raec, kod Kavadaraca, kod tunela	N 41°26'14.1''	E 21°49'6.3''	295.7	krečnjak			1			
<i>R. nathaliae</i>	Makedonija	Klisura Vardara, na zidu pored puta kod Velesa	N 41°41'15.2''	E 21°47'56.3''	165.8	krečnjak	33186		1	1	1	
<i>R. nathaliae</i>	Makedonija	Klisura Vardara, pre ušća reke Topolke, 2 km od Velesa	N 41°42'16.02''	E 21°47'12.91''	173	krečnjak			1			
<i>R. nathaliae</i>	Makedonija	Matka	N 41°57'9.6''	E 21°17'51.5''	311.5	krečnjak	31669		1			1
<i>R. nathaliae</i>	Makedonija	Taorska klisura, klisura reke Pčinje blizu sela Katlanovo	N 41°52'30.5''	E 21°42'54.8''	405	serpentin	20962		1			
<i>R. nathaliae</i>	Makedonija	Taorska klisura, klisura reke Pčinje, na putu ka Velesu	N 41°49'18.9''	E 21°41'4.4''	266.1	serpentin	31670	1	1	1	1	1
<i>R. nathaliae</i>	Makedonija	Karadžica	N 41°45'0.01''	E 21°19'59.99''	2000	krečnjak			1			
<i>R. nathaliae</i>	Kosovo*	Šar planina, klisura reke Gotovuše	N 42°13'59''	E 21°4'58.4''	1050	krečnjak	21843		1			
<i>R. nathaliae</i>	Srbija	Selo Divljana, kod Bele Palanke	N 43°10'19.3''	E 22°18'10''	346.6	krečnjak	20638	1	1	1	1	
<i>R. nathaliae</i>	Srbija	Klisura reke Nišave u blizini sela Ostrovice, Oblik	N 43°19'49.3''	E 22°8'50''	391.4	krečnjak	20636		1			
<i>R. nathaliae</i>	Srbija	Klisura reke Nišave u blizini sela Ostrovice, Oblik	N 43°19'47.4''	E 22°8'44.9''	418.2	krečnjak	20637		1	1	1	

<i>R. nathaliae</i>	Srbija	Radovanski Kamen iznad sela Čukljenik	N 43°17'1.2''	E 22°4'23.5''	576.7	krečnjak	20641	1	1	1	1
<i>R. nathaliae</i>	Srbija	Suva planina	N 43°11'6.8''	E 22°10'0.7''	1750	krečnjak	20019		1		1
<i>R. serbica</i>	Albanija	Krujë	N 41°30'24.94''	E 19°47'37.57''	565	krečnjak			1		
<i>R. serbica</i>	Grčka	Timfi, klisura Vikos, blizu sela Vikos	N 40°0'0'	E 20°54'39.6''	650	krečnjak	20629	1	1	1	1
<i>R. serbica</i>	Crna Gora	Klisura reke Cijevne u blizini sela Šumice	N 42°25'22.3''	E 19°27'48.4''	350	krečnjak	776/90	1	1		
<i>R. serbica</i>	Crna Gora	Klisura rečice Kroni e Murici, blizu sela Murići	N 42°8'32.5''	E 19°13'9.9''	420	krečnjak	19673	1	1		1
<i>R. serbica</i>	Crna Gora	Klisura rečice Kroni e Besit, blizu sela Murići	N 42°9'19.7''	E 19°12'48.4''	250	krečnjak	9880	1	1		1
<i>R. serbica</i>	Makedonija	Barička klisura, klisura reke Radika	N 41°39'57.1''	E 20°37'3.6''	800	krečnjak			1		1
<i>R. serbica</i>	Makedonija	Klisura Crnog Drima, kod sela Lukovo	N 41°22'11.1''	E 20°35'57.6''	620	krečnjak			1		1
<i>R. serbica</i>	Kosovo*	Klisura Prizrenske Bistrice blizu sela Sredska	N 42°12'0.75"	E 20°45'45.50"	550	krečnjak	2910	1	1		
<i>R. serbica</i>	Srbija	Čiflik	N 43°13'3''	E 22°25'6.2''	370	krečnjak	31676	1	1		1
<i>R. serbica</i>	Srbija	Jelašnička klisura, Potkapine	N 43°16'56.2''	E 22°3'47.1''	290	krečnjak	10944	1	1	1	1
<i>R. serbica</i>	Srbija	Kanjon Crne reke, kod Ribarića	N 42°56'46.3''	E 20°28'9.7''	1100	krečnjak	20623	1	1		
<i>R. serbica</i>	Srbija	Kanjon Lazareve reke, Kotlovi	N 44°1'38.1''	E 21°57'16.2''	310	krečnjak	20665		1		1
<i>R. serbica</i>	Srbija	Klisura Mojstirske suhovare	N 42°55'39.6''	E 20°25'58.4''	920	krečnjak	31675		1		1
<i>R. serbica</i>	Srbija	Klisura reke Godulje	N 42°55'27.4''	E 20°20'0.4''	750	krečnjak	31677		1	1	1
<i>R. serbica</i>	Srbija	Klisura reke Nišave u blizini sela Ostrovice, Oblik	N 43°19'52''	E 22°8'43.3''	279.8	krečnjak	20634		1		
<i>R. serbica</i>	Srbija	Klisura reke Nišave u blizini sela Ostrovice, Oblik	N 43°19'49.3''	E 22°8'50''	391.4	krečnjak	20635		1		
<i>R. serbica</i>	Srbija	Klisura reke Nišave u blizini sela Ostrovice, Oblik	N 43°19'47.4''	E 22°8'44.9''	418.2	krečnjak	20636		1	1	1
<i>R. serbica</i>	Srbija	Radovanski Kamen iznad sela Čukljenik	N 43°17'5.1''	E 22°4'16.6''	574.5	krečnjak	20640	1	1	1	1
<i>R. serbica</i>	Srbija	Radovanski Kamen iznad sela Čukljenik	N 43°17'4.5''	E 22°4'29.2''	564	krečnjak	31672		1		1
<i>R. serbica</i>	Srbija	Rtanj, Baba	N 43°45'44.2''	E 21°55'53''	1000	krečnjak	31673		1		1
<i>R. serbica</i>	Srbija	Sićevačka klisura, kod visećeg mosta	N 43°18'38.1''	E 22°10'53.3''	308.5	krečnjak	20639	1	1		
<i>R. nathaliae</i> <i>x R. serbica</i>	Srbija	Klisura reke Nišave u blizini sela Ostrovice, Oblik	N 43°19'47.4''	E 22°8'44.9''	418.2	krečnjak	20636	1	1	1	1
<i>R. nathaliae</i> <i>x R. serbica</i>	Srbija	Radovanski Kamen iznad sela Čukljenik	N 43°17'5.1''	E 22°4'16.6''	574.5	krečnjak	20640	1	1	1	1



### **3. 2. KARTE RASPROSTRANJENJA**

Rasprostranjenje celog roda *Ramonda* kartirano je pomoću UTM mreže 50 x 50 km, kao što je praksa u Atlasu Flore Evrope (KURTO ET AL., 2004).

Vektorske karte na kojima je prikazano rasprostranjenje vrsta na istraživanom području urađene su pomoću programa *Manifold System 5.50 Professional Edition* (Manifold System, CDA International LTD).

### **3. 3. BROJ HROMOZOMA**

Hromozomi su brojani u mitozu iz apikalnog meristema korenčića biljaka koje su gajene u saksijama ili kamenjaru Botaničke bašte Jevremovac. Korenčići su pretretirani 0.002 M 8-hidroksikinolinom tokom 4h 30 min na 16°C. Fiksacija je izvršena u Carnoy I fiksativu (apsolutni akohol/glacijalna sirćetna kiselina = 3:1) na 4°C u trajanju od 24-48 sati, a konzervacija u 70% alkoholu na 4°C. Nakon hidrolize u 1N HCl tokom 14 min. na 60°C i bojenja Schiff-ovim reagensom po standardnoj proceduri (FEULGEN & ROSSENBECK, 1924), meristemi su izdrobljeni u nekoliko kapi aceto-karmina. Stalni preparati napravljeni su tako što su pokrovna stakalca otklonjena, nakon zamrzavanja od 24h na -80°C. Preparat je zatim ostavljen da se osuši bar 24h na sobnoj temperaturi i potom je ukalupljen u Euparal.

Hromozomi su posmatrani pod Zeiss Axiophot mikroskopom i slikani pomoću CCD kamere (Princeton Instruments, Evry, Francuska) i programa Metavue (u laboratoriji Univerziteta Paris-Sud, Laboratoire Ecologie, Systématique, Evolution, UMR 8079, CNRS-UPS-AgroParisTech, Orsay, Francuska), kao i pod Leica DMLS svetlosnim mikroskopom sa kamerom DFC295 (Institut za botaniku i Botanička bašta „Jevremovac“, Univerzitet u Beogradu). Broj hromozoma određivan je na osnovu bar 5 jedinki po populaciji i iz oko 25 metafaznih figura po meristemu korena.

### **3. 4. MERENJE VELIČINE GENOMA I ODREĐIVANJE NUKLEOTIDNOG SASTAVA DNK POMOĆU TEČNE CITOMETRIJE**

Ukupna količina DNK određena je metodom tečne citometrije po MARIE AND BROWN (1993). Kao standardi korišćeni su *Pisum sativum* cv. Long Express (Truffaut SA) (2C = 8.37 pg; 40.5% GC) i *Lycopersicon esculentum* cv. Roma (2C = 1.99 pg, 40.0% GC, MARIE AND BROWN, 1993). Deo lista proučavane vrste isecka se sa delom lista standarda u Petri posudi sa 600 µL pufera za izolaciju jedara (GALBRAITH ET AL., 1983) sa dodatkom 10mM natrijum metabisulfata i 1% polivinilpirolidona 10,000. Dobijena suspenzija se procedi kroz najlonski filter sa veličinom okaca od 48 µm. Jedra se, nakon delovanja RNAazom (2.5 U/mL) na 4°C, boje pomoću 50 µg/mL propidium jodida, specifičnim interkalarnim fluorohromom za DNK.

Sastav nukleotidnih baza određen je u dve odvojene analize. Prvo je ustanovljena zastupljenost adenina (A) i timina (T) pomoću fluorohroma bisbenzimida Hoechst 33342 (5 µg/mL, Aldrich). U drugoj analizi korišćen je fluorohrom mitramicin (50 µg/mL) za određivanje zastupljenosti guanina (G) i citozina (C). U ovom slučaju, pre merenja neophodna je inkubacija uzorka od 20 min. Sastav nukleotidnih baza, određen kao procenat zastupljenosti GC, izračunat je na osnovu nelineranog modela po GODELLE ET AL. (1993).

Količina DNK u 5000-10000 obojenih nukleusa merena je na jednom od dva aparata: Elite ESP protočnom citometru (Beckman-Coulter, Roissy, France) sa vodom hladenim argonskim laserom ili Partec CyFlow 532 nm laserskom citometru. Paralelna merenja uzoraka potvrdila su da aparati daju iste vrednosti veličine genoma. Ukupna 2C DNK vrednost izračunata je preko linearne zavisnosti između fluorescentnog signala obojenih nukleusa nepoznatog primerka i poznatog standarda.

Sve pomenute analize metodom tečne citometrije urađene su u laboratoriji Service de Cytométrie en Flux, Dynamique de la Compartimentation Cellulaire, Institut des Sciences du Végétal (ISV), Gif-sur-Yvette, Francuska.

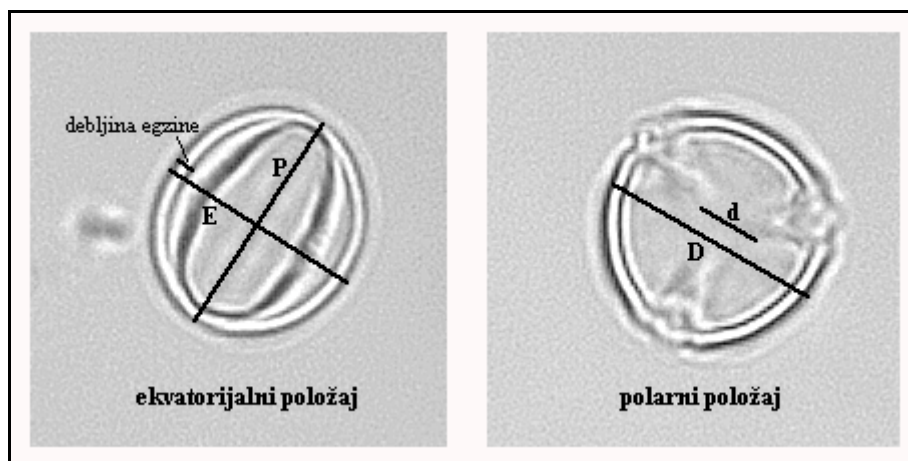
### **3. 5. MORFOLOGIJA I VIJABILNOST POLENA**

Cvetovi su sakupljeni u fazi punog cvetanja, kako bi se proučavali detalji morfologije i vijabilnost polena. Acetoliza polena urađena je po metodi ERDTMAN-A (1952) na sledeći način. Nekoliko prašnika se u epruveti malo izgnječi staklenim ili metalnim štapićem. Doda se oko 4 ml mešavine koja se sastoji od 9 delova anhidrida sirćetne kiseline i 1 dela sumporne kiseline i promeša se. Zatim se epruvete stavljaju u vodeno kupatilo na sobnoj temperaturi i zagrevaju do ključanja uz povremeno mešanje. Kada se postigne temperatura ključanja, ostavljaju se još 1 minut, a zatim se prebacuju da se ohlade 5 – 10 min. Nakon toga vrši se centrifugiranje 10 min. na 1000 obrtaja/minuti. Supernatant se odlije i zameni glacijalnom sirćetnom kiselinom u kojoj se polen ostavlja 15-30 min. Ponovo se vrši centrifugiranje, nakon čega se kiselina zameni destilovanom vodom u kojoj se polen ostavlja 10 min. Ovaj korak se ponovi 2 puta. Još jednom se vrši centrifugiranje kako bi se voda zamenila mešavinom vode i glicerina u odnosu 1:1 u kojoj polen miruje minimum 30 min.. Nakon toga, okrenute epruvete se ostave na filter papiru minimalno 30 min. kako bi se mešavina vode i glicerina što bolje eliminisala. Polen se, potom, nanosi na mikroskopsku pločicu i uklapa u glicerinskom želatinu.

Kako bi se acetolizirani polen posmatrao i na scanning elektronskom mikroskopu (SEM), za svaku istraživanu populaciju urađena je i acetoliza prilagođena SEM-u. Kod ovih uzoraka prethodno opisana acetoliza je zaustavljena nakon odlivanja sirćetne kiseline. Polenova zrna se ispiraju u apsolutnom alkoholu uz blago mešanje. Zatim se materijal centrifugira i polen ostavi na dnu, u malo alkohola. Materijal se nanosi kap po kap na okrugla pokrovna stakalca i posmatrati na SEM-u.

Merenja 50 polenovih zrna po populaciji su vršena na svetlosnom mikroskopu Leica DMLS. Ispitivani su sledeći karakteri: dužina polarne (P) i ekvatorijalne (E) ose, odnos P/E, debljina egzine (u ekvatorijalnom položaju), rastojanje između vrhova dve pore (d), dužina ekvatorijalne ose u polarnom položaju zrna (D) i indeks apocolpiuma ili polarne regije (d/D) (Sl. 8). Sva merenja su urađena pod uveličanjem od 40×. Merena su

samo pravilno građena polenova zrna. Klase polenovih zrna po obliku određene su na osnovu P/E odnosa prema klasifikaciji ERDTMANA (1943).



**Slika 8.** Šematski prikaz merenih karaktera polenovih zrna.

Za posmatranja na SEM-u, pokrovna stakalca na koja su nanešena acetolizirana polenova zrna su stavljena na aluminijumske nosače. Nakon uparivanja čistim zlatom u trajanju od 100 sec strujom od 20mA u uređaju BAL-TEC SCD 005 Sputter Coater, polenova zrna su posmatrana na scanning elektronskim mikroskopima JEOL JSM-6460LV sa naponom ubrzanja od 25kV (Univerzitetski centar za elektronsku mikroskopiju u Novom Sadu, UCEM-NS) i JEOL JSM-6390 na 13kV (Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu). Na ovim snimcima bilo je moguće proučavanje mikromorfoloških detalja egzine polenovih zrna, kao i brojanje i merenje lumena i debljine njihovih zidova u polarnoj i ekvatorijalnoj regiji. Prilikom opisivanja polenovih zrna korišćena je terminologija po PUNT ET AL. (2007) i HESSE ET AL. (2009).

Vijabilnost polenovih zrna testirana je na najmanje 10 individua po populaciji diferencijanim bojenjem Aleksandrovim reagensom (ALEXANDER, 1969) koji normalna zrna boji crveno zbog prisustva citoplazme, a abortirana zeleno jer je prisutna samo egzina.

### **3. 6. MORFOLOGIJA, KLIJAVOSTI I MASA SEMENA**

Semena su sakupljana u fazi pune zrelosti plodova kada su čaure već same popucale. Dužina i širina 50 semena po populaciji merena je na svetlosnom mikroskopu Leica DMLS pod uveličanjem 5×. Samo za hibridne individue mereno je 50 semena po individui, a sa 10 individua po populaciji.

Za posmatranja na SEM-u, semena su uparena čistim zlatom u trajanju od 100 sec strujom od 20mA u uređaju BAL-TEC SCD 005 Sputter Coater i zatim posmatrana na JEOL JSM-6460LV elektronskom mikroskopu na 25kV (Univerzitetski centar za elektronsku mikroskopiju u Novom Sadu, UCEM-NS). Na ovim semenima posmatrani su detalji građe površine semena i merena je maksimalna dužina 10 najširih poligona i njihovih zidova. Prilikom opisivanja semena korišćena je terminologija po BARTHLOTT (1981), BEAUFORT-MURPHY (1983) i WEBER (2004).

Kako su semena veoma sitna i lagana, merenje njihove mase vršeno je na elektronskoj vagi, tako što je merena masa po 100 semena u 5 ponavljanja, a zatim je računata prosečna masa jednog semena.

Za određivanje klijavosti, 100 semena po populaciji stavljeno je na vlažan filter papir u Petri kutije na temperaturi od 25°C. Posle 21 dana zabeležen je broj iskljalih semena.

### **3. 7. AFLP**

AFLP (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism) tehnika je zasnovana na selektivnom PCR umnožavanju restriktivnih fragmenata iz ukupne izolovane DNK. Tehnika se sastoji od nekoliko koraka (Sl. 9).

- (1) Prvo se vrši digestija, tj. restrikcija DNK pomoću dve endonukleaze (EcoRI i TruI).
- (2) Sledi ligacija dvolančanih oligonukleotidnih adaptera na restrikcijom nastale krajeve.

(3) Zatim se vrši preselektivno umnožavanje prajmerima sa dodatom jednom selektivnom bazom. Na taj način se eksponencijalno umnožavaju samo fragmenti koji adaptore imaju vezane na oba kraja i fragmenti koji nakon ligacije započinju tačno određenom selektivnom nukleotidnom bazom, a eliminišu se oni koji se umnožavaju linearno i imaju adapter vezan samo za jedan kraj.

(4) Pročišćeni uzorak prolazi kroz selektivno umnožavanje restrikcionihih fragmenata obeleženih fluorescentnim bojama, koje omogućavaju njihovu kasniju detekciju i razlikovanje na automatskom sekvenceru.

Prednost ove metode je mogućnost istovremenog umnožavanja velikog broja restrikcionihih fragmenata bez prethodnog poznavanja nukleotidnih sekvenci uzorka.

### **3. 7. 1. Sakupljanje materijala i ekstrakcija DNK**

Za AFLP analizu sakupljeni su listovi sa 16 do 28 individua po populaciji. Samo za dve populacije sakupljeni su listovi sa manjeg broja individua, jer su biljke već počele da ulaze u anabiozu i bilo je teško pronaći zelene primerke. To su populacije na planini Rtanj (8 individua) i iz klisure reke Godulje (5 individua). Listovi su stavljeni u zip-kesice sa silika-gelom kako bi se što brže sasušili uz minimalna oštećenja DNK. Individue sa kojih su uzimani listovi birane su tako da budu što udaljenije jedna od druge kako bi se izbegla mogućnost uključivanja u analizu jedinki koje su nastale jedna od druge vegetativnim razmnožavanjem (klonovi).

Ekstrakcija DNK vršena je iz delova osušenih listova teških 21 do 26 mg pomoću kompleta za ekstrakciju NucleoSpin®96 Plant Macherey-Nagel po uputstvu proizvođača. Kvalitet i kvantitet ekstrahovane DNK provereni su na dva načina: elektroforezom na agaroznom gelu i direktnim merenjem koncentracije izolovane DNK korišćenjem spektrofotometra NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Za dalju analizu korišćeni su uzorci samo onih individua od kojih je dobijeno više od 6 ng/μl ekstrahovane DNK.

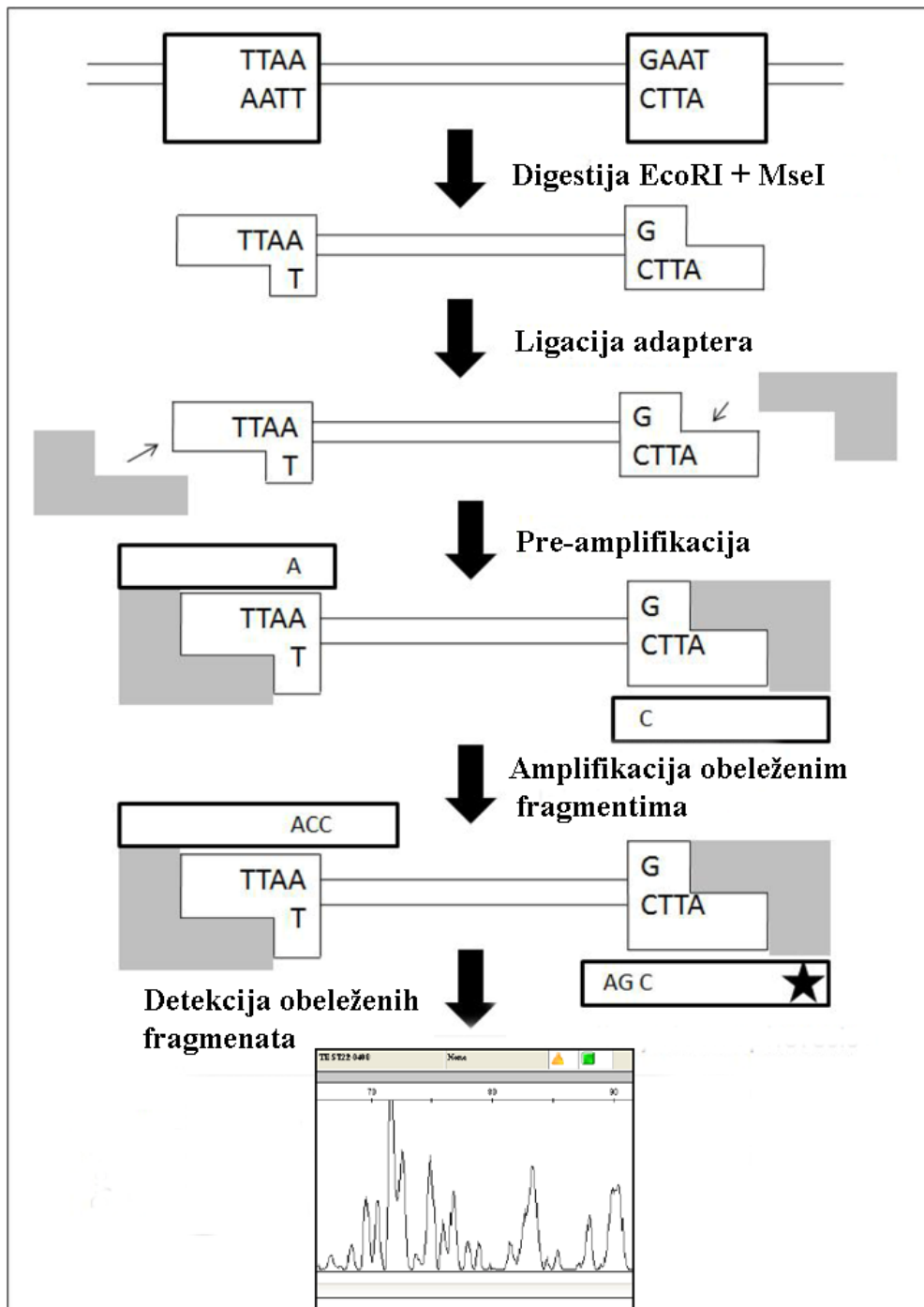
### **3. 7. 2. AFLP fingerprinting**

AFLP analiza urađena je po protokolu VOS ET AL. (1995) sa malim modifikacijama.

(1) Digestija je urađena na 100 ng DNK svake individue u rastvoru enzima koji je sadržao 5U restrikcionog enzima EcoRI (10 U/μl), 5U enzima TruII (10 U/μl) i 2.5 μl ligaznog pufera (10x), dopunjeno vodom do konačne zapremine od 25 μl. Nakon inkubacije u trajanju od 2h 30 min na 37°C, dalja aktivnost enzima je onemogućena delovanjem temperature od 70°C tokom 20 min. Nakon toga, proizvod digestije je stavljen na -20°C gde je čuvan dok se priprema mešavina za ligaciju.

(2) Ligacija je obavljena u konačnoj zapremini od 50 μl koja se sastojala od 25 μl proizvoda digestije, 2.5 μl ligaznog pufera (10X), 1 μl T4 DNA ligaze (1 U/μl; MBI Fermentas) i adaptera (po 1μl adaptera EcoRI (5 μM, 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'; 5 μM, 3'-CTGACGCATCGTTAA-5'), po 1 μl adaptera TruII (50 μM, 5'-CAGGATGAGTCCTGA G-3'; 50 μM, 3'-TACTCAGGACTCAT-5'), a do finalne zapremine dopunjeno vodom. Inkubacija je trajala 2h 30 min na 20°C. Proizvod ligacije razblažen je 10 puta sterilisanom vodom i stavljen je u zamrzivač na -20°C. Digestija i ligacija svih uzoraka urađena je odjednom, u toku jedne procedure.

(3) Pre-amplifikacija proizvoda ligacije urađena je pomoću prajmera komplementarnih adapterima koji imaju još jednu dodatnu bazu na 3' kraju. Konačna zapremina ove mešavine je 50 μl po individui, a sadržala je: 5 μl proizvoda ligacije 10 x rastvorenog, 5 μl pufera (10 X) bez MgCl<sub>2</sub>, 5 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 4 μl dNTPs (2.5 mM svaki), 1 μl prajmera EcoRI (10 μM, 5'-ACTGCGTACCAATTC-3'), 1 μl prajmera TruII (10 μM, 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'), 1 μl Taq polymerase (5U/μl; MP Biomedicals, QBiogene, France) i sterilisane vode. PCR program se sastojao iz tri faze: denaturacije na 94°C u trajanju od 30 sec, prijanjanja na 56°C tokom 1 min i elongacije na 72°C tokom 1 min. Ove 3 faze su ponovljene u 20 ciklusa. Da bi se proverio kvalitet pre-amplifikacije, testirana je migracija 9 μl nekoliko nasumično izabranih uzoraka na 2% agaroznom gelu tokom 1h na 100 V. Proizvodi pre-amplifikacije su, zatim, rastvoreni 10 puta destilovanom vodom i stavljeni u zamrzivač na -20°C.



Slika 9. Šematski prikaz AFLP tehnike (preuzeto i prerađeno iz ARIF ET AL., 2010).



(4) Ukupno 8 parova prajmera je testirano na nekoliko individua, da bi na kraju bila izabrana 3 para koja su dala najbolje profile i koja su korišćena za dalje analize. Izabrani parovi su sledeći (fluorescentne boje kojima su obeleženi su navedene u zagradama): EcoRI-AAC/MseI-CTC (**FAM**), EcoRI-ACA/MseI-CTC (**NED**), EcoRI-CAG/MseI-CTC (**VIC**).

Konačna zapremina mešavine za amplifikaciju od 25  $\mu$ l sadržala je: 4  $\mu$ l proizvoda pre-amplifikacije rastvorenog 10 x u sterilisanoj vodi, 2.5  $\mu$ l pufera (10 X) bez  $MgCl_2$ , 2.5  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM), 2  $\mu$ l dNTPs (2.5 mM svaki), 0.5  $\mu$ l fluorescentno obeleženog prajmera EcoRI (10  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ l prajmera MseI (10  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ l Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l; MP Biomedicals, QBiogene, France) i vode. PCR program počinje sa “touch down-om” od 65 do 56°C, koji se sastoji od: denaturacije na 94°C tokom 1 min, prijanjanja na 65°C (1°C niže u svakom ciklusu) tokom 1 min i elongacije na 72°C u trajanju od 1 min 30 sec, u okviru ukupno 10 ciklusa. Program se završava sa 23 ciklusa koja obuhvataju 3 faze: denaturaciju na 94°C tokom 30 sec, prijanjanje na 56°C tokom 30 sec i elongaciju na 72°C tokom 1 min. Proizvodi amplifikacije su, potom, do daljeg čuvani u zamrzivaču na -20°C.

(5) 3  $\mu$ l proizvoda amplifikacije je rastvoreno u 190  $\mu$ l vode. 3  $\mu$ l ovog rastvora je onda dodato u 5  $\mu$ l formamida sa markerom molekularne težine GeneScan 500LIZ® standard size (Applied Biosystems). Uzorci su denaturisani 3 min na 95°C i stavljeni na led pre sekvencioniranja. Umnoženi fragmenti su detektovani pomoću sekvencera ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) i analizirani programom GENESCAN 1.1 (Applied Biosystems). Rezultati detekcije svakog para selektivnih prajmera za svaku istraživanu jedinku predstavljeni su graficima detektovanih fragmenata (.fsa file format). Grafici su pretvoreni u binarnu tablicu pomoću programa GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems) gde je svaki od njih dobio oznaku 1 za prisutan i 0 za odsutan. Polazne postavke u „Analysis Method Editor-u“ bile su: Analysis Range 50 End 500 (dakle, analizirani su fragmenti od 50 do 500 bp), dok je vrednost minimalne visine analiziranog pika (Edit Labels Tresholds) bila podešena na 30. Svaki pojedinačni pik svake israživane individue proveren je i manualno i po potrebi njegovo stanje u binarnoj tabeli je izmenjeno.

Urađena su dva testa ponovljivosti rezultata kako bi bili sigurni u njihovu verodostojnost. U prvom testu, 20 individua je amplifikovano dva puta pomoću dva nezavisno napravljena miksa za amplifikaciju. Na ovaj način je određena verovatnoća reprodukcije amplifikacije od 99.07%. U drugom testu smo koristili uzorke dve individue *R. nathaliae* i dve individue *R. serbica* koje su duplirane iz iste amplifikacije, a zatim je urađena njihova genotipizacija korišćenjem iste smese formamida i markera molekularne težine. Na taj način utvrđena je mogućnost reprodukcije AFLP profila od 97.15%.

Molekularne analize metodom AFLP rađene su u laboratoriji Univerziteta Paris-Sud, Laboratoire Ecologie, Systématique, Evolution, UMR 8079, CNRS-UPS-AgroParisTech, Orsay, Francuska.

### **3. 8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Rezultati svih istraživanja obuhvaćenih ovom tezom, izuzev molekularnih, statistički su obrađeni u programu STATISTICA 5.1 (StatSoft Inc., 1996, Tulsa, OK, USA).

Osim osnovnih statističkih proračuna (određivanje srednje vrednosti, standardne devijacije, koeficijenta varijabilnosti, minimalnih i maksimalnih vrednosti), urađena je analiza varijanse One way ANOVA za analizu srednjih vrednosti merenih parametara. Nakon nje, rađen je jedan od post-hoc testova: Tukey Highest Significant Difference (HSD) test ili Scheffe's test u slučajevima gde je broj individua u svim uzorcima bio jednak, odnosno Unequal N HSD gde su uzorci obuhvatali različiti broj individua.

Analiza glavnih komponenti (eng. Principal Components Analysis - PCA) korišćena je kako bi se otkrila varijabilnost i ključne komponente na nivou kako populacija, tako i vrsta, ali i da bi se uočili odnosi između individua.

Diskriminantna kanonijska analiza (eng. Canonical Discriminant Analyses - CDA) omogućava testiranje hipoteze da se analizirani uzorak sastoji od međusobno diferenciranih grupa.

Ovom analizom izračunate su i Mahalanobisove distance koje su, zatim, upotrebljene kao osnova za klustersku analizu metodom UPGA (Unweighted Pair Group Average) kako bi se interpretirali međusobni odnosi između populacija i vrsta.

Pearson-ov koeficijent korelacije ili regresiona analiza korišćeni su kako bi se ustanovilo da li eventualno postoji zavisnost između istraživanih parametara.

### **3. 8. 1. Statistička obrada podataka molekularnih analiza**

Program AFLP-SURV 1.0 (VEKEMANS, 2002) korišćen je za procenu genetičke raznolikosti i genetičke strukture populacija. AFLP rezultati opisani su prvo ukupnim brojem fragmenata ( $Frag_{tot}$ ) i procentom polimorfnih fragmenata ( $Frag_{poly}$ ). S obzirom na nedovoljno poznavanje načina reprodukcije kod ispitivanih vrsta, korišćene su tri metode za procenu frekvencije alela: Bayesian metod sa neravnomernom prethodnom distribucijom (opšti metod koji daje najtačnije rezultate), frekvencije fragmenta (pretpostavlja fiksiranu homozigotnost tako da daje preuveličanu procenu frekvenci kada se primenjuje na vrste sa slučajnim ukrštanjem) i metod kvadratnog korena (eng. square root method koji daje nisku frekvencu nultog alela). Analize su urađene kako za svaku vrstu odvojeno, tako i zajedno za obe vrste. Statistika koja opisuje genetičku raznolikost i genetičku strukturu populacije predstavljena je sledećim parametrima:

#locP – broj polimorfnih lokusa na nivou od 5%,

PLP – procenat polimorfnih lokusa,

H<sub>j</sub> – očekivana heterozigotnost,

Var (H<sub>j</sub>) – ukupna varijansa H<sub>j</sub>,

VarI (H<sub>j</sub>) – varijansa H<sub>j</sub> usled uzorkovanja individua,

VarL (H<sub>j</sub>) – varijansa H<sub>j</sub> usled detektovanja lokusa,

H<sub>w</sub> – prosečna raznovrsnost gena unutar populacija ili uzoraka,

Var (H<sub>w</sub>) – ukupna varijansa H<sub>w</sub>,

VarI (H<sub>w</sub>) – varijansa H<sub>w</sub> usled uzorkovanja individua,

VarL (H<sub>w</sub>) – varijansa H<sub>w</sub> usled detektovanja lokusa,

VarP (H<sub>w</sub>) – varijansa usled uzorkovanja populacija,

Ht – ukupna raznovrsnost gena (očekivana heterozigotnost ili raznovrsnost gena u ukupnom uzorku),

Hb – prosečna raznovrsnost gena između populacija (Nei's Dst).

Rezultati sekvencioniranja u obliku matrice su iskoršćeni za izračunavanje indeksa genetičke distance između različitih populacija, kao i različitih individua, pomoću opcije DAS (Shared Allele Distance) (CHAKRABORTY AND JIN, 1993) u programu POPULATIONS version 1.2.30 (LANGELLA, 1999). Na osnovu ovih rezultata u istom programu formirano je i neighbor-joining filogenetsko stablo.

Analiza glavnih koordinata (eng. Principal Coordinates Analyses – PCoA) je upotrebljena za proučavanje genetičke povezanosti između individua pomoću programa PCO (ANDERSON, 2003; <http://www.stat.auckland.ac.nz/~mja/Programs.htm>).

Distribucija genetičke varijabilnosti (između vrsta, između populacija i unutar populacija) procenjena je analizom molekularne varijanse (AMOVA) u programu Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER AND LISCHER, 2010; <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/Arlequin35.html>). Pretpostavke *F*-statistike nulte hipoteze testirane su na osnovu distribucija *F*-statistika iz simulacija 1000 uzoraka dobijenih nasumičnim permutacijama originalnog skupa podataka. U istom programu, pomoću Mantel testa ispitana je povezanost između geografske razdaljine i genetičke distance.

Diskriminantna analiza glavnih komponenti (eng. Discriminant Analysis of Principal Components – DAPC, JOMBART ET AL., 2010) u *adegenet* paketu za R-program upotrebljena je za proučavanje strukture populacija, kako bi se videlo da li se sve individue dodeljuju populacijama iz kojih su i uzorkovane.

## 4. REZULTATI

Rezultati prezentovani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju samo deo istraživanja koja su obavljena kako bi se dobili odgovori o ekologiji, reprodukciji i hibridizaciji dve vrste roda *Ramonda* sa Balkanskog poluostrva, ali i filogeniji evropskih predstavnika familije *Gesneriaceae*. Tako su vršena istraživanja promena na anatomskom nivou prilikom dehidratacije pomoću konfokalnog i multi-foton mikroskopa. Ispitivano je da li kod ovih vrsta postoji mogućnost samooprašivanja i to kako eksperimentima na terenu, tako i u Botaničkoj bašti „Jevremovac“. Urađena je detaljna molekularna studija simpatrijskih populacija pomoću AFLP markera kako bi se što bolje proučio proces hibridizacije između *R. nathaliae* i *R. serbica*. Započelo se sa istraživanjima filogenetskih odnosa između evropskih predstavnika familije, a u toku je i uspostavljanje novih protokola za dobijanje kulture tkiva.

### 4. 1. BROJ HROMOZOMA I VELIČINA GENOMA

#### 4. 1. 1. Broj hromozoma kod roda *Ramonda*

Broj hromozoma određen je u ukupno 17 populacija roda *Ramonda*: 1 populaciji vrste *R. myconi*, 4 populacije *R. nathaliae*, 10 populacija *R. serbica* i u 2 simpatrijske populacije (Tab. 4, Karta 3). Osim toga, zbog različitih podataka u literaturi o broju hromozoma kod srodne vrste *H. rhodopensis*, određen je broj hromozoma i za jedinke ove vrste poreklom iz Bugarske, a koje godinama rastu u Botaničkoj bašti „Jevremovac“ u Beogradu.

Hromozomi su sitni, 0.6 do 2.4  $\mu\text{m}$  dugi, bez jasnih ili sa teško uočljivim centromerama. Osnovni broj hromozoma kod roda *Ramonda* je  $x = 24$ .

*Ramonda myconi* je diploid sa  $2n = 2x = 48$  hromozoma (Sl. 10a).

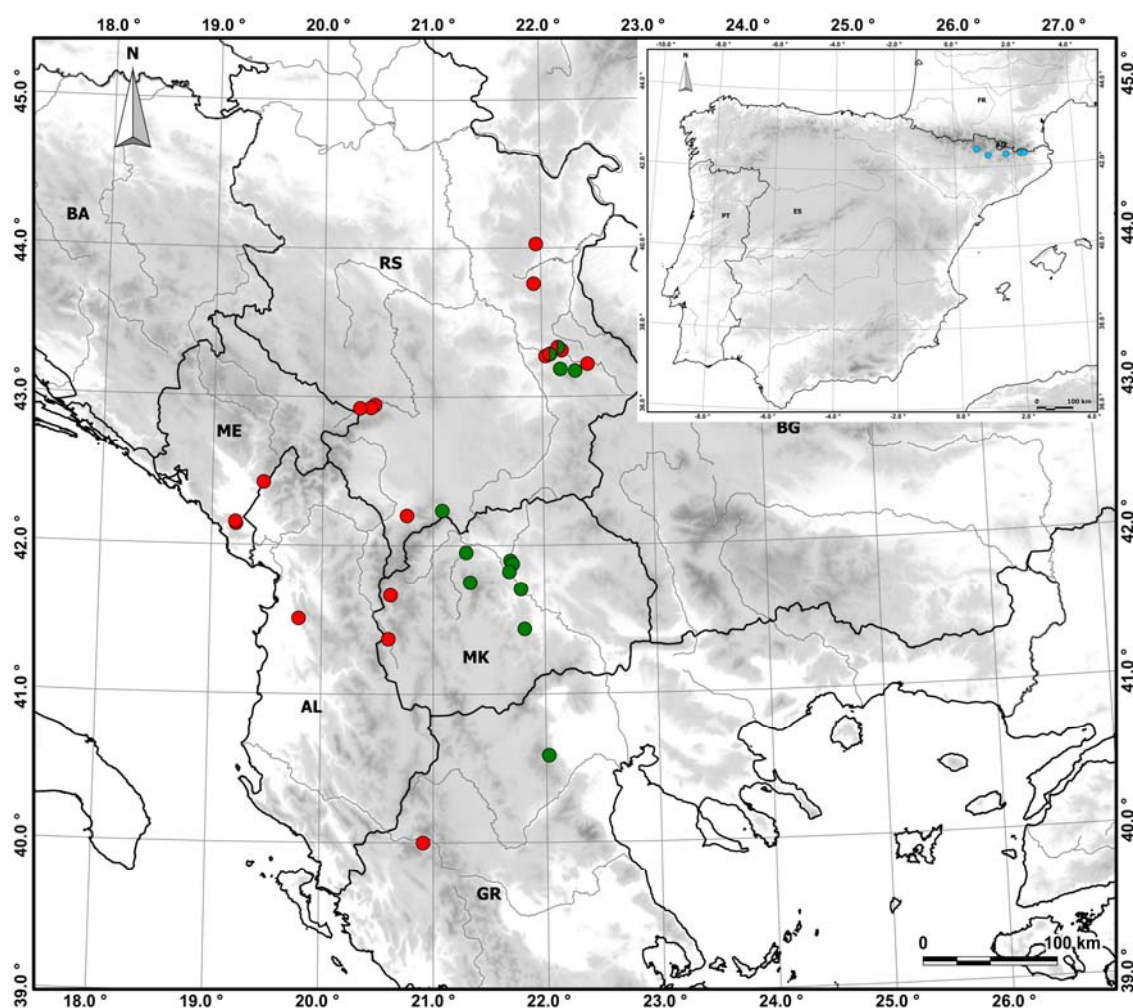
*Rezultati – Broj hromozoma i veličina genoma*

U svim populacijama *R. nathaliae*, iz različitih delova njenog areala (Grčka, Makedonija, Srbija), nadjeni su samo diploidi sa  $2n = 2x = 48$  hromozoma (Sl. 10b).

**Tabela 4.** Broj hromozoma i veličina genoma tri vrste roda *Ramonda*, kao i hibridnih individua i vrste *J. heldreichii*: Pl – nivo ploidije, 2n – broj hromozoma, 2C – ukupna veličina genoma, 1Cx – veličina monoploidnog genoma, N – broj analiziranih individua. pg = 978 Mbp (DOLEŽEL ET AL., 2003).

Takson	Lokalitet	Pl (x)	2n	2C u pg i (Mbp)	1Cx u pg i (Mbp)	SD	Min	Max	CV (%)	N
<i>R. myconi</i>	Šp: Camprodon	2	48	2,59 (2534)	1,30 (1267)	0,03	2,54	2,64	1,35	5
<i>R. myconi</i>	Šp: Barruera - Durro	2		2,55 (2490)	1,27 (1245)	0,01	2,53	2,56	0,50	5
<i>R. myconi</i>	Šp: Gerri de la Sal - Enseu	2		2,55 (2493)	1,27 (1246)	0,02	2,52	2,57	0,85	5
<i>R. myconi</i>	Šp: M. de Cerdanya - Bastanist	2		2,55 (2497)	1,28 (1248)	0,08	2,47	2,69	2,95	7
<i>R. myconi</i>	Šp: Rialb - Queralbs	2		2,51 (2454)	1,25 (1227)	0,02	2,48	2,53	0,95	5
<i>R. myconi</i>	<b>Srednja vrednost za vrstu</b>	<b>2</b>	<b>48</b>	<b>2,55 (2494)</b>	<b>1,27 (1247)</b>	<b>0,05</b>	<b>2,47</b>	<b>2,69</b>	<b>1,90</b>	<b>27</b>
<i>R. nathaliae</i>	Gr: Vermion	2	48	2,38 (2328)	1,19 (1164)	0,11	2,23	2,54	4,75	10
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Katlanovska banja	2		2,41 (2359)	1,21 (1179)	0,10	2,28	2,53	4,17	6
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Raec	2		2,37 (2314)	1,18 (1157)	0,02	2,33	2,40	0,88	11
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Klisura Vardara, Topolka	2		2,35 (2298)	1,17 (1149)	0,03	2,31	2,40	1,18	11
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Matka	2		2,26 (2208)	1,13 (1104)	0,03	2,22	2,31	1,50	5
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Pčinja, blizu Katlanova	2		2,26 (2213)	1,13 (1107)	0,01	2,25	2,28	0,56	5
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Pčinja, na putu ka Velesu	2	48	2,27 (2225)	1,14 (1112)	0,05	2,22	2,37	2,27	7
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Kozjak	2		2,50 (2445)	1,25 (1222)	0,02	2,48	2,54	0,92	5
<i>R. nathaliae</i>	Kos: Gotovuša	2		2,32 (2266)	1,16 (1133)	0,05	2,26	2,37	2,17	5
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Divljana	2	48	2,35 (2294)	1,17 (1147)	0,04	2,27	2,40	1,76	10
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Oblik	2		2,33 (2277)	1,16 (1139)	0,06	2,22	2,69	2,76	64
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Radovanski Kamen	2	48	2,31 (2263)	1,16 (1131)	0,06	2,22	2,51	2,77	45
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Suva planina	2		2,43 (2373)	1,21 (1186)	0,16	2,22	2,65	6,75	10
<i>R. nathaliae</i>	<b>Srednja vrednost za vrstu</b>	<b>2</b>	<b>48</b>	<b>2,34 (2287)</b>	<b>1,17 (1143)</b>	<b>0,08</b>	<b>2,22</b>	<b>2,69</b>	<b>3,51</b>	<b>194</b>

<i>R. serbica</i>	Al: Krujë	6		7,76 (7592)	1,29 (1265)	0,08	7,69	7,85	1,04	3
<i>R. serbica</i>	Gr: Timfi	6	144	7,66 (7487)	1,28 (1248)	0,20	7,38	7,96	2,63	7
<i>R. serbica</i>	Cg: Cijevna	6	192	7,81 (7643)	1,30 (1274)	0,13	7,65	8,04	1,69	9
		10	~ 230	11,65 (11395)	1,17 (1139)	0,30	11,31	11,82	2,55	3
<i>R. serbica</i>	Cg: Kroni e Murici	6	~ 150	7,90 (7728)	1,32 (1288)	0,19	7,72	8,14	2,42	6
<i>R. serbica</i>	Cg: Kroni e Besit	6	144	7,79 (7619)	1,30 (1270)	0,05	7,71	7,84	0,58	7
<i>R. serbica</i>	Mak: Radika	6		7,88 (7706)	1,31 (1284)	0,06	7,82	7,98	0,77	5
<i>R. serbica</i>	Mak: Crmi Drim	6		7,96 (7782)	1,33 (1297)	0,09	7,82	8,10	1,12	10
<i>R. serbica</i>	Kos: Priz. Bistrice	6	144	8,13 (7950)	1,35 (1325)	0,14	8,03	8,23	1,71	2
<i>R. serbica</i>	Srb: Čiflik	6	144	7,79 (7619)	1,30 (1270)	0,23	7,57	8,15	2,92	5
<i>R. serbica</i>	Srb: Jelašnička kl.	6	144 ± 2	7,94 (7765)	1,32 (1294)	0,24	7,30	8,41	3,07	28
<i>R. serbica</i>	Srb: Crna reka	6	144	7,86 (7686)	1,31 (1281)	0,36	7,37	8,49	4,57	12
<i>R. serbica</i>	Srb: Lazareva reka	6		7,58 (7412)	1,26 (1235)	0,09	7,42	7,69	1,23	6
<i>R. serbica</i>	Srb: Mojstirska suhovara	6		7,91 (7737)	1,32 (1289)	0,20	7,79	8,26	2,49	5
<i>R. serbica</i>	Srb: Godulje	6		7,53 (7361)	1,25 (1227)	0,48	7,10	8,44	6,33	6
<i>R. serbica</i>	Srb: Oblik	6		7,92 (7746)	1,32 (1291)	0,14	7,67	8,29	1,83	43
<i>R. serbica</i>	Srb: Radovanski Kamen	6	144	7,79 (7616)	1,30 (1269)	0,28	7,30	8,53	3,56	51
<i>R. serbica</i>	Srb: Rtanj, Baba	6		7,76 (7587)	1,29 (1264)	0,08	7,65	7,84	1,04	5
<i>R. serbica</i>	Srb: Sićevačka klisura	6	> 144	8,11 (7927)	1,35 (1321)	0,15	7,94	8,31	1,86	5
<i>R. serbica</i>	<b>Srednja vrednost za vrstu</b>	<b>6</b>	<b>144</b>	<b>7,85 (7673)</b>	<b>1,31 (1279)</b>	<b>0,25</b>	<b>7,10</b>	<b>8,53</b>	<b>3,15</b>	<b>215</b>
		<b>10</b>	<b>~ 230</b>	<b>11,65 (11395)</b>	<b>1,17 (1139)</b>	<b>0,30</b>	<b>11,31</b>	<b>11,82</b>	<b>2,55</b>	<b>3</b>
<i>R. nathaliae x R. serbica</i>	Srb: Oblik	4	96	5,12 (5005)	1,28 (1251)	0,07	4,93	5,36	1,42	114
		5		6,12 (5982)	1,22 (1169)		6,12	6,12		1
		8		10,22 (9997)	1,28 (1250)	0,31	9,78	10,50	3,04	4
<i>R. nathaliae x R. serbica</i>	Srb: Radovanski Kamen	4	96	5,19 (5077)	1,30 (1269)	0,15	4,96	5,76	2,95	65
		5		6,19 (6057)	1,24 (1211)	0,17	5,94	6,55	2,74	14
		8		9,86 (9639)	1,23 (1205)	0,29	9,54	10,24	2,96	4
<i>R. nathaliae x R. serbica</i>	<b>Srednja vrednost za hibridne individue</b>	<b>4</b>	<b>96</b>	<b>5,14 (5031)</b>	<b>1,29 (1258)</b>	<b>0,11</b>	<b>4,93</b>	<b>5,76</b>	<b>2,22</b>	<b>179</b>
		<b>5</b>		<b>6,19 (6052)</b>	<b>1,24 (1210)</b>	<b>0,16</b>	<b>5,94</b>	<b>6,55</b>	<b>2,66</b>	<b>15</b>
		<b>8</b>		<b>10,04 (9818)</b>	<b>1,25 (1227)</b>	<b>0,34</b>	<b>9,54</b>	<b>10,50</b>	<b>3,39</b>	<b>8</b>
<i>J. heldreichii</i>	Gr: Olimp			<b>2,69</b>		<b>0,03</b>	<b>2,66</b>	<b>2,74</b>	<b>1,20</b>	<b>5</b>



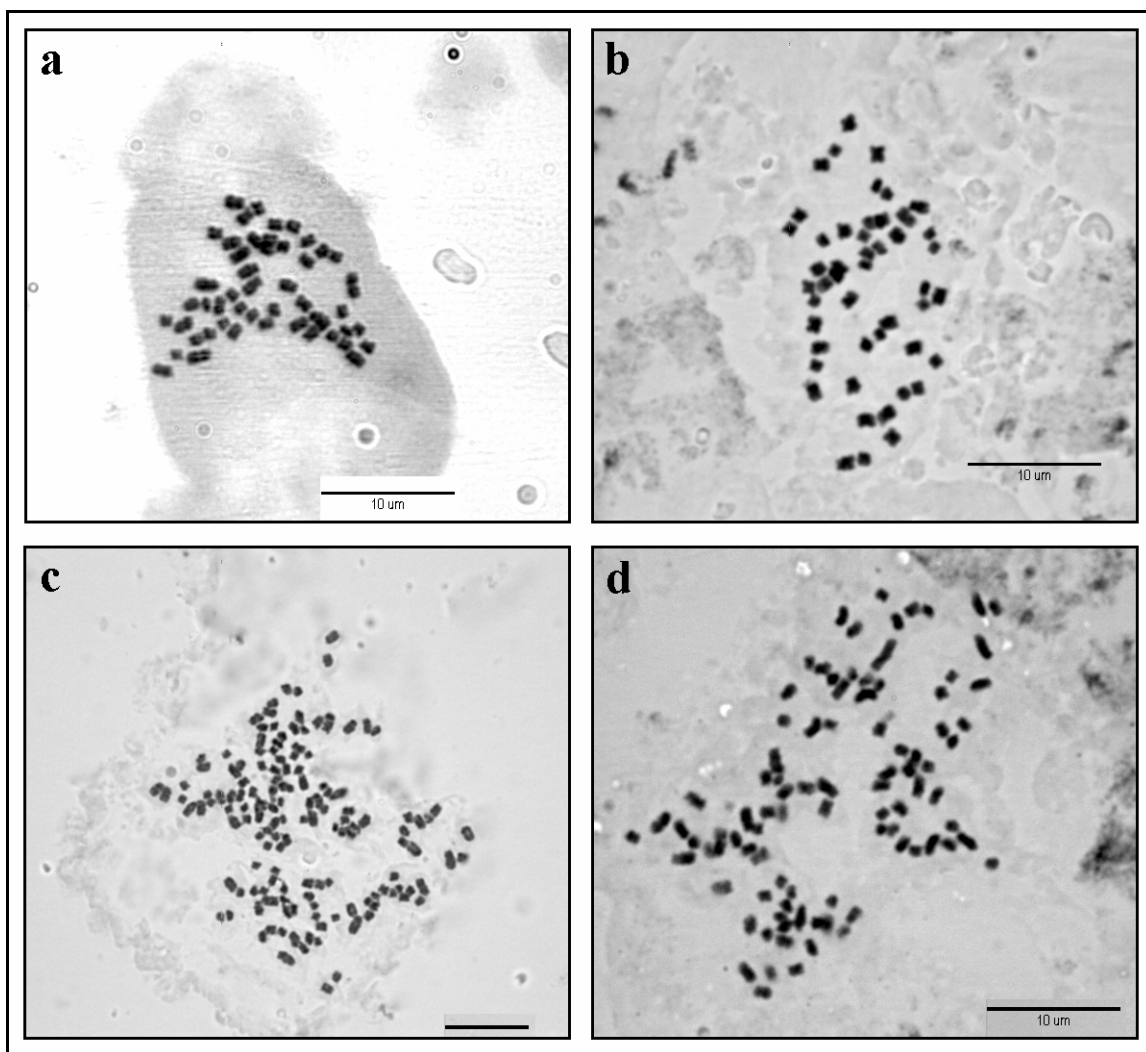
**Karta 3.** Karta rasprostranjenja populacija iz kojih je uzorkovan materijal za analizu broja hromozoma i veličine genoma (*R. myconi* – plavi kružići, *R. nathaliae* – zeleni kružići, *R. serbica* – crveni kružići).

*Ramonda serbica* je heksaploid sa  $2n = 6x = 144$  hromozoma (Sl. 10c). Međutim, kod ove vrste su pronađene i individue sa određenim odstupanjima. Tako je kod pojedinih individua izbrojano nekoliko hromozoma manje ili više ( $2n = 144 \pm 2$ ,  $2n = \sim 150$ ). Najveće odstupanje je pronađeno u jednoj populaciji iz Crne Gore, iz kanjona reke Cijevne. Tu su nađene oktoploidne individue koje su imale  $2n = 8x = 192$  i dekaploidi sa  $2n = 10x = \sim 230$  hromozoma.

U jedine dve simpatrijske populacije u kojima *R. nathaliae* i *R. serbica* žive zajedno, na lokalitetima Radovanski Kamen i Oblik, ustanovljeno je postojanje tri nivoa

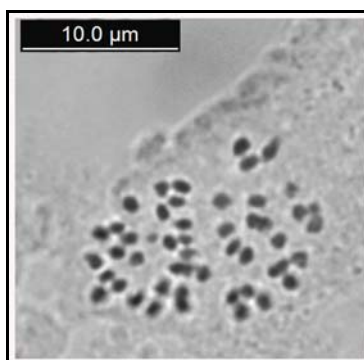


ploidije. Naime, osim diploida *R. nathaliae* i heksaploida *R. serbica*, pronađen je i veliki broj individua sa tetraploidnim intermedijarnim brojem hromozoma  $2n = 4x = 96$  (Sl. 10d). Ove individue su potencijalni hibridi između dve balkanske vrste roda *Ramonda*.



**Slika 10.** Metafazne hromozomske figure vrsta: a) *R. myconi* ( $2n = 2x = 48$ ), b) *R. nathaliae* ( $2n = 2x = 48$ ), c) *R. serbica* ( $2n = 6x = 144$ ) i d) hibridnih individua ( $2n = 4x = 96$ ). Lenjir na svim slikama je  $10 \mu\text{m}$ .

Za vrstu *H. rhodopensis* izbrojano je  $2n = 2x = 48$  hromozoma (Sl. 11).



**Slika 11.** Metafazno hromozomi vrste *H. rhodopensis* ( $2n = 2x = 48$ ).

#### 4. 1. 2. Veličina genoma kod roda *Ramonda*

U okviru naših istraživanja dobijeni su prvi rezultati veličine genoma za dve balkanske vrste roda *Ramonda*, kao i za srodnu vrstu *J. heldreichii*. Analizirano je ukupno 39 populacija: 5 populacija *R. myconi*, 13 *R. nathaliae*, 18 *R. serbica*, 2 populacije u kojima *R. nathaliae* i *R. serbica* žive u simpatriji, kao i jedna populacija vrste *J. heldreichii*.

Postoje male razlike u sadržaju nukleotidnih baza između tri vrste roda *Ramonda*. Tako je sadržaj G-C baza najniži kod *R. myconi*, a najviši kod *R. nathaliae* (Tab. 5).

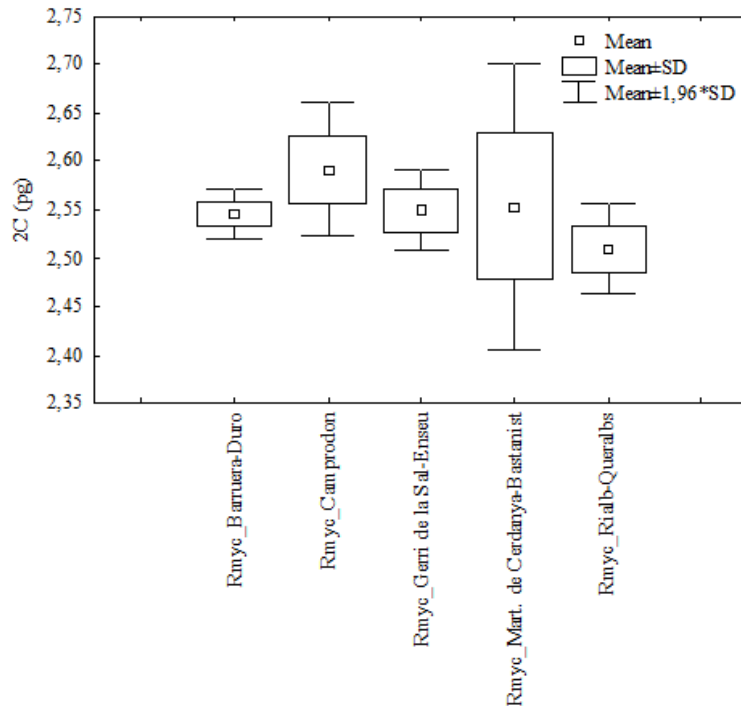
**Tabela 5.** Procentualni sadržaj nukleotidnih baza adenin-timin (AT) i guanin-citozin (GC) u DNK tri vrste roda *Ramonda*.

Vrsta	AT %	GC %
<i>Ramonda myconi</i>	60,08	39,92
<i>Ramonda nathaliae</i>	57,94	42,06
<i>Ramonda serbica</i>	58,83	41,17

Srednja 2C-vrednost kod tri vrste iznosi od 2,34 pg kod *R. nathaliae*, preko 2,55 pg kod *R. myconi* do 7,85 pg kod *R. serbica*, dok je kod *J. heldreichii* 2,69 pg. Razlika

između minimalne i maksimalne srednje 2C-vrednosti u ispitivanim populacijama je 3,6 odnosno 4,3 puta (ako se uzmu u obzir i malobrojni dekaploidi u populaciji iz Cijevne). Veličina genoma vrste *R. nathaliae* je 1,09 puta manja nego kod *R. myconi* i 3,35 manja nego kod *R. serbica*.

Veličina genoma kod 5 populacija vrste *R. myconi* varirala je od 2,51 pg do 2,59 pg (Tab. 4), što čini razliku od svega 1,03 puta. Najveće variranje zabeleženo je u populaciji smeštenoj između lokaliteta Martinet de Cerdanya i Bastanista, ali i dalje manje od 3% (Sl. 12). Analiza varijanse (Tab. 6) i post-hoc Scheffe test (Tab. 7) nisu otkrili statistički značajne razlike među istraživanim populacijama vrste *R. myconi*.



**Slika 12.** Grafički prikaz srednjih vrednosti i standardne devijacije (SD i 1,96\*SD) 2C-vrednosti kod 5 populacija vrste *R. myconi*.

**Tabela 6.** Rezultati analize varijanse (ANOVA) za 2C-vrednost kod tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua. Vrednosti označene sa \* su značajne za  $p < 0,01000$ .

	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
<i>R. myconi</i>	0,0171	4	0,0043	0,0437	22	0,0020	2,1595	0,1073
<i>R. nathaliae</i>	0,3920	12	0,0327	0,9085	181	0,0050	6,5084	0,0000*
<i>R. serbica</i>	12,7034	17	0,7473	47,6809	197	0,2420	3,0874	0,0001*
<i>R. nathaliae</i> <i>x R. serbica</i>	4,0234	1	4,0234	192,6006	200	0,9630	4,1780	0,0423

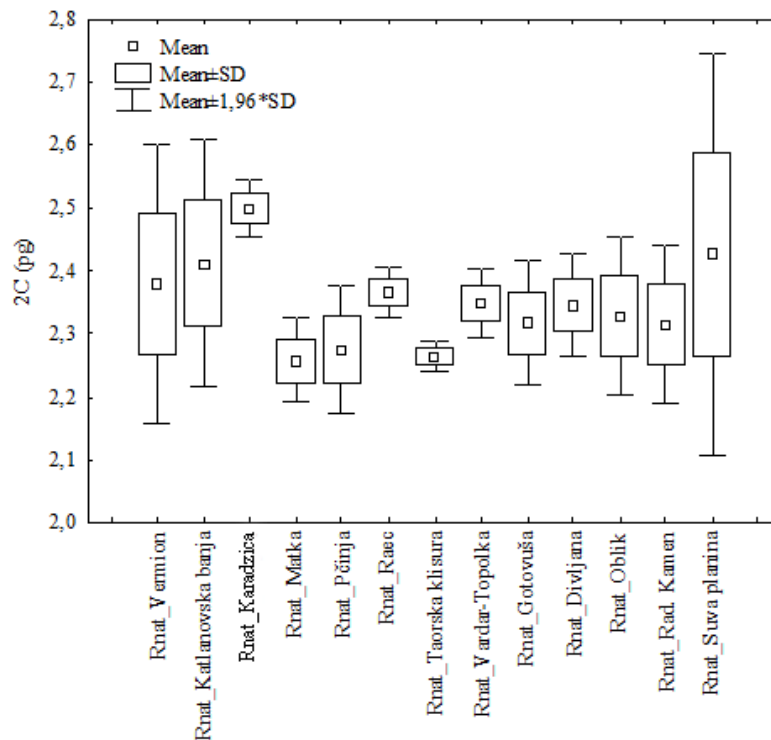
**Tabela 7.** Post-hoc Scheffé test 2C-vrednosti za 5 istraživanih populacija *R. myconi*.

	{1} M=2,5457	{2} M=2,5914	{3} M=2,5490	{4} M=2,5530	{5} M=2,5090
Rmyc_Barruera-Duro {1}		0,6281	1,0000	0,9992	0,7888
Rmyc_Camprodon {2}	0,6281		0,6900	0,7061	0,1099
Rmyc_Gerri de la Sal-Enseu {3}	1,0000	0,6900		0,9999	0,7326
Rmyc_Mart. de Cerdanya-Bastanist {4}	0,9992	0,7061	0,9999		0,5930
Rmyc_Rialb-Queralbs {5}	0,7888	0,1099	0,7326	0,5930	

U istraživanim populacijama vrste *R. nathaliae* dobijene su 2C-vrednosti u rasponu od 2,26 pg do 2,50 pg (Tab. 4), što čini razliku od 1,11 puta. Minimalne vrednosti su nađene u populacijama iz Matke i Taorske klisure (Makedonija), dok su maksimalne vrednosti prisutne u populaciji ove vrste sa planine Karadžice (Makedonija). Veće variranje veličine genoma ( $> 3\%$ ) zabeleženo je u tri populacije: Vermion (Grčka), Katlanovska banja (Makedonija) i Suva planina (Srbija) (Sl. 13). Analize varijanse (Tab. 6) i post-hoc Sheffe test (Tab. 8) utvrdili su postojanje statistički značajnih razlika pre svega između populacije Karadžica s jedne strane i nekoliko drugih populacija ove vrste s druge strane (Matka, Pčinja, Taorska klisura, Radovanski Kamen).

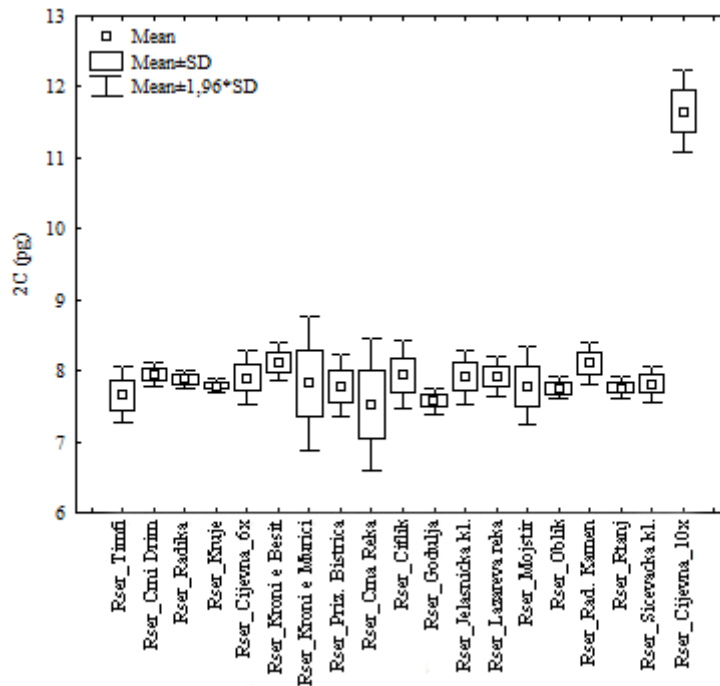
Vrednosti veličine genoma kod vrste *R. serbica* su bile u opsegu od 7,53 pg (klisura reke Godulje u Srbiji) do 8,13 pg (klisura Prizrenske Bistrice na Kosovu, Tab. 4), što čini razliku od 1,08 puta. Veće variranje veličine genoma zabeleženo je u svega nekoliko analiziranih populacija i to su klisure reka Godulje, Crne Reke i Jelašnice i kod biljaka sa lokaliteta Radovanski Kamen (Tab. 4). Izuzetak čini populacija iz kanjona

reke Cijevne u kojoj su pronađene individue sa znatno većom veličinom genoma ( $2C = 11,65$  pg, Tab. 4, Sl. 14) koja bi odgovarala dekaploidnom nivou, tako da je tu variranje zato i najveće. Ove individue imaju 1,5 puta veću veličini genoma od proseka karakterističnog za vrstu *R. serbica* i oko 5 puta veću od  $2C$ -vrednosti kod *R. nathaliae*.



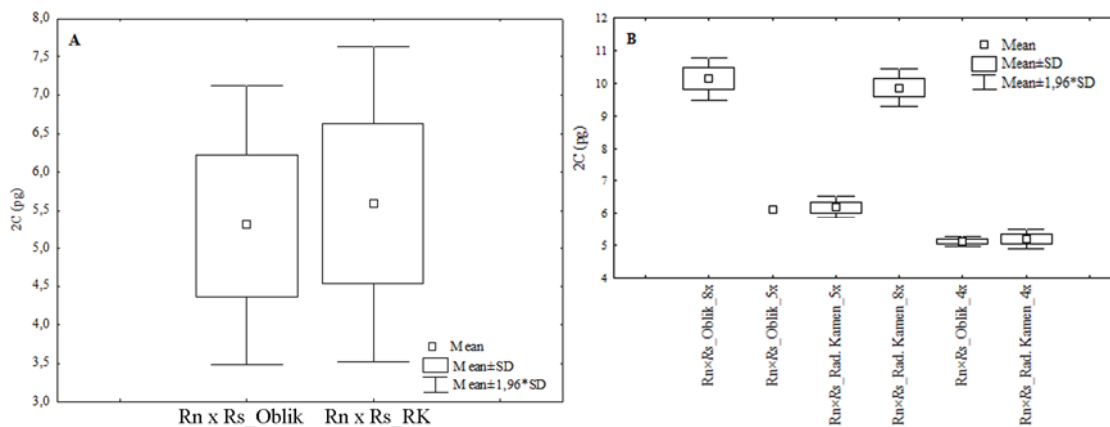
**Slika 13.** Grafički prikaz srednjih vrednosti i standardne devijacije (SD i  $1,96*SD$ )  $2C$ -vrednosti kod 13 populacija vrste *R. nathaliae*.

Analiza varijanse pokazala je postojanje statistički značajnih razlika između populacija (Tab. 6), ali post-hoc Scheffe test je ustanovio da su to, pre svega, razlike između populacije iz kanjona reke Cijevne i ostalih populacija vrste *R. serbica* (Tab. 9). Ako se izuzmu dekaploidi iz ove populacije, nema statistički značajnih razlika između preostalih populacija ove vrste.



**Slika 14.** Grafički prikaz srednjih vrednosti i standardne devijacije (SD i  $1,96*SD$ ) 2C-vrednosti kod 18 populacija vrste *R. serbica*.

Više nivoa ploidiije otkriveno je na još dva lokaliteta, u simpatrijskim populacija na Obliku i Radovanskom Kamenu. U ove dve populacije osim diploidnih jedinki *R. nathaliae* i heksaploidnih *R. serbica*, pronađen je i znatan broj individua sa veličinom genoma koja odgovara tetraploidima ( $2C = 5,14$  pg), kao i manji broj pentaploida ( $2C = 6,19$  pg) i oktoploida ( $2C = 10,04$  pg, Tab. 4). Variranje unutar ovih ploidijskih nivoa je malo, a analiza varijansi praćena Sheffe testom ustanovila je odsustvo statistički značajnih razlika između dve simpatrijske populacije (Tab. 6, Tab. 10, Sl. 15).



**Slika 15.** Grafički prikaz srednjih vrednosti i standardne devijacije (SD i 1,96\*SD) 2C-vrednosti tetra-, penta- i oktoploida u dve simpatrijske populacije, Oblik i Radovanski Kamen: A) za sva tri nivoa ploidije zajedno, B) za svaki nivo ploidije zasebno.

**Tabela 8.** Post-hoc Scheffé test 2C-vrednosti za 13 istraživanih populacija *R. nathaliae*. Vrednosti označene sa \* su značajne za  $p < 0,01000$ .

	{1} M=2,3802	{2} M=2,4119	{3} M=2,4999	{4} M=2,2577	{5} M=2,2750	{6} M=2,3660	{7} M=2,2628	{8} M=2,3495	{9} M=2,3172	{10} M=2,3456	{11} M=2,3286	{12} M=2,3138	{13} M=2,4259
<b>Rnat_Vermion {1}</b>		1,0000	0,6584	0,6184	0,6933	1,0000	0,6875	1,0000	0,9973	1,0000	0,9685	0,8403	0,9992
<b>Rnat_Katlanovska banja {2}</b>	1,0000		0,9780	0,3824	0,4457	0,9998	0,4449	0,9950	0,9599	0,9926	0,8139	0,6029	1,0000
<b>Rnat_Karadžica {3}</b>	0,6584	0,9780		0,0059*	0,0056*	0,4302	0,0084*	0,2274	0,1763	0,2123	0,0110	0,0034*	0,9883
<b>Rnat_Matka {4}</b>	0,6184	0,3824	0,0059*		1,0000	0,7790	1,0000	0,9241	0,9997	0,9509	0,9668	0,9964	0,1052
<b>Rnat_Pčinja {5}</b>	0,6933	0,4457	0,0056*	1,0000		0,8495	1,0000	0,9643	1,0000	0,9804	0,9885	0,9996	0,1079
<b>Rnat_Racc {6}</b>	1,0000	0,9998	0,4302	0,7790	0,8495		0,8337	1,0000	0,9998	1,0000	0,9975	0,9620	0,9867
<b>Rnat-Taorska klisura {7}</b>	0,6875	0,4449	0,0084*	1,0000	1,0000	0,8337		0,9504	0,9999	0,9694	0,9821	0,9986	0,1382
<b>Rnat_Vardar-Topolka {8}</b>	1,0000	0,9950	0,2274	0,9241	0,9643	1,0000	0,9504		1,0000	1,0000	1,0000	0,9988	0,9082
<b>Rnat_Gotovuša {9}</b>	0,9973	0,9599	0,1763	0,9997	1,0000	0,9998	0,9999	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	0,7935
<b>Rnat_Divljana {10}</b>	1,0000	0,9926	0,2123	0,9509	0,9804	1,0000	0,9694	1,0000	1,0000		1,0000	0,9998	0,8901
<b>Rnat_Oblik {11}</b>	0,9685	0,8139	0,0110	0,9668	0,9885	0,9975	0,9821	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	0,1899
<b>Rnat_Rad. Kamen {12}</b>	0,8403	0,6029	0,0034*	0,9964	0,9996	0,9620	0,9986	0,9988	1,0000	0,9998	1,0000		0,0683
<b>Rnat_Suva planina {13}</b>	0,9992	1,0000	0,9883	0,1052	0,1079	0,9867	0,1382	0,9082	0,7935	0,8901	0,1899	0,0683	



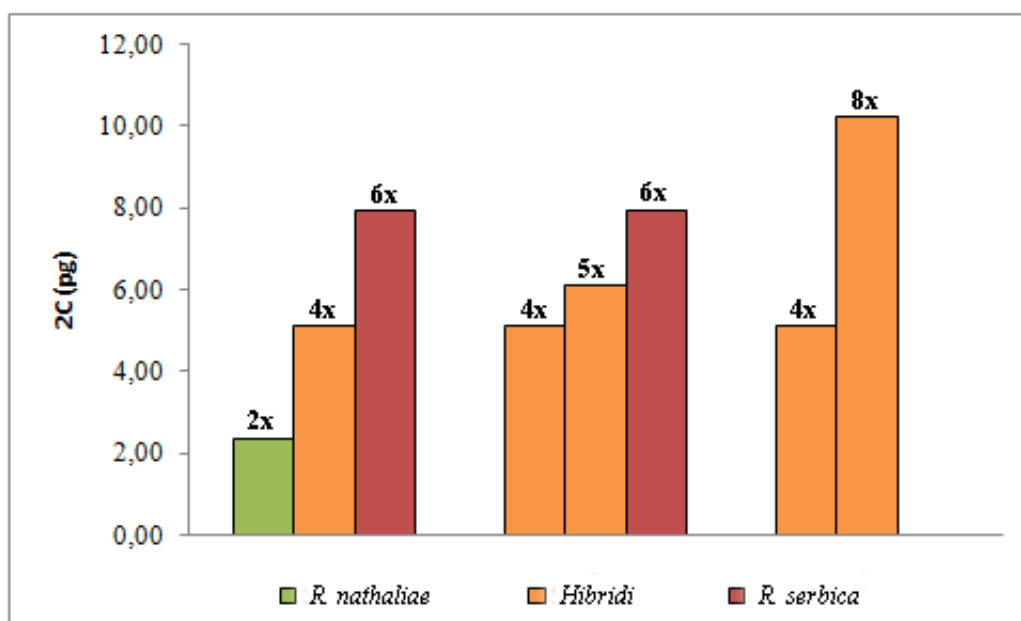
**Tabela 9.** Post-hoc Scheffe test 2C-vrednosti za 18 istraživanih populacija *R. serbica*. Vrednosti označene sa \* su značajne za  $p < 0,01000$ .

	{1} M=7,7	{2} M=8,0	{3} M=7,9	{4} M=7,8	{5} M=8,8	{6} M=7,8	{7} M=7,9	{8} M=8,1	{9} M=7,8	{10} M=7,8	{11} M=7,5	{12} M=7,9	{13} M=7,6	{14} M=7,9	{15} M=8,0	{16} M=7,8	{17} M=7,8	{18} M=8,1
<b>Timfi {1}</b>		1,0000	1,0000	1,0000	0,1690	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Crni Drim {2}</b>	1,0000		1,0000	1,0000	0,5927	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Radika {3}</b>	1,0000	1,0000		1,0000	0,8140	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Krujč {4}</b>	1,0000	1,0000	1,0000		0,8922	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Cijevna {5}</b>	0,1690	0,5927	0,8140	0,8922		0,4184	0,7597	0,9999	0,4920	0,6588	0,0934	0,1291	0,1447	0,8583	0,1237	0,0034*	0,5914	0,9877
<b>Kroni e Besit {6}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4184		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Kroni e Murici {7}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,7597	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Priz. bistrica {8}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9999	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Crna reka {9}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4920	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Čiflik {10}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6588	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Godulja {11}</b>	1,0000	0,9999	1,0000	1,0000	0,0934	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,9998	1,0000	1,0000	0,9985	1,0000	1,0000	0,9996
<b>Jelašnička kl. {12}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1291	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9998		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Lazareva reka {13}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1447	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	0,9997	1,0000	1,0000	0,9999
<b>Mojstir {14}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8583	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Oblik {15}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1237	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9985	1,0000	0,9997	1,0000		0,9995	1,0000	1,0000
<b>Rad. Kamen {16}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0034*	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9995		1,0000	1,0000
<b>Rtanj {17}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5914	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
<b>Sićevačka kl. {18}</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9877	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9996	1,0000	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

**Tabela 10.** Post-hoc Scheffe test 2C-vrednosti za tetra-, penta- i oktoploidne individue iz simpatrijskih populacija Oblik i Radovanski kamen. Vrednosti označene sa \* su značajne za  $p < 0,01000$ .

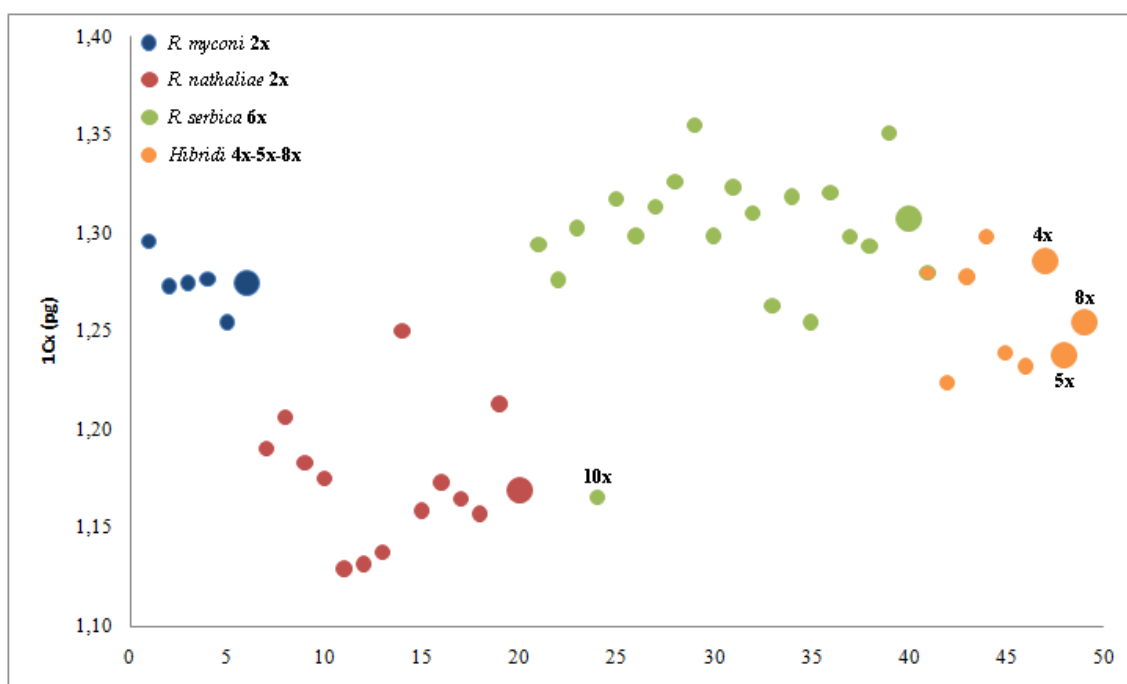
	{1} M=5,118	{2} M=5,191	{3} M=6,117	{4} M=6,194	{5} M=10,134	{6} M=9,856
<i>Rn</i> × <i>Rs</i> _Oblik_4x {1}		0,02105	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
<i>Rn</i> × <i>Rs</i> _Rad. Kamen_4x {2}	0,02105		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
<i>Rn</i> × <i>Rs</i> _Oblik_5x {3}	0,00000*	0,00000*		0,99676	0,00000*	0,00000*
<i>Rn</i> × <i>Rs</i> _Rad. Kamen_5x {4}	0,00000*	0,00000*	0,99676		0,00000*	0,00000*
<i>Rn</i> × <i>Rs</i> _Oblik_8x {5}	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*		0,06309
<i>Rn</i> × <i>Rs</i> _Rad. Kamen_8x {6}	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,06309	

Tetraploidi u ovim populacijama su mogli nastati hibridizacijom diploidne *R. nathaliae* i heksaploidne *R. serbica* i njihova veličina genoma je intermedijarna između dve roditeljske vrste (Sl. 16). Pentaploidi možda vode poreklo od hibrida koji se ukrstio sa *R. serbica*, ali je moguće i da su nastali ukrštanjem neredukovanog gameta *R. nathaliae* sa *R. serbica*. Oktoploidi su mogli nastati spontanom udvajanjem genoma hibrida.



**Slika 16.** Odnosi veličine genoma različitih nivoa ploidijske u simpatrijskim populacijama.

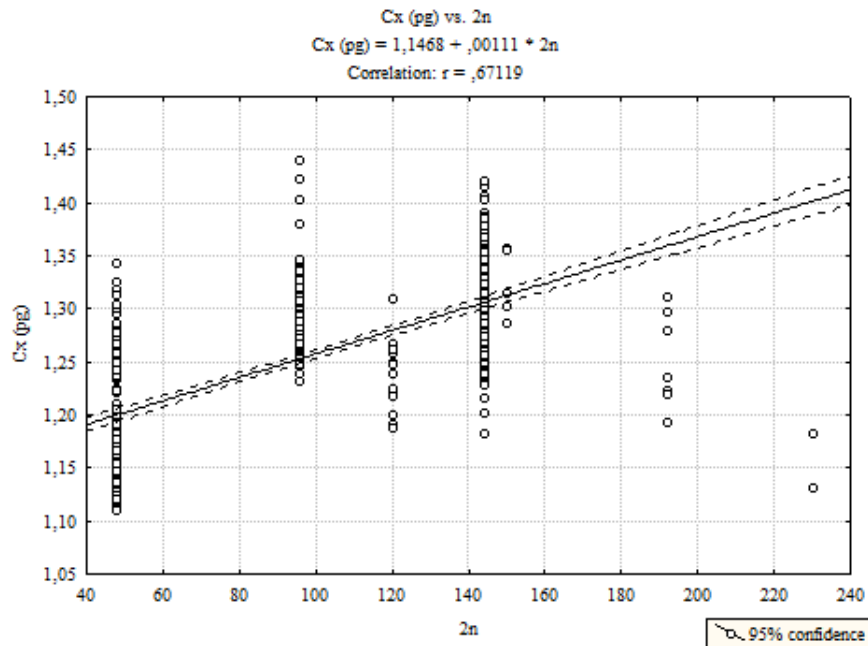
Monoploidna veličina genoma (1Cx) izračunata je deljenjem 2C-vrednosti nivoom ploidije. Srednja 1Cx vrednost kretala se od 1,17 pg za *R. nathaliae*, preko 1,27 pg kod *R. myconi*, do 1,31 pg kod *R. serbica* (Tab. 4). Monoploidna veličina genoma kod *R. myconi* bila je ujednačena od 1,25 do 1,30 pg. Kod *R. nathaliae* variranje je veće, od 1,13 pg kod populacija iz Matke i klisure reke Pčinje do 1,25 pg kod biljaka sa planine Karadžice. 1Cx-vrednost kod vrste *R. serbica* varira od 1,25 pg kod biljaka iz klisure reke Godulje do 1,35 pg u populacijama iz Sićevačke klisure i Prizrenske Bistrice. Samo je u populaciji iz kanjona reke Cijevne kod dekaploidnih individua izračunata znatno manja 1Cx-vrednost od svega 1,17 pg (Tab. 4, Sl. 17). Monoploidna veličina genoma hibridnih individua je malo niža nego kod *R. serbica* (1Cx = 1,29 pg) i blago se snižava kod individua koje su penta- ili oktoplodi (Tab. 4, Sl. 17).



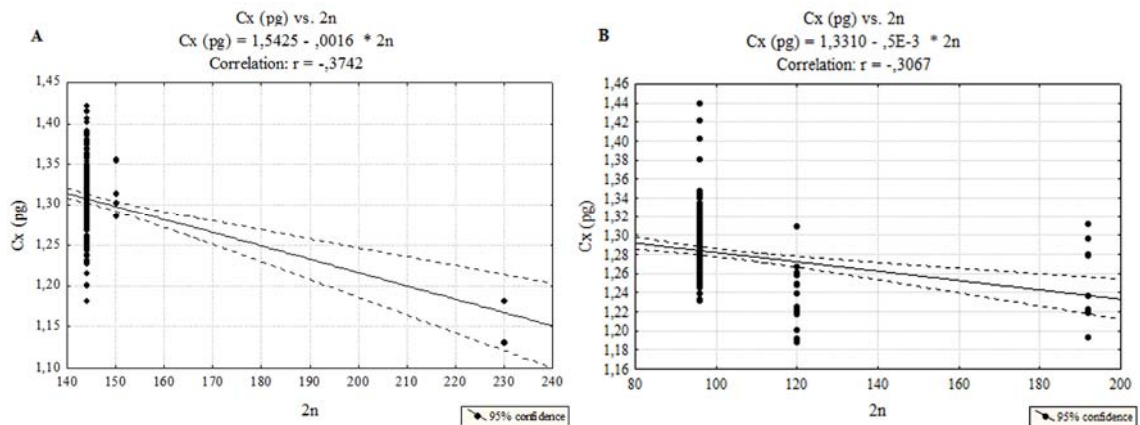
**Slika 17.** Grafički prikaz monoploidne veličine genoma (1Cx-vrednost, pg) kod tri vrste roda *Ramonda*, kao i kod hibridnih jedinki različitih nivoa ploidije. Tačke većeg prečnika označavaju srednju 1Cx-vrednost za dati takson.

Umerena, ali statistički značajna pozitivna korelacija između 1Cx-vrednosti i broja hromozoma zabeležena je na nivou celog roda ( $r = 0,67$ ,  $p = 0,0000$ , Sl. 18). Slaba

negativna korelacija, takođe statistički značajna dobijena je kod vrste *R. serbica* ( $r = -0,37$ ,  $p = 0,0000$ , Sl. 19A) i kod hibridnih individua ( $r = -0,31$ ,  $p = 0,00001$ , Sl. 19B).



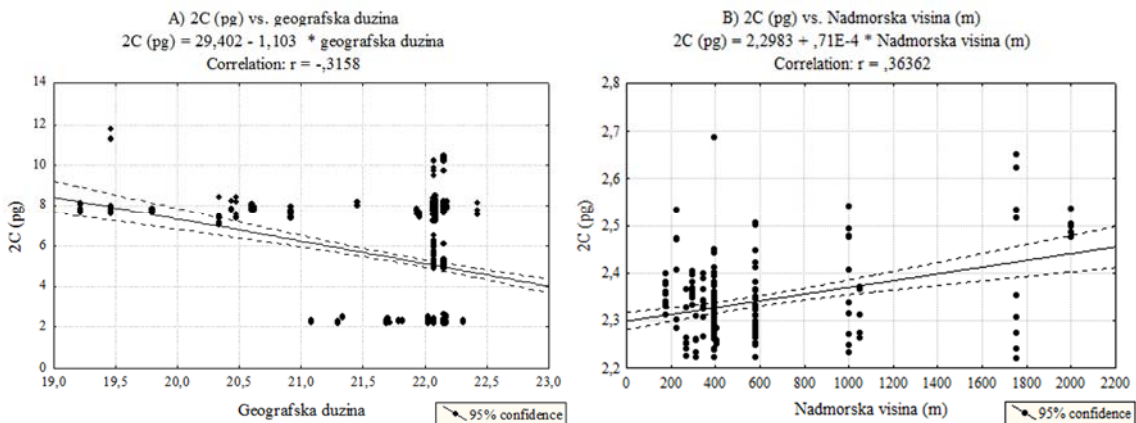
**Slika 18.** Korelacija između monoploidne veličine genoma (1Cx) i broja hromozoma (2n) izračunata za ceo rod *Ramonda*.



**Slika 19.** Korelacija između monoploidne veličine genoma (1Cx) i broja hromozoma (2n) za A) vrstu *R. serbica* i B) hibridne individue iz simpatrijskih populacija.

### 4. 1. 3. Korelacije između veličine genoma i geografskog položaja populacija

Kada su u pitanju geografski položaj i nadmorska visina, statistički značajne, ali slabe korelacije zabeležene su između veličine genoma (2C-vrednost) i geografske širine ( $r = 0,14$ ,  $p = 0,0006$ ), geografske dužine ( $r = 0,15$ ,  $p = 0,0001$ ) i nadmorske visine ( $r = -0,15$ ,  $p = 0,0002$ ) posmatrano za ceo rod *Ramonda*. Umerena statistički značajna korelacija dobijena je između 2C-vrednosti i geografske dužine kada se uzmu u obzir samo predstavnici roda sa Balkana ( $r = -0,32$ ,  $p = 0,0000$ , Sl. 20A) i 2C-vrednosti i nadmorske visine kod vrste *R. nathaliae* ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,0000$ , Sl. 20B).

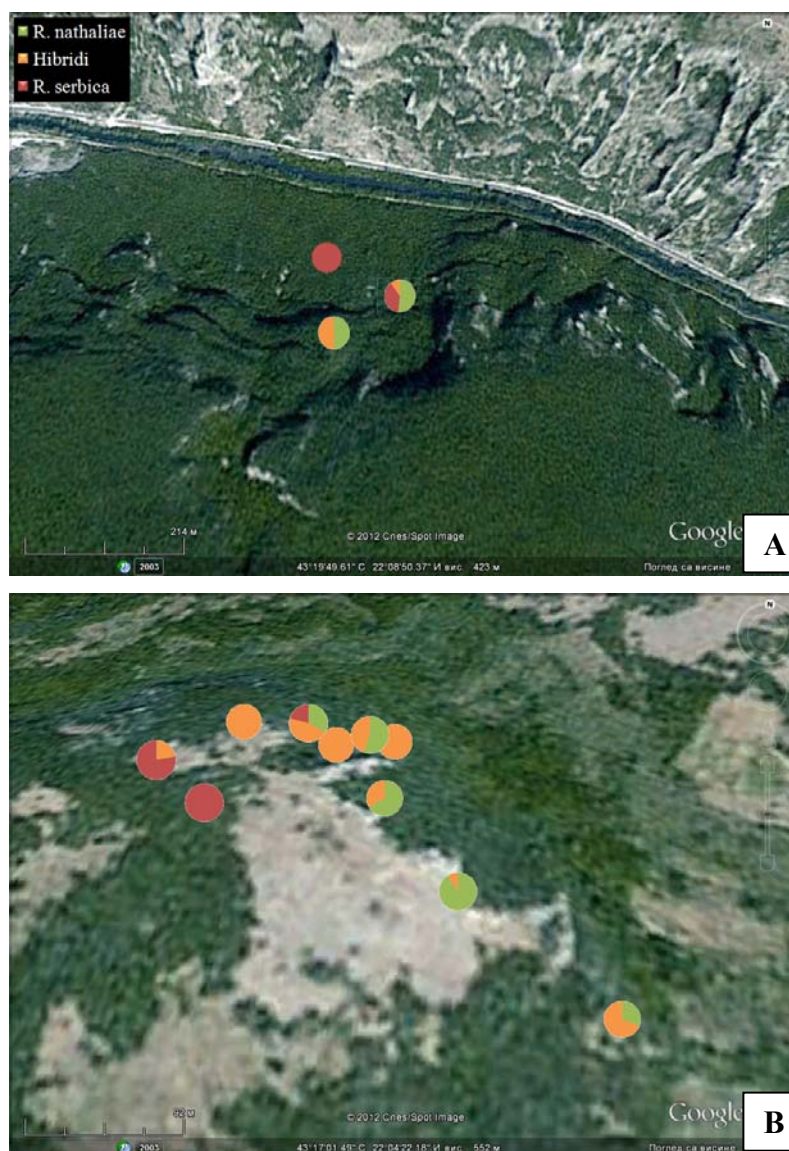


**Slika 20.** Korelacija između veličine genoma (2C) i A) geografske dužine za predstavnike roda *Ramonda* na Balkanu i B) nadmorske visine za vrstu *R. nathaliae*.

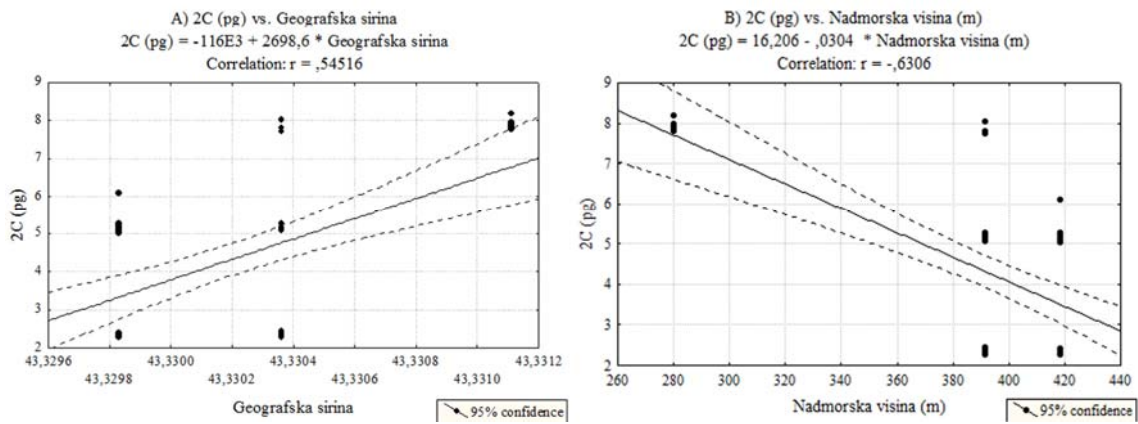
Simpatrijske populacije na lokalitetima Oblik i Radovanski Kamen su obuhvaćene posebnom regresionom analizom kako bi se ustanovilo da li u njima postoji neka statistički značajna pravilnost što se tiče rasporeda roditeljskih vrsta i hibridnih individua. U ovim populacijama geografske koordinate su zabeležene za svaku uzorkovanu subpopulaciju i u njima je određena zastupljenost roditeljskih jedinki i hibrida prema rezultatima merenja veličine genoma (Sl. 21).

U populaciji sa lokaliteta Oblik ustanovljena je pozitivna korelacija između 2C-vrednosti i geografske širine ( $r = 0,55$ ,  $p = 0,0000$ , Sl. 22A) i negativna između 2C-

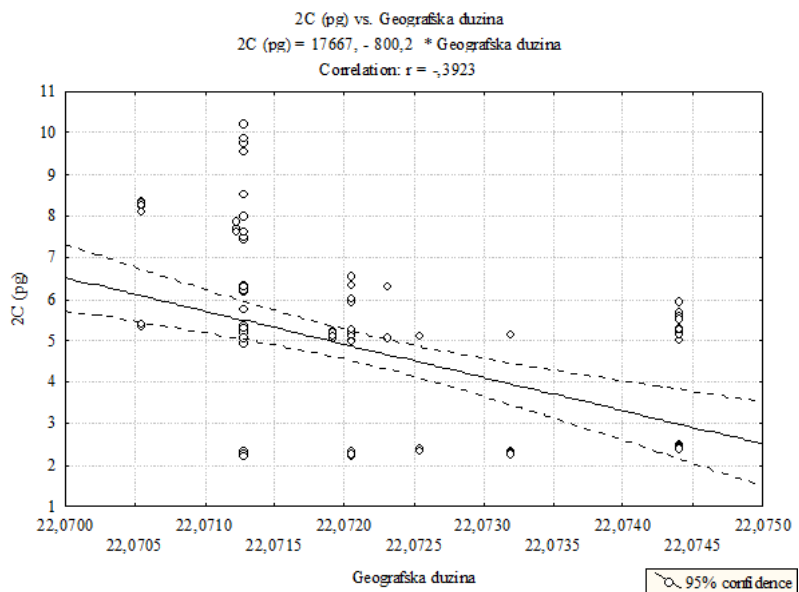
vrednosti i nadmorske visine ( $r = -0,63$ ,  $p = 0,0000$ , Sl. 22B). Za individue iz populacije sa lokaliteta Radovanski Kamen utvrđena je negativna korelacija između 2C-vrednosti i geografske dužine ( $r = -0,39$ ,  $p = 0,0000$ , Sl. 23).



**Slika 21.** Prostorni raspored subpopulacija i zastupljenost roditeljskih i hibridnih individua u njima na lokalitetima A) Oblik i B) Radovanski Kamen.



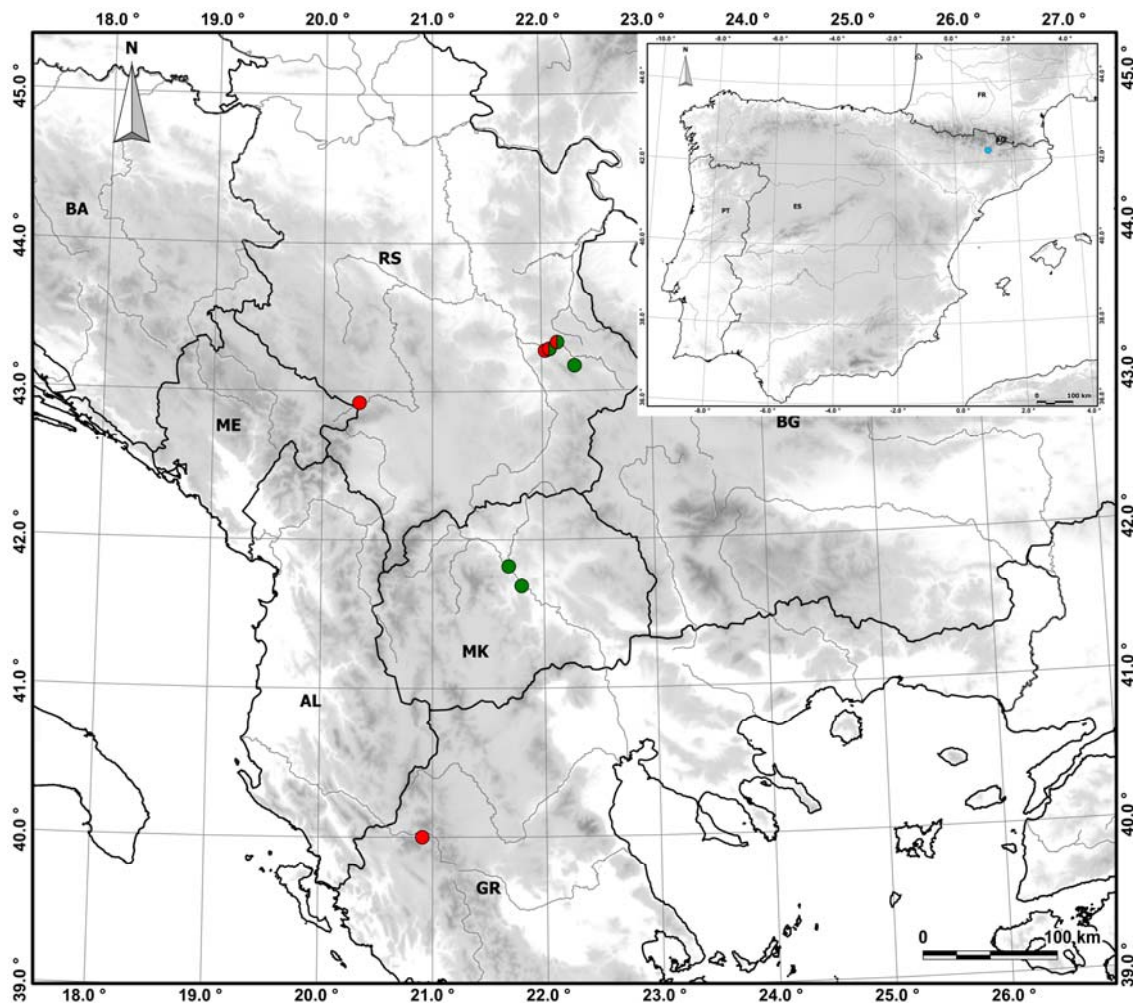
**Slika 22.** Korelacija između veličine genoma (2C) i A) geografske širine i B) nadmorske visine u populaciji Oblik.



**Slika 23.** Korelacija između veličine genoma (2C) i geografske dužine u populaciji Radovanski Kamen.

## 4. 2. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE POLENA

Karakteristike polenovih zrna proučavane su na biljnom materijal sakupljenom u tri populacije *R. nathaliae*, tri populacije *R. serbica*, kao i iz jedne populacije vrste *R. myconi*. Pored toga, u dve simpatrijske populacije, Radovanski Kamen i Oblik, urađeno je detaljno sakupljanje polenovih zrna kako sa roditeljskih vrsta tako i sa hibridnih individua (Tab. 3, Karta 4). Za sve populacije određena je veličina genoma, što je bilo posebno važno u simpatrijskim populacijama gde je to najsigurniji karakter za razlikovanje primeraka roditeljskih vrsta i hibrida.



**Karta 4.** Karta rasprostranjenja populacija iz kojih je uzorkovan materijal za analizu polena i semena (*R. myconi* – plavi kružići, *R. nathaliae* – zeleni kružići, *R. serbica* – crveni kružići).

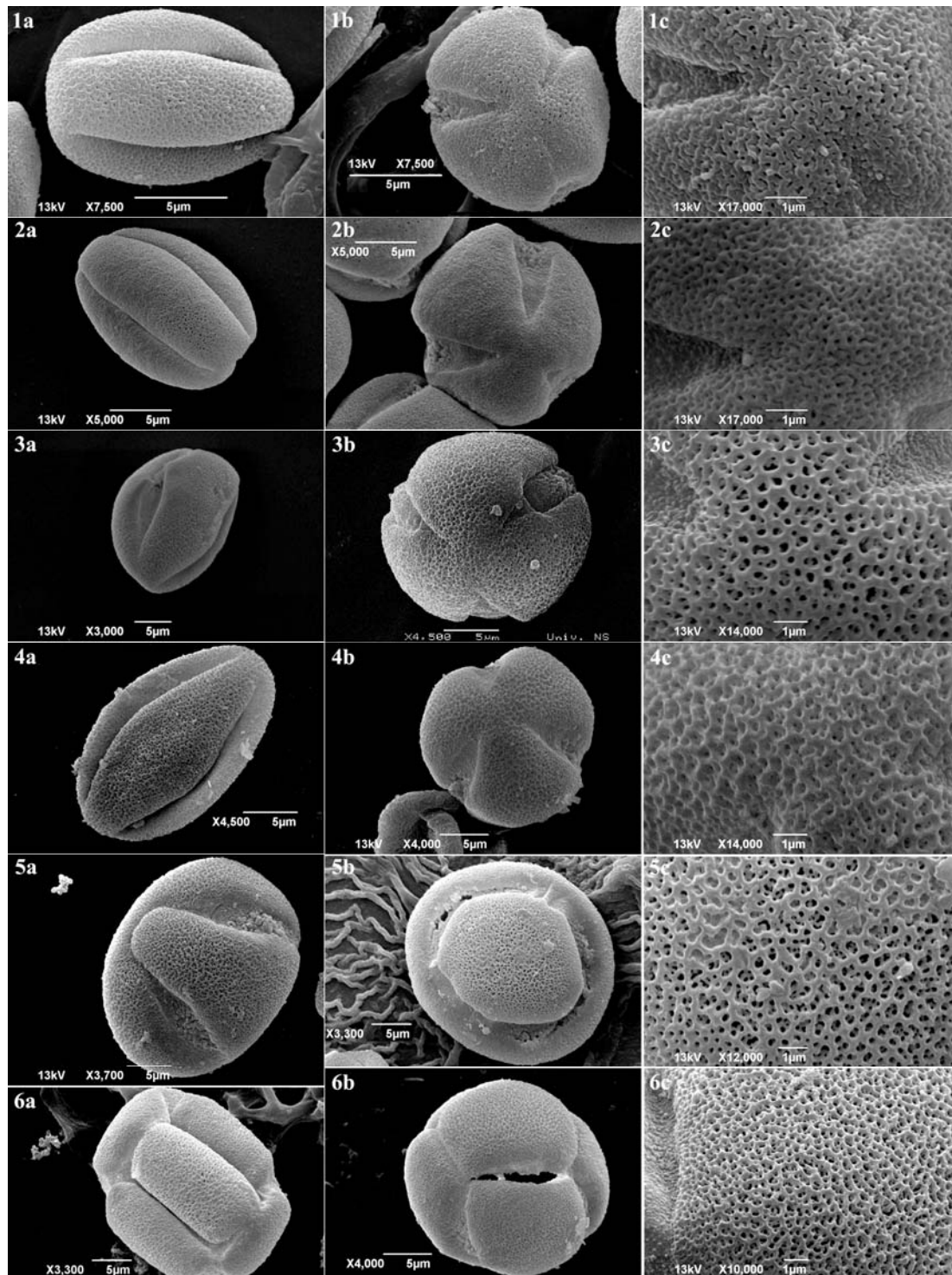


Polenova zrna sve tri vrste roda *Ramonda* su izopolarne monade (Tab. 11, Sl. 24). Oblik polena je uglavnom prolatno sferoidan i subprolatan (Sl. 25). Prolatna i oblatno sferoidna polenova zrna su prisutna u mnogo manjoj meri, dok su suboblatna gotovo potpuno odsutna. Zastupljenost različitih oblika polena malo je izmenjena u simpatrijskim populacijama gde su polenova zrna vrste *R. nathaliae* u potpunosti sferoidna, dok je polen hibridnih individua sa Oblika više subprolatnog i prolatnog oblika.

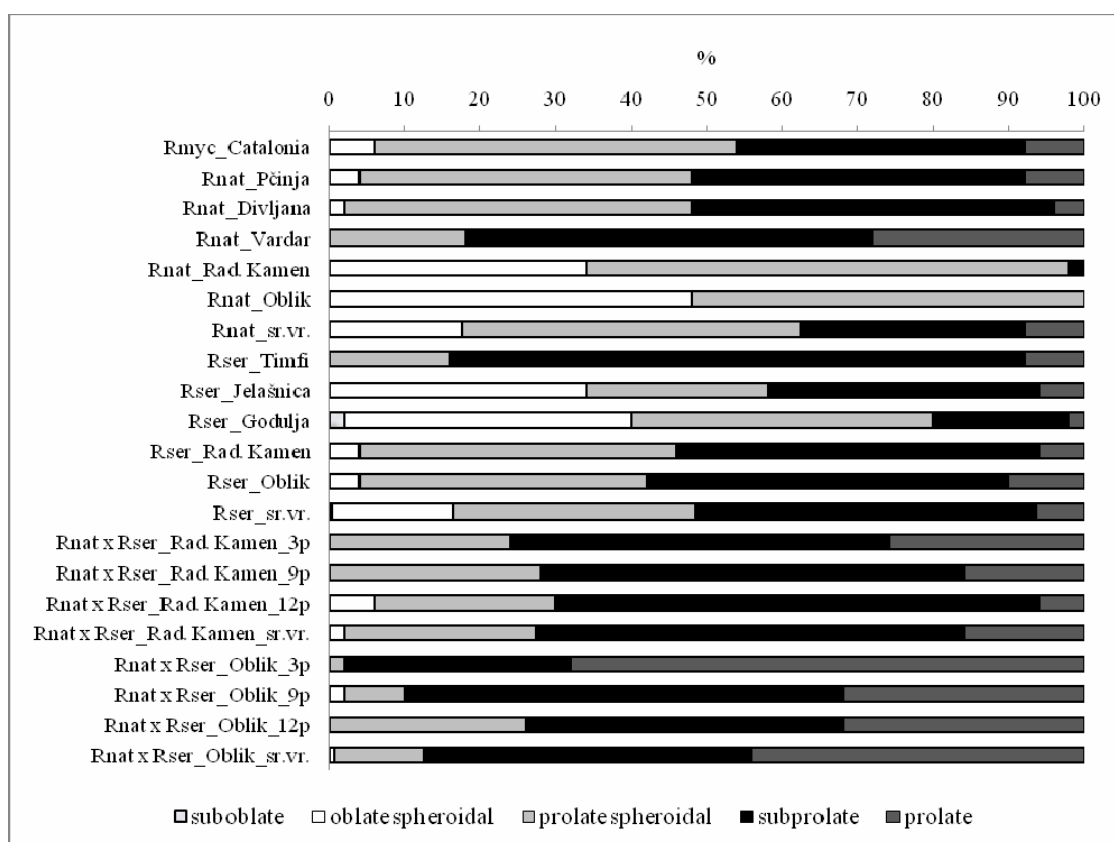
**Tabela 11.** Uporedni opis polenovih zrna tri vrste roda *Ramonda*, kao i hibridnih individua.

	<i>R. myconi</i>	<i>R. nathaliae</i>	<i>R. serbica</i>	<i>R. nathaliae</i> × <i>R. serbica</i>
<b>Kategorija u odnosu na veličinu (najduža osa u μm)</b>	mala (17 μm)	mala (20 μm)	mala do srednja (28 μm)	mala (24 μm) srednja (33 μm)
<b>Oblik</b>	Prolatno sferoidna do subprolatna	Prolatno sferoidna do subprolatna	Prolatno sferoidna do subprolatna	Subprolatna, prolatna, prolatno sferoidna
<b>Kontura</b>	kružna	kružna	kružna	kružna, eliptična, četvorougona
<b>Broj pora</b>	3	3	3	3, 9, 12
<b>Tip ornamentacije egzine</b>	Mikroretikularna-perforatna	Mikroretikularna-perforatna	Mikroretikularna-perforatna	Mikroretikularna-perforatna

Polenova zrna sve tri vrste imaju po tri kolpe u čijem centralnom delu se nalazi po jedna pora, s tim što ona nije uvek jasno vidljiva. Kod hibridnih individua, međutim, javljaju se 3 tipa polenovih zrna kada je broj pora u pitanju: 3-, 9- i 12-kolporatna (Sl. 24). Sva tri tipa su nađena kod svih istraživanih hibridnih individua. Tri-kolporna polenova zrna su najzastupljenija i čine 81% polenovih zrna kod hibrida sa Oblika i 72% sa Radovanskog Kamena.



**Slika 24.** SEM fotografije polenovih zrna: 1 – *R. myconi*; 2 – *R. nathaliae*; 3 – *R. serbica*; 4 – Polen sa 3 pore kod hibridnih individua; 5 - Polen sa 9 pora kod hibridnih individua; 6 - Polen sa 12 pora kod hibridnih individua (a – ekvatorijalni izgled, b – polarni izgled, c – detalji ornamentacije egzine).



**Slika 25.** Histogram učestalosti različitih kategorija polena u odnosu na oblik zrna kod tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua.

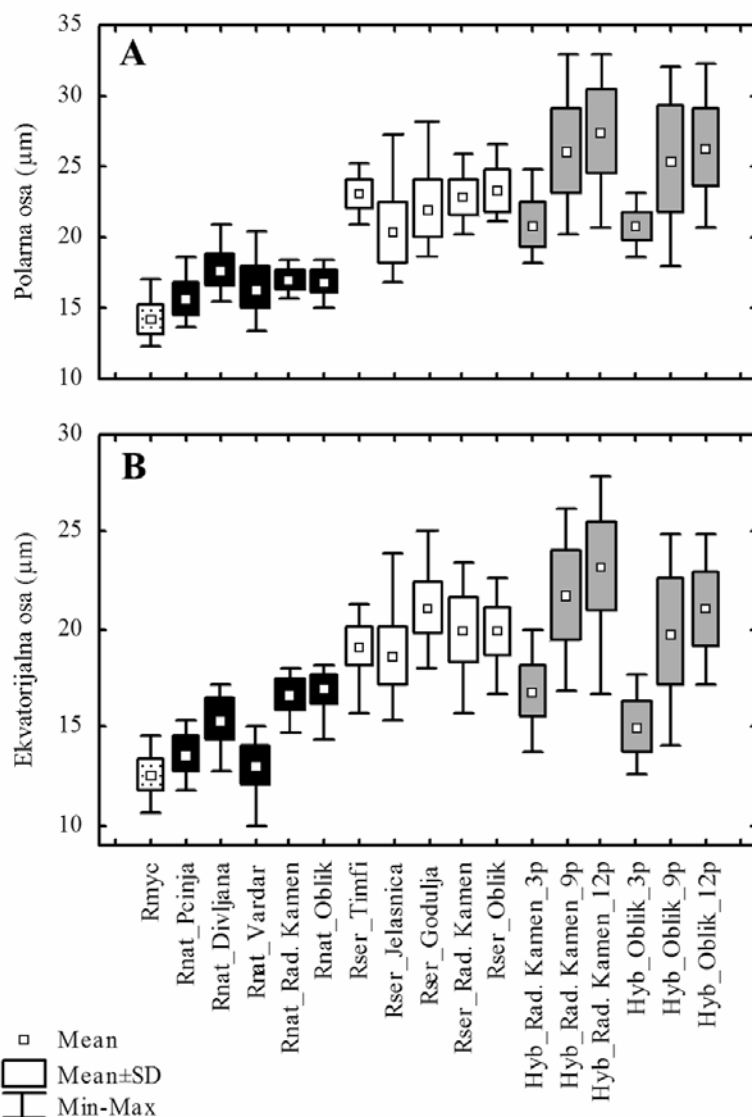
Polenova zrna vrsta *R. myconi* i *R. nathaliae* su mala (dužina polarne ose od 12 do 21  $\mu\text{m}$ , a ekvatorijalne od 10 do 18  $\mu\text{m}$ ), dok su kod vrste *R. serbica* male do srednje veličine (dužina polarne ose od 16 do 28  $\mu\text{m}$ , a ekvatorijalne od 15 do 25  $\mu\text{m}$ ) (Tab. 12). *Ramonda myconi* ima najmanja, a *R. serbica* najveća polenova zrna među tri proučavane vrste (Sl. 26). Veoma malim polenovim zrnima karakteriše se populacija vrste *R. nathaliae* iz klisure reke Pčinje sa serpentinske podloge. Veličina polenovih zrna hibridnih individua je veoma varijabilna, naročito zrna koja imaju tri pore (Tab. 3). Polen hibrida sa Radovanskog Kamena je nešto veći nego kod hibrida sa Oblika.

**Tabela 12.** Morfologija polena tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua (vrednosti u  $\mu\text{m}$ ).

Vrsta	Lokalitet	Polarna osa (P)			Ekvatorijalna osa (E)			Debljina egzine			P/E		
		Min-Max	Srednja vrednost ( $\pm\text{SD}$ )	CV (%)	Min-Max	Srednja vrednost ( $\pm\text{SD}$ )	CV (%)	Min-Max	Srednja vrednost ( $\pm\text{SD}$ )	CV (%)	Min-Max	Srednja vrednost ( $\pm\text{SD}$ )	CV (%)
<i>R. myconi</i>	Šp: Katalonija	<b>12.17-17.15</b>	<b>14.24 (1.00)</b>	<b>7.06</b>	<b>10.63-14.53</b>	<b>12.57 (0.82)</b>	<b>6.55</b>	<b>0.53-2.12</b>	<b>1.29 (0.37)</b>	<b>28.71</b>	<b>0.93-1.33</b>	<b>1.14 (0.10)</b>	<b>8.49</b>
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Pčinja	13.55-18.64	15.65 (1.07)	6.85	11.84-15.46	13.65 (0.87)	6.38	0.53-1.57	0.86 (0.23)	26.33	0.95-1.54	1.15 (0.12)	10.21
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Divljana	15.49-20.87	17.76 (1.15)	6.48	12.84-17.16	15.47 (1.05)	6.79	0.86-1.47	1.16 (0.17)	14.35	0.98-1.50	1.15 (0.09)	8.03
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Vardar	13.44-20.45	16.47 (1.49)	9.07	9.98-15.00	13.11 (1.02)	7.77	0.64-1.37	0.97 (0.19)	19.91	1.01-1.68	1.26 (0.15)	12.06
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Radovanski Kamen	15.64-18.40	16.95 (0.69)	4.04	14.68-18.06	16.74 (0.76)	4.55	0.59-1.76	1.13 (0.29)	25.90	0.89-1.15	1.01 (0.05)	5.03
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Oblik	15.01-18.41	16.90 (0.78)	4.63	14.42-18.23	16.97 (0.71)	4.20	0.59-1.57	1.07 (0.22)	20.28	0.90-1.11	1.00 (0.04)	4.23
<i>R. nathaliae</i>	<b>Srednja vrednost</b>	<b>13.44-20.87</b>	<b>16.75 (1.27)</b>	<b>7.59</b>	<b>9.98-18.23</b>	<b>15.19 (1.81)</b>	<b>11.91</b>	<b>0.53-1.76</b>	<b>1.04 (0.25)</b>	<b>23.86</b>	<b>0.89-1.68</b>	<b>1.12 (0.14)</b>	<b>12.59</b>
<i>R. serbica</i>	Gr: Timfi	20.91-25.20	23.09 (1.08)	4.66	15.66-21.35	19.21 (1.03)	5.36	0.59-1.58	1.09 (0.20)	18.46	1.07-1.59	1.21 (0.10)	7.92
<i>R. serbica</i>	Srb: Jelašnička klisura	16.80-27.36	20.35 (2.08)	10.22	15.37-23.96	18.68 (1.47)	7.89	0.63-1.46	1.02 (0.19)	18.28	0.90-1.39	1.09 (0.13)	12.17
<i>R. serbica</i>	Srb: Godulja	18.69-28.10	22.00 (2.03)	9.22	17.99-25.13	21.14 (1.33)	6.31	0.74-1.86	1.21 (0.24)	19.40	0.83-1.51	1.05 (0.13)	12.10
<i>R. serbica</i>	Srb: Radovanski Kamen	20.20-25.84	22.87 (1.33)	5.82	15.73-23.39	19.98 (1.63)	8.13	0.59-1.56	1.13 (0.23)	19.98	0.97-1.49	1.15 (0.10)	8.75
<i>R. serbica</i>	Srb: Oblik	21.07-26.67	23.31 (1.39)	5.96	16.65-22.62	19.97 (1.22)	6.12	0.59-1.68	1.10 (0.24)	22.06	0.95-1.44	1.17 (0.11)	9.38
<i>R. serbica</i>	<b>Srednja vrednost</b>	<b>16.80-28.10</b>	<b>22.32 (1.95)</b>	<b>8.73</b>	<b>15.37-25.13</b>	<b>19.80 (1.58)</b>	<b>7.98</b>	<b>0.59-1.86</b>	<b>1.11 (0.23)</b>	<b>20.41</b>	<b>0.83-1.59</b>	<b>1.13 (0.13)</b>	<b>11.19</b>
<i>Hibridi 3p</i>	Srb: Radovanski Kamen	18.24-24.69	20.93 (1.53)	7.33	13.71-20.05	16.91 (1.32)	7.82	0.74-1.72	1.12 (0.20)	17.61	1.04-1.52	1.24 (0.12)	9.56
<i>Hibridi 9p</i>	Srb: Radovanski Kamen	20.28-32.92	26.07 (2.91)	11.17	16.87-26.24	21.83 (2.35)	10.75	0.62-1.47	1.06 (0.21)	19.40	1.01-1.42	1.20 (0.10)	8.18
<i>Hibridi 12p</i>	Srb: Radovanski Kamen	20.62-33.06	27.43 (2.99)	10.89	16.75-27.93	23.34 (2.32)	9.93	0.79-1.40	1.08 (0.16)	15.09	0.95-1.58	1.18 (0.11)	9.75
<i>Hibridi 3p</i>	Srb: Oblik	18.64-23.18	20.87 (1.05)	5.06	12.57-17.64	15.07 (1.35)	8.94	0.86-1.51	1.08 (0.18)	16.98	1.13-1.68	1.40 (0.14)	9.84
<i>Hibridi 9p</i>	Srb: Oblik	17.99-32.14	25.57 (3.65)	14.27	14.10-24.99	19.87 (2.70)	13.57	0.56-1.49	0.96 (0.21)	21.71	0.97-1.58	1.29 (0.13)	9.80
<i>Hibridi 12p</i>	Srb: Oblik	20.59-32.35	26.33 (2.70)	10.26	17.22-24.93	21.09 (1.84)	8.74	0.53-1.39	0.96 (0.19)	20.31	1.01-1.65	1.26 (0.15)	11.99

**Tabela 2.** Nastavak

Vrsta	Lokalitet	Rastojanje između vrhova dve pore (d)			Ekvatorijalna osa u polarnom položaju (D)			Indeks apocolpiuma (polarne oblasti) (d/D)		
		Min-Max	Srednja vrednost (±SD)	CV (%)	Min-Max	Srednja vrednost (±SD)	CV (%)	Min-Max	Srednja vrednost (±SD)	CV (%)
<i>R. myconi</i>	Šp: Katalonija	<b>2.36-4.85</b>	<b>3.61 (0.66)</b>	<b>18.38</b>	<b>11.28-16.20</b>	<b>13.21 (1.08)</b>	<b>8.20</b>	<b>0.17-0.40</b>	<b>0.27 (0.05)</b>	<b>18.99</b>
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Pčinja	2.45-6.73	4.55 (1.05)	23.05	12.40-16.75	14.57 (0.90)	6.19	0.16-0.45	0.31 (0.07)	22.06
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Divljana	2.74-6.78	4.37 (0.90)	20.66	14.23-18.76	16.76 (0.94)	5.60	0.17-0.42	0.26 (0.06)	21.57
<i>R. nathaliae</i>	Mak: Vardar	2.30-5.56	3.72 (0.70)	18.72	12.15-17.08	14.52 (1.06)	7.29	0.16-0.38	0.26 (0.05)	19.14
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Radovanski Kamen	2.42-5.89	3.90 (0.81)	20.84	15.51-18.58	16.85 (0.70)	4.18	0.15-0.36	0.23 (0.05)	21.84
<i>R. nathaliae</i>	Srb: Oblik	2.62-5.77	4.22 (0.68)	16.06	15.49-19.24	17.13 (0.77)	4.51	0.15-0.33	0.25 (0.04)	15.99
<i>R. nathaliae</i>	<b>Srednja vrednost</b>	<b>2.30-6.78</b>	<b>4.15 (0.89)</b>	<b>21.33</b>	<b>12.15-19.24</b>	<b>15.97 (1.46)</b>	<b>9.16</b>	<b>0.15-0.45</b>	<b>0.26 (0.06)</b>	<b>22.86</b>
<i>R. serbica</i>	Gr: Timfi	2.94-9.71	5.81 (1.37)	23.50	17.24-22.78	19.52 (1.23)	6.30	0.17-0.48	0.30 (0.07)	22.64
<i>R. serbica</i>	Srb: Jelašnička klisura	3.29-7.41	5.68 (0.99)	17.41	12.98-25.83	21.06 (2.25)	10.67	0.16-0.36	0.27 (0.05)	17.53
<i>R. serbica</i>	Srb: Godulja	3.90-9.52	6.46 (1.43)	22.08	18.34-25.08	22.10 (1.40)	6.34	0.19-0.42	0.29 (0.06)	19.31
<i>R. serbica</i>	Srb: Radovanski Kamen	4.00-11.40	7.26 (1.46)	20.16	20.03-25.44	23.07 (1.25)	5.43	0.18-0.46	0.31 (0.06)	19.56
<i>R. serbica</i>	Srb: Oblik	5.16-9.69	6.91 (1.06)	15.31	19.57-24.56	22.39 (1.18)	5.25	0.23-0.43	0.31 (0.04)	14.43
<i>R. serbica</i>	<b>Srednja vrednost</b>	<b>2.94-11.40</b>	<b>6.43 (1.41)</b>	<b>21.87</b>	<b>12.98-25.83</b>	<b>21.63 (1.95)</b>	<b>9.01</b>	<b>0.16-0.48</b>	<b>0.30 (0.06)</b>	<b>19.43</b>
<i>Hibridi 3p</i>	Srb: Radovanski Kamen	3.85-7.60	5.39 (1.04)	19.19	16.40-24.02	20.35 (1.40)	6.87	0.18-0.39	0.27 (0.05)	19.33
<i>Hibridi 9p</i>	Srb: Radovanski Kamen									
<i>Hibridi 12p</i>	Srb: Radovanski Kamen									
<i>Hibridi 3p</i>	Srb: Oblik	3.82-7.96	5.26 (0.85)	16.21	16.49-21.99	19.55 (1.38)	7.07	0.19-0.40	0.27 (0.04)	16.49
<i>Hibridi 9p</i>	Srb: Oblik									
<i>Hibridi 12p</i>	Srb: Oblik									



**Sl. 26.** Veličina polena u proučavanim populacijama roda *Ramonda*: A – dužina polarne ose, B – dužina ekvatorijalne ose (u  $\mu\text{m}$ ).

Egzina je najtanja kod vrste *R. nathaliae* i hibridnih individua, a najdeblja je kod *R. myconi*, kod koje ovaj karakter i najviše varira (Tab. 12). Najtanja egzina među svim proučavanim populacijama zabeležena je kod populacije *R. nathaliae* sa serpentinita. Ornamentacija egzine je mikroretikularno-perforirana kod sve tri vrste. Međutim, razlikuju se po detaljima površine egzine, a pre svega po veličini lumena koja je najveća kod *R. serbica* (Tab. 13). Razlike u veličini lumena između apo- i mezokolpiuma uočljive su samo kod vrste *R. myconi*.

**Tabela 13.** Karakteristike ornamentacije egzine polenovih zrna tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua (u zagradi SD, P - polarna oblast, E – ekvatorijalna oblast).

Vrsta	Broj kolpi	Širina lumena (μm)		Širina zida lumena (μm)		Odnos širina lumena/širina zida		Br. perforacija po lumenu		Br. lumena / 25 μm <sup>2</sup>	
		P	E	P	E	P	E	P	E	P	E
<i>R. myconi</i>	3	0.14 (0.06)	0.24 (0.07)	0.18 (0.03)	0.15 (0.04)	0.82 (0.32)	1.74 (0.88)	1-4	1-3	149	221
<i>R. nathaliae</i>	3	0.14 (0.04)	0.12 (0.04)	0.13 (0.03)	0.14 (0.03)	1.13 (0.42)	0.92 (0.36)	1-6	1-3	330	>330
<i>R. serbica</i>	3	0.36 (0.11)	0.37 (0.12)	0.19 (0.03)	0.18 (0.05)	1.87 (0.59)	2.31 (1.44)	1-5	1-4	116	99
Hibridi	3	0.29 (0.06)	0.24 (0.10)	0.18 (0.03)	0.19 (0.04)	1.62 (0.44)	1.32 (0.56)	1-3	1-3	114	170
Hibridi	9	0.39 (0.11)	0.31 (0.09)	0.20 (0.04)	0.20 (0.06)	1.94 (0.53)	1.61 (0.45)	1-4	1-5	104	100
Hibridi	12	0.37 (0.09)	0.34 (0.10)	0.20 (0.05)	0.14 (0.04)	1.98 (0.65)	2.52 (0.85)	1-4	1-4	136	160

Karakteristike apokolpiuma su veoma varijabilne (Tab. 12). Rastojanje između vrhova dve pore (d) je najmanje kod *R. myconi* (3.61 μm), dok je gotovo duplo veće kod *R. serbica* (6.43 μm). Kod hibridnih individua ovaj parametar je meren samo kod polenovih zrna sa tri pore. Njegova veličina bila je intermedijarna u odnosu na vrednosti kod *R. nathaliae* i *R. serbica*. Vrednosti indeksa apokolpiuma slične su kod *R. nathaliae* i *R. myconi*, dok su malo veće kod *R. serbica* (Tab. 12).

Rezultati analize varijanse (ANOVA) praćeni Post-hoc Scheffe testom pokazali su da sve merene karakteristike polena imaju statistički značajan, ali ne i podjednak uticaj pri verovatnoći p = 0.000 (Tab. 14). Pri tom, četiri parametra (dužina polarne i ekvatorijalne ose, dužina ekvatorijalne ose pri polarnom položaju zrna i rastojanje između vrhova dve pore) pružaju podatke na osnovu kojih se tri vrste mogu razlikovati. Prve dve ose pri analizi glavnih komponenti opisuju oko 60% varijabilnosti uzorka. Kao glavni faktori koji doprinose ovoj varijabilnosti pojavljuju se upravo četiri karaktera pomenuta pri ANOVA analizi (Tab. 15). Prva osa koja opisuje 41,5% varijabilnosti razdvaja populacije *R. myconi* i *R. nathaliae* od vrste *R. serbica* (Sl. 27). Hibridne individue se nalaze velikim delom u prostoru između njih. Druga osa ne dovodi do daljih razdvajanja. Analiza glavnih komponenti ukazuje i na postojanje blagog grupisanja u okviru vrste *R. nathaliae*, tako da su populacije iz Makedonije međusobno sličnije i postavljene bliže vrsti *R. myconi* nego što je to slučaj sa populacijama te vrste iz Srbije (Sl. 27).

**Tabela 14.** Vrednosti F-statistike u okviru analize varijanse uradjeni za sve uzorke zajedno u odnosu na pripadnost populacijama, odvojeno za pojedinačne vrste, kao i za sve uzorke u zavisnosti od pripadnosti vrsti, bez obzira na populaciju. Sve vrednosti su statistički značajne pri  $p=0,000$ .

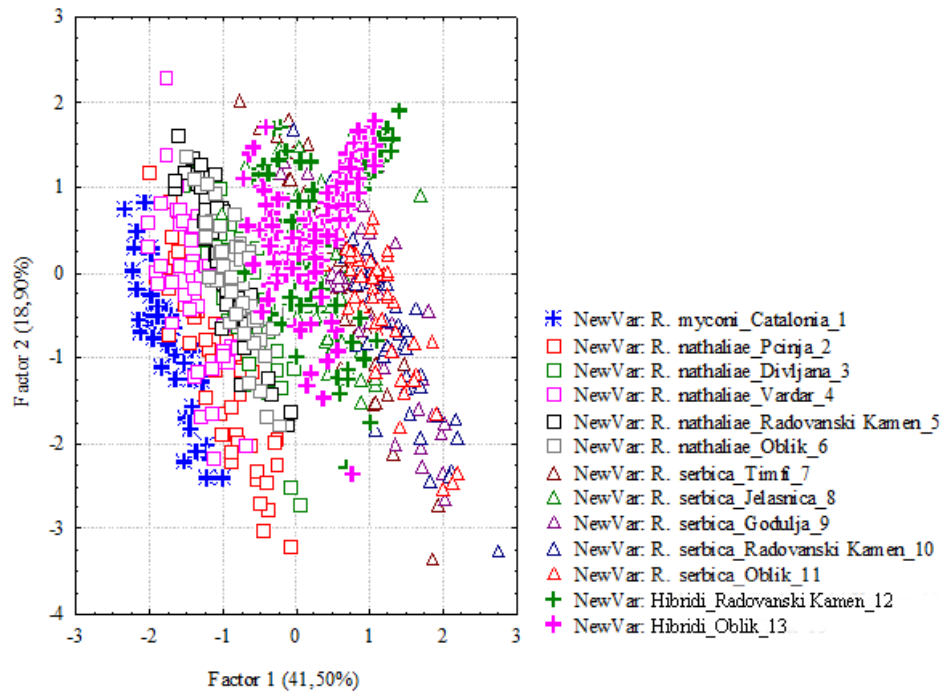
	F			
	populacije- ukupno za sve uzorke	<i>R. nathaliae</i>	<i>R. serbica</i>	vrste-ukupno za sve uzorke
polarna osa (P)	157,22	25,49829	27,66234	424,481
ekvatorijalna osa (E)	106,98	194,1773	23,70781	236,353
debljina egzine	13,09	15,42574	5,237086	17,536
rastojanje izmedju vrhova dve pore (d)	69,61	8,118226	14,26177	157,307
ekvatorijalna osa pri polarnom izgledu (D)	339,34	108,9290	41,74428	530,442
Indeks apocolpiuma (d/D)	11,67	15,87006	4,468677	12,743
P/E	47,33	61,46580	15,68137	63,987

**Tabela 15.** Opterećenja analiziranih karaktera polena u odnosu na PCA ose.

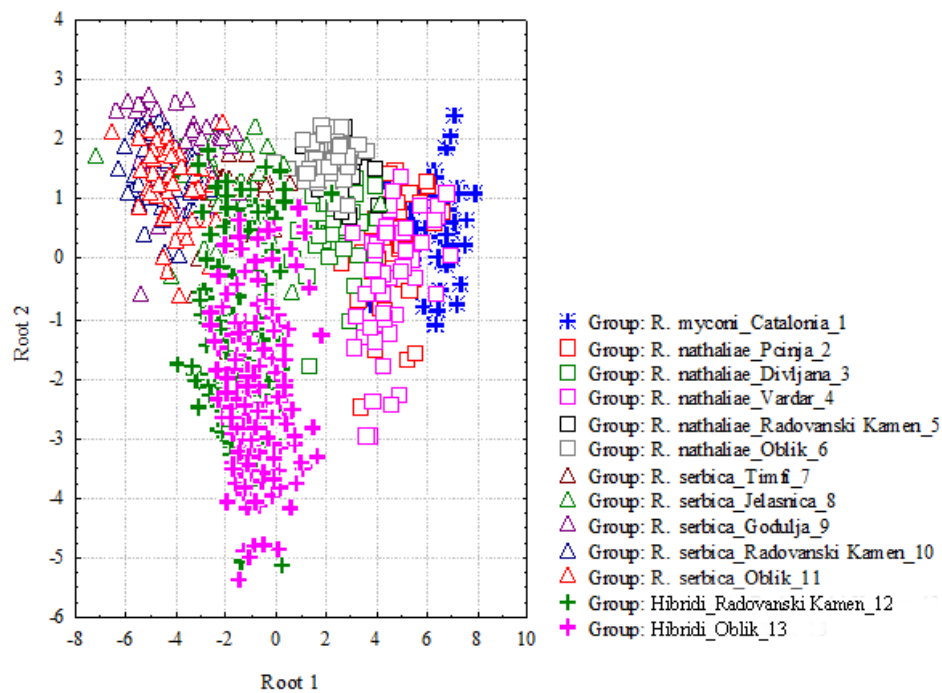
	Factor 1	Factor 2	Factor 3
polarna osa (P)	0,794686	0,510570	-0,206991
ekvatorijalna osa (E)	0,794934	0,372524	0,342589
debljina egzine	-0,004165	-0,094617	0,370253
rastojanje izmedju vrhova dve pore (d)	0,856545	-0,488530	-0,053293
ekvatorijalna osa pri polarnom izgledu (D)	0,804655	0,091642	0,207050
Indeks apocolpiuma (d/D)	0,499826	-0,771407	-0,269748
P/E	0,103859	0,269682	-0,889948

Diskriminantna analiza ukazala je na finije razdvajanje *R. myconi* i *R. nathaliae* s jedne strane prve ose, dok su najveći broj hibrida i populacije vrste *R. serbica* ostali s druge strane ose (Sl. 28). Uočljivo je da su karakteristike polena jasno razdvojile dve balkanske vrste, ali ne i *R. myconi* od *R. nathaliae*. I dalje je uočljiva podela populacija *R. nathaliae* na dve grupe: jednu čine populacije iz Makedonije, a drugu populacije iz Srbije. Karakteristike polenovih zrna jasno odvajaju hibridne individue od roditeljskih s obzirom na heterogenost u veličini, obliku i broju pora.



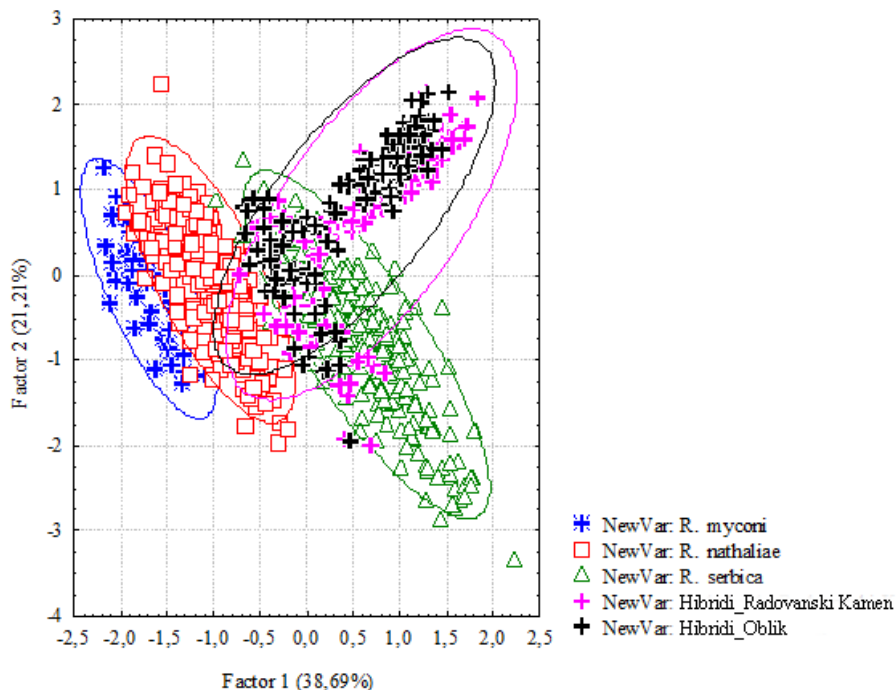


**Slika 27.** Grafički prikaz rezultata analize glavnih komponenti (PCA) karakteristika polena tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua u odnosu na prve dve koordinatne ose.



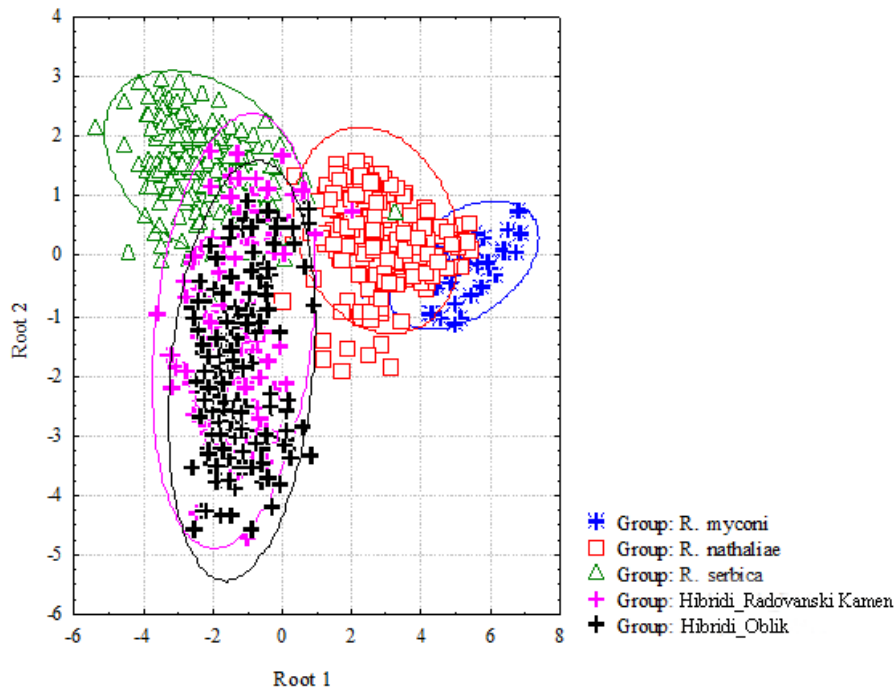
**Slika 28.** Grafički prikaz rezultata diskriminantne analize (CDA) karakteristika polenovih zrna vrsta roda *Ramonda* u odnosu na prve dve diskriminantne ose.

Kada se analiza glavnih koordinata kao i diskriminantna analiza urade uzimajući u obzir samo pripadnost individua vrstama, a ne i populacijama, odnosi između vrsta postaju očigledniji. Grafici analize glavnih komponenti, kao i diskriminantne analize pokazuju delimično preklapanje karakteristika polena dve diploidne vrste, *R. myconi* i *R. nathaliae*, dok su razlike između dve balkanske vrste roda *Ramonda* na nivou polena mnogo jasnije i uočljivije (Sl. 29, Sl. 30).

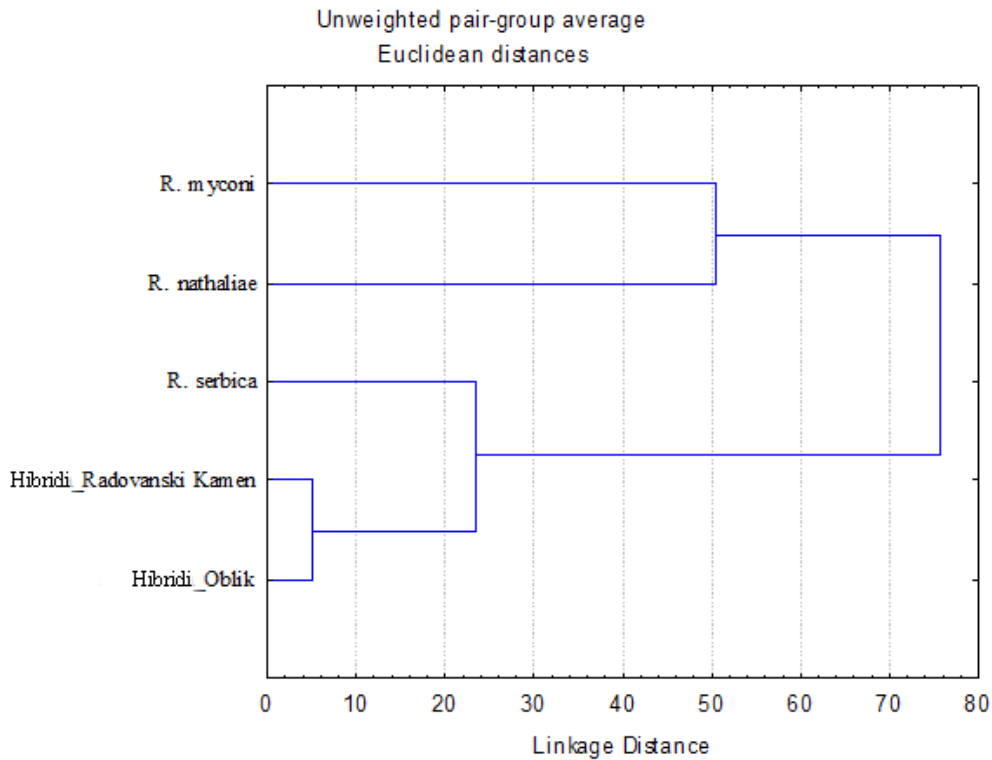


**Slika 29.** Grafički prikaz analize glavnih komponenti (PCA) za karakteristike polena tri vrste roda *Ramonda* samo u zavisnosti od pripadnosti određenoj vrsti.

Ukoliko ove podatke predstavimo u obliku srodničkog stabla na osnovu Mahalanobis distanci dobijenih diskriminantnom analizom, opet se može uočiti veća sličnost dve diploidne vrste u zavisnosti od karakteristika polena (Sl. 31).



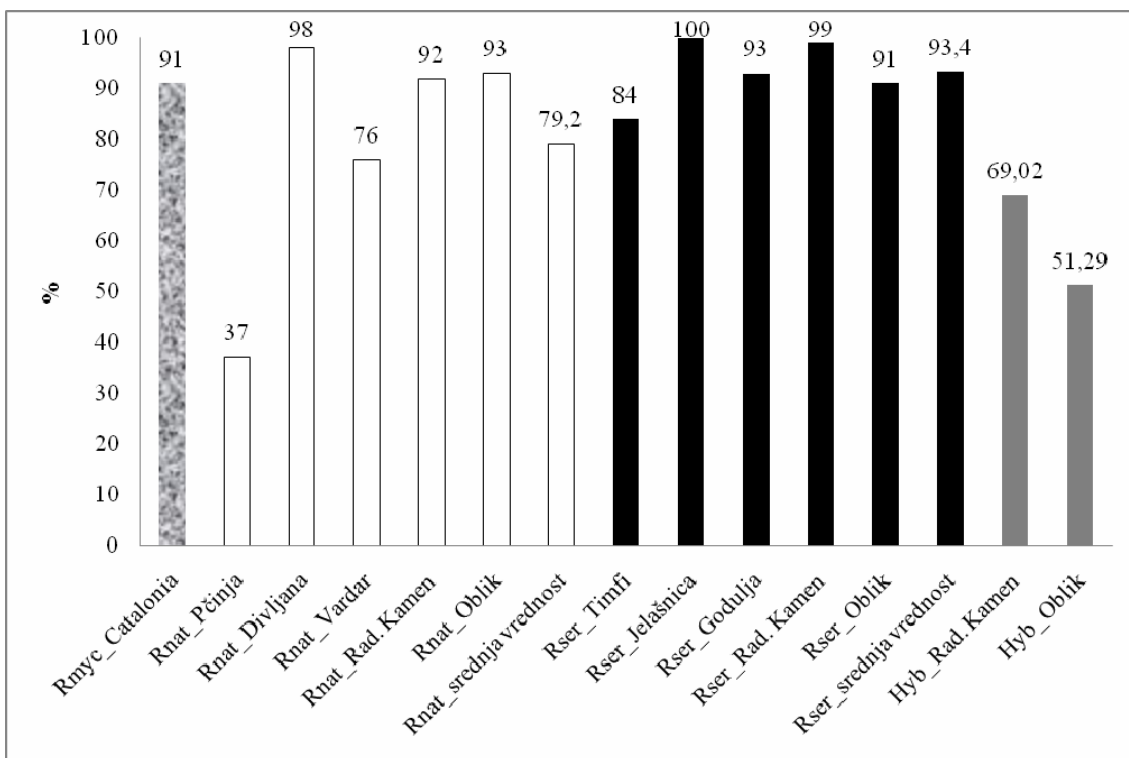
**Slika 30.** Grafički prikaz rezultata diskriminantne analize (CDA) za karakteristike polena tri vrste roda *Ramonda* samo u zavisnosti od pripadnosti određenoj vrsti.



**Slika 31.** Srodničko stablo dobijeno na osnovu karakteristika polena tri vrste roda *Ramonda*.

#### 4. 2. 1. Vijabilnost polena

Sve tri vrste odlikuju se visokom vijabilnošću polena (Sl. 40). Izuzetak predstavlja populacija *R. nathaliae* iz klisure reke Pčinje sa serpentinske podloge čiji je polen slabije vijabilnosti. Kod hibridnih individua, vijabilnost polena je manja nego kod roditeljskih vrsta. Osim toga, vijabilnost 9- i 12-kolporatnog polena je za 11-16% veća nego kod normalnog 3-kolporatnog.



**Slika 40.** Histogram vijabilnosti polena (%) istraživanih populacija tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua.

#### 4. 2. 2. Korelacija karakteristika polena sa veličinom genoma i geografskim položajem

Analiza koeficijenta korelacije između karakteristika polena i 2C- vrednosti, 1Cx-vrednosti i broja hromozoma za sve populacije uključene u istraživanje polena, ukazala je na statistički značajnu i visoku korelaciju pre svega između ekvatorijalne ose

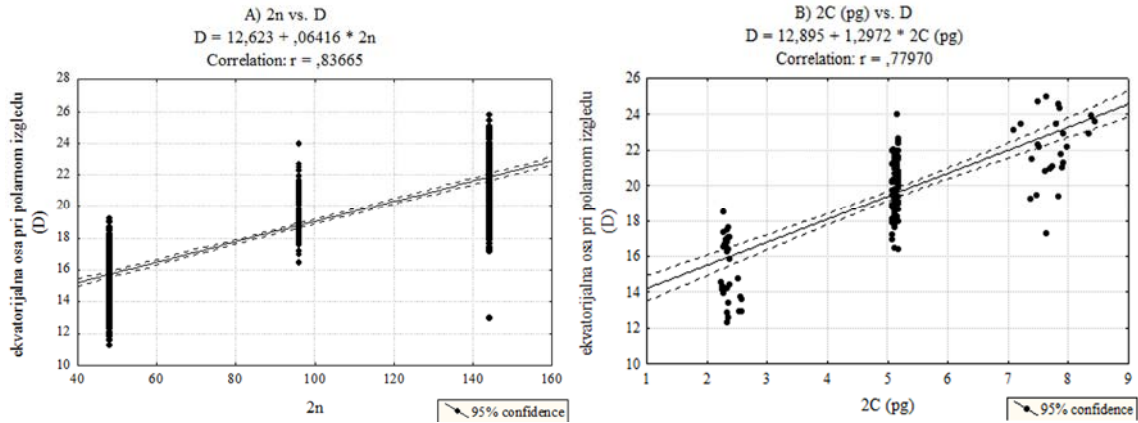
pri polarnom izgledu (D) i pomenutih citoloških parametara (Tab. 16, Sl. 41). Umerena korelacija je uočena i između citoloških parametara i dužina polarne i ekvatorijalne ose, kao i rastojanja između vrhova dve pore (d) (Tab. 16). Kada je u pitanju povezanost karakteristika polena sa geografskom širinom, geografskom dužinom i nadmorskom visinom, ona je na nivou roda statistički značajna, ali relativno niska (Tab. 16). Nešto veća korelacija postoji samo između geografske dužine i dimenzija polarne i ekvatorijalne ose, kao i nadmorske visine i dužine ekvatorijalne ose (Tab. 16).

**Tabela 16.** Vrednosti koeficijenta korelacije između karakteristika polena i citoloških parametara i geografskog položaja na nivou roda. Vrednosti obeležene \* su značajne za  $p < 0,01$ . Vrednosti  $\geq 0,5$  su zasenčene.

	Geografska sirina	Geografska dužina	Nadmorska visina	2C (pg)	1Cx (pg)	2n
P axis	0,23*	0,38*	0,28*	0,34*	0,28*	0,59*
E axis	0,28*	0,38*	0,39*	0,31*	0,26*	0,61*
exine thickness	0,05	-0,23*	0,28*	0,18*	0,09	0,04
broj pora	0,29*	0,16*	0,10*	0,05	0,13	0,05
rastojanje između vrhova 2 pore (d)	0,12*	0,27*	0,23*	0,54*	0,31*	0,70*
ekvatorijalna osa pri polarnom izgledu (D)	0,31*	0,44*	0,31*	0,78*	0,61*	0,84*
Apocolpium (polar area) index (d/D)	-0,12*	0,00	0,05	0,12	-0,03	0,25*
P/E	-0,06	0,08	-0,15*	0,06	0,04	0,06
2C (pg)	0,06	0,25*	0,28*	1,00	0,55*	0,99*
Cx (pg)	0,21*	0,02	0,28*	0,55*	1,00	0,57*
2n	0,01	0,26*	0,35*	0,99*	0,57*	1,00

Kada se, međutim, analiziraju dve balkanske vrste zasebno, dobijaju se nešto drugačije vrednosti. Kod *R. nathaliae* dolazi do izražaja uticaj geografskog položaja na karakteristike polena (Tab. 17). Najveće vrednosti korelacije zabeležene su između geografske širine i dužine ekvatorijalne ose (Sl. 42A), geografske dužine i dimenzija ekvatorijalne ose pri polarnom izgledu (Sl. 42B), kao i nadmorske visine i ekvatorijalne ose (Sl. 42C). Povezanost karakteristika polena sa citološkim parametrima kod ove vrste nije statistički značajna (Tab. 17). S druge strane, kada je u pitanju vrsta *R. serbica*,

uočljiva je statistički značajna, ali umerena zavisnost između veličine genoma i nadmorske visine, kao i dužine ekvatorijalne ose (D) i geografske širine (Tab. 18).



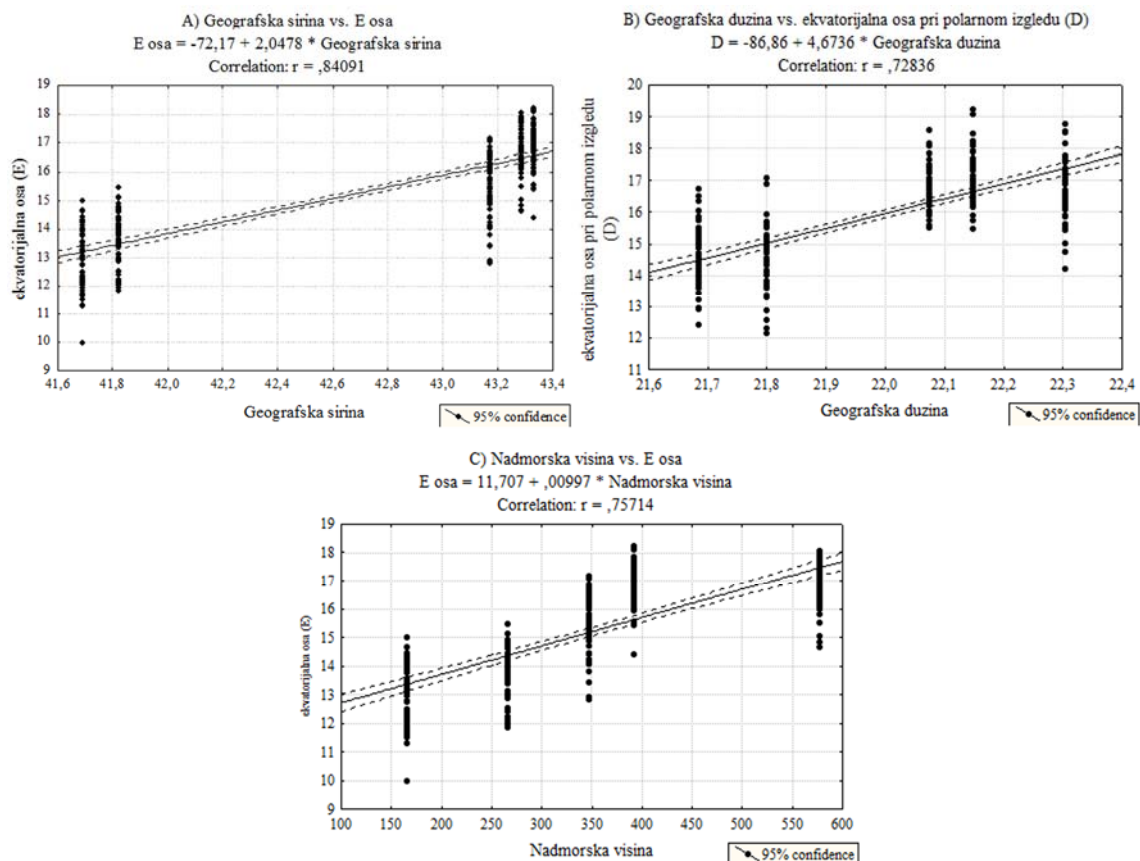
**Slika 41.** Grafički prikaz korelacije na nivou roda između dužine ekvatorijalne ose pri polarnom izgledu (D) i A) broja hromozoma (2n) i B) 2C-vrednosti.

**Tabela 17.** Vrednosti koeficijenta korelacije između karakteristika polena i citoloških parametara i geografskog položaja za vrstu *R. nathaliae*. Vrednosti obeležene \* su značajne za  $p < 0,01$ .

	Geografska sirina	Geografska dužina	Nadmorska visina	2C (pg)	Cx (pg)
<b>P axis</b>	0,41*	0,52*	0,22*	0,30	0,30
<b>E axis</b>	0,84*	0,67*	0,76*	0,16	0,16
<b>exine thickness</b>	0,39*	0,42*	0,29*	-0,04	-0,04
<b>broj pora</b>					
<b>rastojanje između vrhova 2 pore (d)</b>	0,03	0,02	-0,01	-0,25	-0,25
<b>ekvatorijalna osa pri polarnom izgledu (D)</b>	0,80*	0,73*	0,63*	0,05	0,05
<b>Apocolpium (polar area) index (d/D)</b>	-0,30*	-0,29*	-0,26*	-0,26	-0,26
<b>P/E</b>	-0,58*	-0,35*	-0,61*	0,15	0,15
<b>2C (pg)</b>	0,22	0,34	0,07	1,00	1,00
<b>Cx (pg)</b>	0,22	0,34	0,07	1,00	1,00

**Tabela 18.** Vrednosti koeficijenta korelacije između karakteristika polena i citoloških parametara i geografskog položaja za vrstu *R. serbica*. Vrednosti obeležene \* su značajne za  $p < 0,01$ .

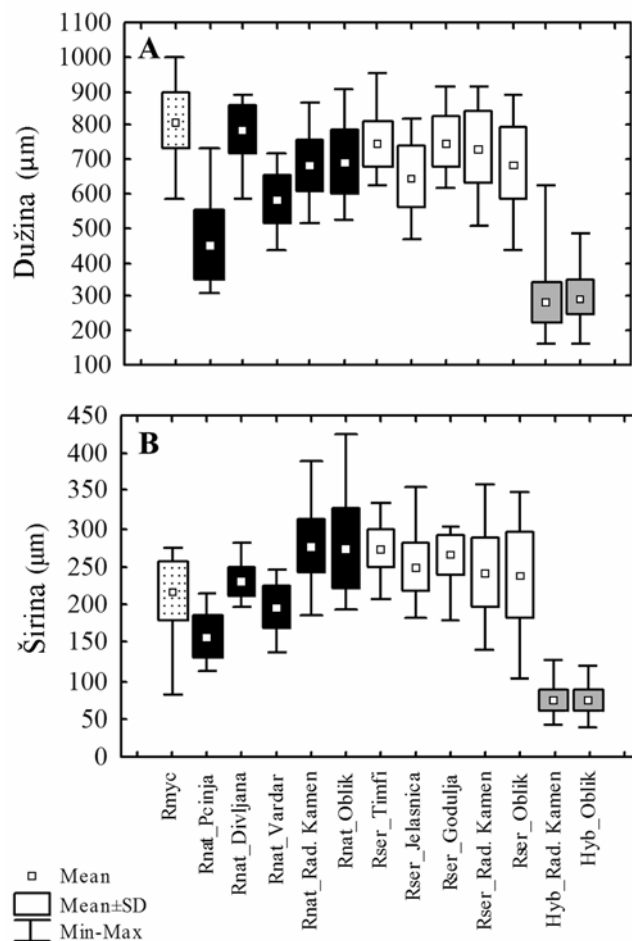
	Geografska sirina	Geografska duzina	Nadmorska visina	2C (pg)	Cx (pg)
P axis	-0,19*	-0,03	0,21*	-0,03	-0,03
E axis	0,14	-0,28*	0,35*	-0,10	-0,11
exine thickness	0,02	-0,18*	0,23*	-0,07	-0,06
broj pora					
rastojanje izmedju vrhova 2 pore (d)	0,22*	0,13	0,05	-0,08	-0,08
ekvatorijalna osa pri polarnom izgledu (D)	0,54*	0,23*	-0,05	0,20	0,20
Apocolpium (polar area) index (d/D)	0,00	0,04	0,07	-0,15	-0,14
P/E	-0,25*	0,16	-0,07	0,04	0,05
2C (pg)	0,28	0,46	-0,54*	1,00	1,00*
Cx (pg)	0,28	0,46	-0,54*	1,00*	1,00



**Slika 42.** Grafički prikaz korelacija kod vrste *R. nathaliae* između A) geografske širine i ekvatorijalne ose (E), B) geografske dužine i ekvatorijalne ose pri polarnom izgledu (D) i C) nadmorske visine i ekvatorijalne ose (E).

### 4. 3. KARAKTERISTIKE MORFOLOGIJE SEMENA

Semena tri vrste roda *Ramonda* su sitna, dužine manje od 1 mm i širine manje od 0.5 mm. Elipsoidnog su oblika i tamno braon boje. U jednoj čauri se razvija veliki broj semena. Najduža su semena vrste *R. myconi*, koja ujedno imaju i najizduženiji oblik (Tab. 19, Sl. 43). Semena dve balkanske vrste imaju isti odnos dužine i širine, s tim što su kod vrste *R. serbica* ona nešto duža i šira nego kod *R. nathaliae*. Najmanja semena su izmerena u populaciji vrste *R. nathaliae* sa serpentinita. Izuzetak predstavljaju još sitnija semena hibridnih individua koja su 2-2.5 puta kraća i 3-3.5 puta uža od semena roditeljskih vrsta (Tab. 19).



Sl. 43. Dužina (A) i širina semena (B) (u  $\mu\text{m}$ ) u proučavanim populacijama roda *Ramonda*.



**Tabela 19.** Morfologija semena tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua.

Vrsta	Lokalitet	Dužina (µm)					Širina (µm)					Dužina/Širina					Masa semena (µg)	
		sr.vr.	sd	min	max	CV (%)	sr.vr.	sd	min	max	CV (%)	sr.vr.	sd	min	max	CV (%)	sr.vr.	sd
<b><i>R. myconi</i></b>	Sp: Katalonia	<b>814.47</b>	<b>81.57</b>	<b>583.45</b>	<b>1001.34</b>	<b>10.02</b>	<b>217.77</b>	<b>38.88</b>	<b>81.52</b>	<b>272.63</b>	<b>17.85</b>	<b>3.89</b>	<b>0.97</b>	<b>2.83</b>	<b>8.17</b>	<b>24.94</b>	<b>17.4</b>	<b>1.52</b>
<b><i>R. nathaliae</i></b>	Mak: Pčinja	450.95	102.58	309.56	733.54	22.75	158.68	28.54	111.36	215.24	17.99	2.93	0.87	1.90	5.73	29.62	16.0	2.00
	Srb: Divljana	785.85	68.68	583.52	890.60	8.74	230.44	20.14	195.87	280.80	8.74	3.44	0.46	2.13	4.39	13.48	19.6	0.89
	Mak: Vardar	584.10	70.95	432.67	720.33	12.15	197.28	28.26	137.48	247.64	14.32	3.00	0.45	2.19	4.58	14.94	9.8	2.49
	Srb: Rad. Kamen	682.75	71.44	513.40	863.84	10.46	278.84	35.52	185.79	390.84	12.74	2.48	0.39	1.73	3.76	15.73	21.6	3.21
	Srb: Oblik	692.51	94.44	522.42	907.67	13.64	275.20	53.41	192.02	425.17	19.41	2.56	0.38	1.91	3.67	14.71	23.33	1.15
	<b>Srednja vrednost</b>	<b>639.23</b>	<b>140.52</b>	<b>309.56</b>	<b>907.67</b>	<b>21.98</b>	<b>228.09</b>	<b>57.7</b>	<b>111.36</b>	<b>425.17</b>	<b>25.30</b>	<b>2.88</b>	<b>0.64</b>	<b>1.73</b>	<b>5.73</b>	<b>22.11</b>	<b>18.066</b>	<b>5.37</b>
<b><i>R. serbica</i></b>	Gr: Timfi	746.61	67.95	625.28	954.20	9.10	275.32	25.41	207.13	335.28	9.23	2.73	0.33	1.98	3.42	12.18	27.6	1.82
	Srb: Jelašnica	649.13	88.26	465.63	820.10	13.60	250.59	32.27	183.98	354.10	12.88	2.64	0.55	1.58	4.24	20.67	20.8	1.09
	Srb: Godulja	752.23	72.43	618.24	912.87	9.63	265.90	25.30	180.23	303.74	9.51	2.86	0.40	2.22	3.76	13.85	25.6	1.14
	Srb: Rad. Kamen	734.90	104.37	505.11	909.04	14.20	242.32	45.12	140.63	357.26	18.62	3.15	0.81	1.84	5.82	25.68	20.8	1.30
	Srb: Oblik	688.93	105.17	435.82	888.86	15.27	240.06	56.16	101.22	348.40	23.40	3.05	0.98	1.71	7.11	32.18	17.6	5.90
	<b>Srednja vrednost</b>	<b>714.36</b>	<b>96.74</b>	<b>435.82</b>	<b>954.20</b>	<b>13.54</b>	<b>254.84</b>	<b>40.83</b>	<b>101.22</b>	<b>357.26</b>	<b>16.02</b>	<b>2.88</b>	<b>0.68</b>	<b>1.58</b>	<b>7.11</b>	<b>23.63</b>	<b>22.48</b>	<b>4.04</b>
<b>Hibridi</b>	Srb: Rad. Kamen	284.47	58.12	161.52	622.69	20.43	74.75	13.46	43.90	126.61	18.00	3.88	0.85	2.15	8.64	21.81		
	Srb: Oblik	297.87	51.03	166.46	481.00	17.13	72.96	14.27	38.63	118.07	19.56	4.18	0.84	2.45	9.80	20.02		
	<b>Srednja vrednost</b>	<b>291.17</b>	<b>55.07</b>	<b>161.52</b>	<b>622.69</b>	<b>18.91</b>	<b>73.86</b>	<b>13.89</b>	<b>38.63</b>	<b>126.61</b>	<b>18.81</b>	<b>4.03</b>	<b>0.85</b>	<b>2.15</b>	<b>9.80</b>	<b>21.20</b>		

Analiza varijanse ukazala je na postojanje značajnih razlika kako između vrsta tako i među istraživanim populacijama kada su u pitanju dužina i širina semena, a u manjoj meri i za odnos ova dva parametra (Tab. 20). Dok su razlike među populacijama vrste *R. nathaliae* za karakteristike semena znatne, između populacija *R. serbica* one su male.

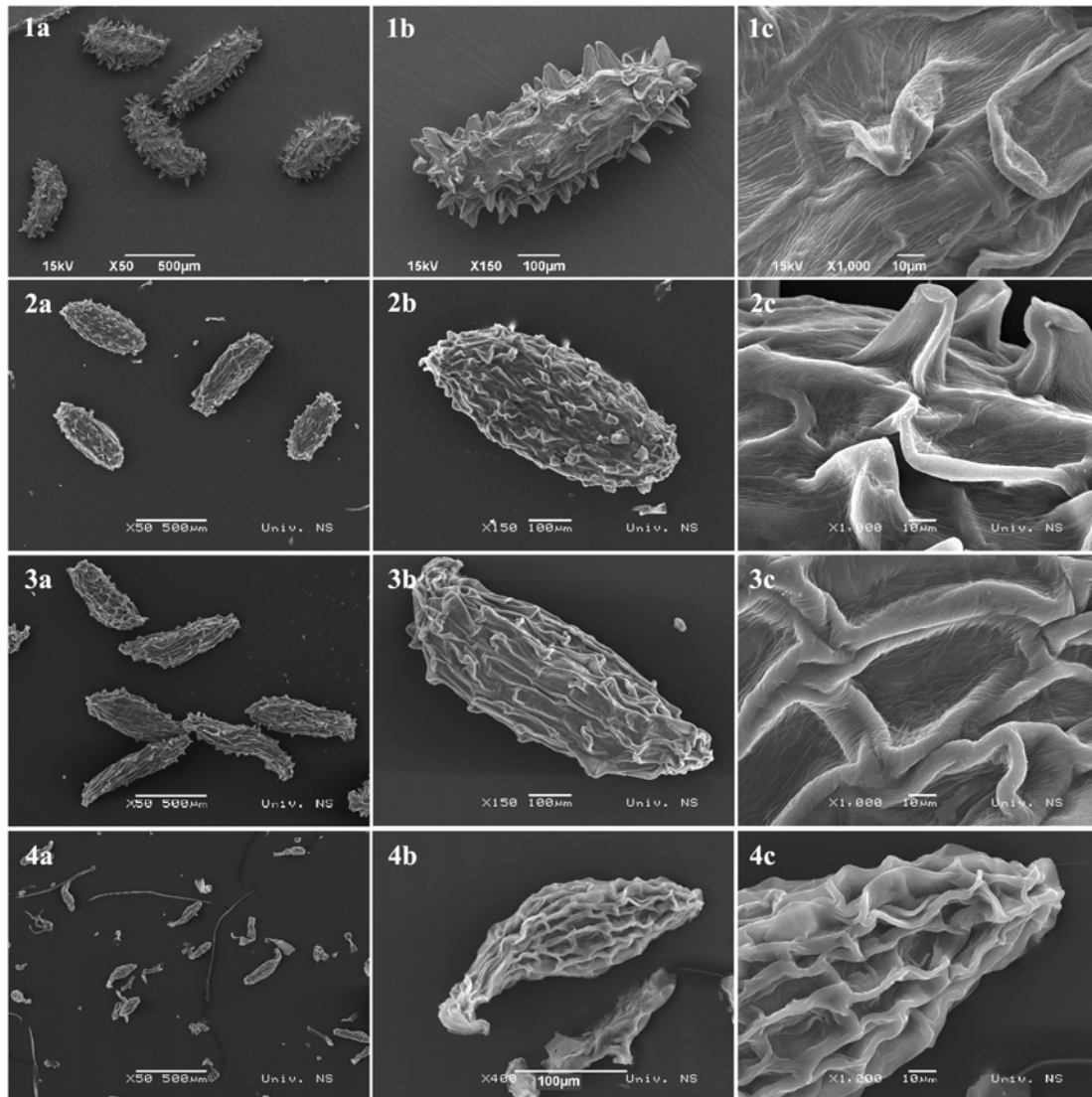
**Tabela 20.** Vrednosti F statistike analize varijanse za proučavane karakteristike semena tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua. Sve vrednosti su statistički značajne za  $p < 0.01$ .

	F			
	između populacija	<i>R. nathaliae</i>	<i>R. serbica</i>	između vrsta
Dužina (µm)	521,80	117,94	12,30	808,78
Širina (µm)	524,10	107,68	7,78	832,46
D/Š	47,07	25,20	5,09	114,81
Masa semena (ng)	18,31	26,41	9,66	7,18

Pošto su semena vrsta roda *Ramonda* veoma lagana, mereno je pet puta po 100 semena, pa je zatim računata prosečna masa jednog semena. Rezultati su pokazali da *R. myconi* ima najlakša, a *R. serbica* najteža semena (Tab. 19). Individue *R. nathaliae* iz simpatrijskih populacija odlikuju se težim semenima od onih koje rastu u čistim populacijama. S druge strane, kod *R. serbica* individue iz simpatrija imaju nešto lakša semena no što je to slučaj sa čistim populacijama te vrste.

Površina semena je hrapava, retikularna, sa brojnim dodatnim strukturama (Sl. 44). Lumeni na površini semena su izduženi, međusobno jasno odvojeni i vidljivi kod svih individua. Njihove dimenzije su najveće kod *R. myconi*, a najmanje kod *R. nathaliae* (Tab. 21). Odnos između dužine semena i dužine lumena je slična kod *R. myconi* (7.26) i *R. serbica* (6.90), dok je kod vrste *R. nathaliae* (8.63) i naročito kod hibridnih individua (9.45) veći, što ukazuje na manje lumene njihovih semena. Površina semena je veoma slična kod tri vrste sa pravim, blago izdignutim antiklinalnim zidovima. Delimično se razlikuju po obliku lumena koji su izduženi kod sve tri vrste, ali

su kod *R. myconi* i *R. nathaliae* četvero- do šestougaoni, dok su kod *R. serbica* četvero- do petougaoni, ređe trougaoni, a kod hibrida četvorougaoni.



**Slika 44.** SEM mikrografije semena vrsta roda *Ramonda*: 1) *R. myconi*; 2) *R. nathaliae*; 3) *R. serbica*; 4) hibridne individue.

S druge strane, na površini semena se nalaze dodatne strukture nalik bradavicama ili izraštajima koje su naročito upadljive kod vrsta *R. myconi* i *R. serbica*. Njihova visina je različita kod tri vrste. Tako su veoma visoke kod *R. myconi*, gotovo duplo niže kod *R. serbica*, a još niže kod *R. nathaliae* (Tab. 21). Kod hibridnih

individua ove strukture su obično odsutne. Semena hibrida su veoma sitna i smežurana, tako da postoje samo naznake prisustva izraštaja u pojedinim lumenima. Ove ornamentacije su neravnomerno raspoređene po površini semena.

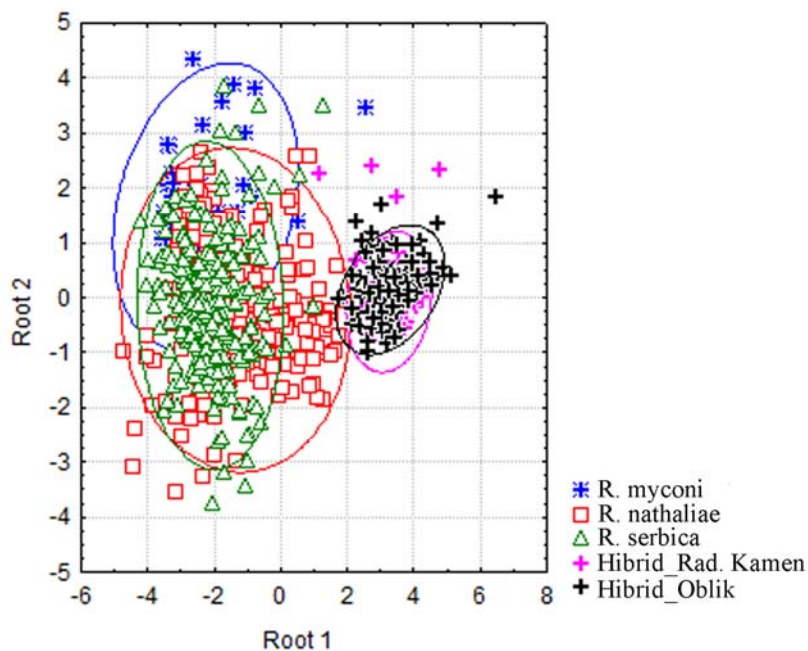
**Tabela 21.** Karakteristike ornamentacije semena tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua.

Vrsta	Dužina lumena (µm)				Širina lumena (µm)				Širina zida lumena (µm)				Visina izraštaja (µm)			
	sr.vr.	sd	min	max	sr.vr.	sd	min	max	sr.vr.	sd	min	max	sr.vr.	sd	min	max
<i>R. myconi</i>	112.16	12.09	91.55	127.59	40.11	5.36	31.65	50.44	6.97	1.20	4.71	8.95	64.27	12.50	46.24	87.42
<i>R. nathaliae</i>	74.11	16.81	39.53	95.35	24.31	6.24	12.71	34.12	5.63	1.23	3.84	7.50	26.54	3.22	20.91	30.29
<i>R. serbica</i>	103.50	24.43	56.59	131.71	33.01	9.69	22.46	54.43	6.16	1.45	4.16	8.55	37.58	3.34	32.62	43.74
<i>R. hybrida</i>	30.91	11.10	16.26	51.35	11.63	4.73	6.14	21.83	2.79	0.85	1.59	4.14				

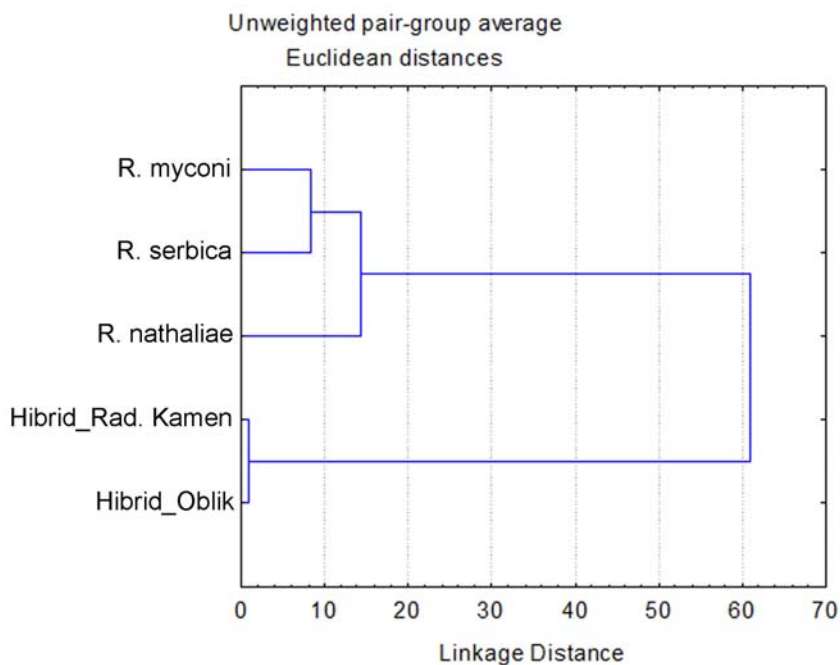
Diskriminantna analiza ukazuje na veliko preklapanje karakteristika semena kod tri vrste roda *Ramonda* (Sl. 45). Jedino se jasno izdavaju semena hibrida usled svoje izuzetno male veličine. Srodničko stablo nacrtano na osnovu Mahalanobis distanci dobijenih analizom samo karakteristika semena ukazuje na veću sličnost vrsta *R. myconi* i *R. serbica* (Sl. 46).

#### 4. 3. 1. Klijavost semena

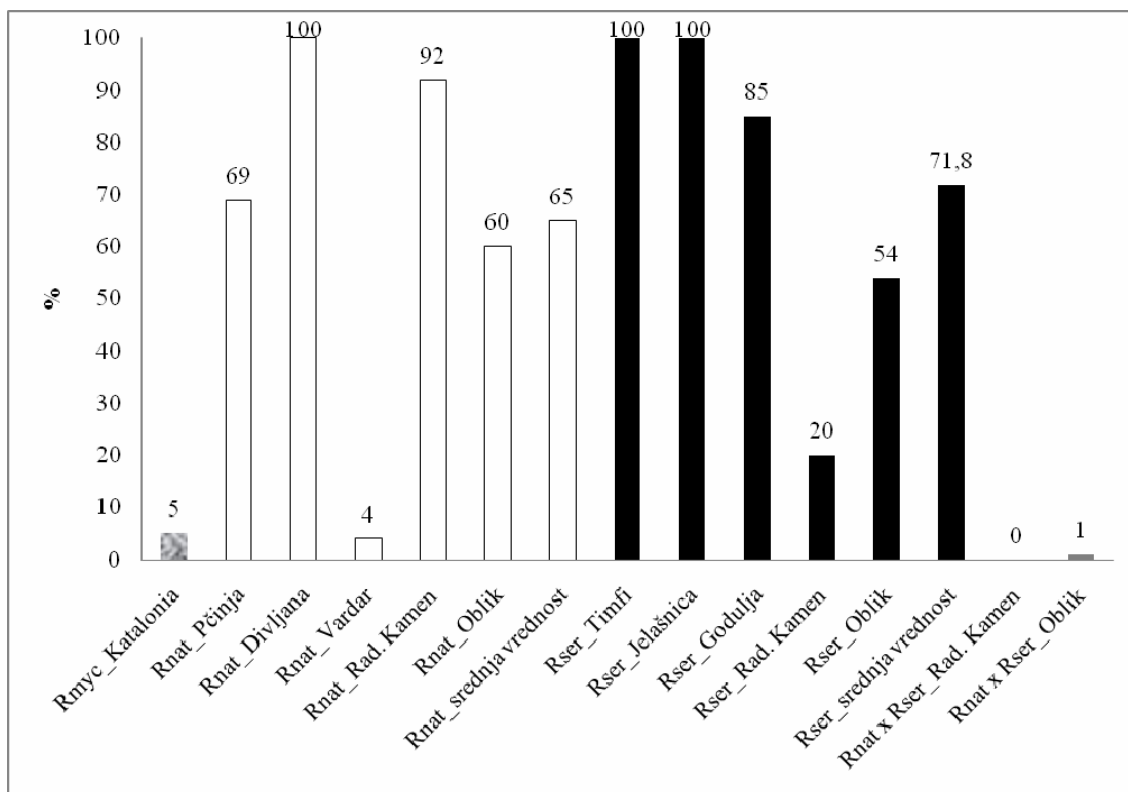
Klijavost semena obe balkanske vrste roda *Ramonda* je visoka. Postoje, ipak, razlike u uspešnosti klijanja semena među populacijama unutar vrsta (Sl. 47). Tako su semena vrste *R. nathaliae* iz Divljane i sa Radovanskog Kamena imala jako visoku stopu klijanja, dok su ona sa serpentinita Pčinje i iz simpatrijske populacije Oblik imala nešto nižu uspešnost. Najniža klijavost od svega 4% okarakterisala je populaciju iz klisure reke Vardar blizu Velesa. Kada je u pitanju *R. serbica*, njene čiste populacije karakteriše visoka klijavost semena, dok je u obe simpatrije ta vrednost znatno snižena. S druge strane, semena vrste *R. myconi* klijala su jako loše (5%), dok je ta brojka još manja za hibride između vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica* (1%).



**Slika 45.** Grafički prikaz rezultata diskriminantne analize za karakteristike semena za tri vrste roda *Ramonda* i hibridne individue.



**Slika 46.** Srodničko stablo na osnovu Mahalanobis distanci dobijenih analizom karakteristika semena tri vrste roda *Ramonda* i hibridnih individua.



**Slika 47.** Histogram stope klijanja semena (%) tri vrste roda *Ramonda*, kao i hibridnih individua.

#### 4. 3. 2. Korelacija karakteristika semena sa veličinom genoma i geografskim položajem

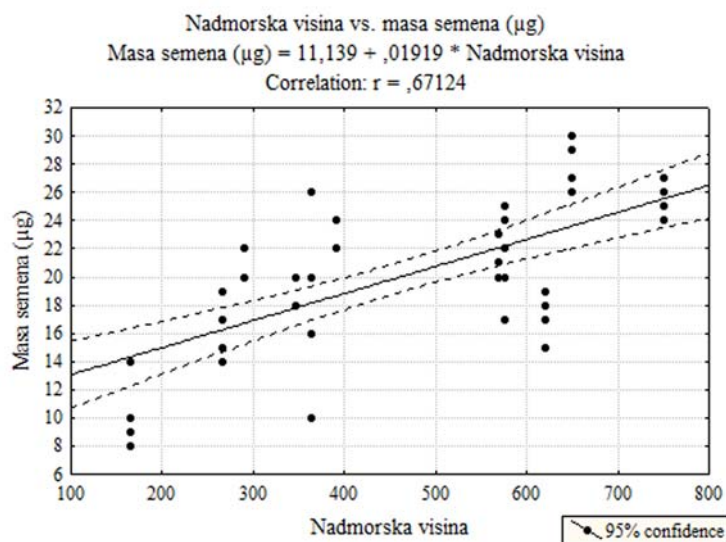
Kada se posmatra rod *Ramonda* kao celina uočljiva je samo umerena statistički značajna korelacija između mase semena i veličine genoma i broja hromozoma (Tab. 22). Povezanost veličine genoma sa drugim karakterina semena je manja. S druge strane, kada je u pitanju korelacija pojedinih merenih osobina semena i geografskog položaja populacije, uočljiva je jedino značajnija pozitivna korelacija između mase semena i nadmorske visine (Tab. 22, Sl. 48).

Značajnije korelacije dobijene su tek kada je analiza urađena za svaku vrstu ponaosob. Tako je kod vrste *R. nathaliae* uočljiva umerena korelacija između dužine semena i veličine genoma (Tab. 23). Nešto veća pozitivna korelacija uočena je između dužine i širine semena i geografskog položaja populacije (Sl. 49A), a još veća između

mase semena i geografske širine, geografske dužine i nadmorske visine (Tab. 23, Sl. 49B).

**Tabela 22.** Vrednosti koeficijenta korelacije između karakteristika semena i citoloških parametara i geografskog položaja na nivou roda. Vrednosti obeležene \* su značajne za  $p < 0,01$ . Vrednosti  $\geq 0,5$  su zasenčene.

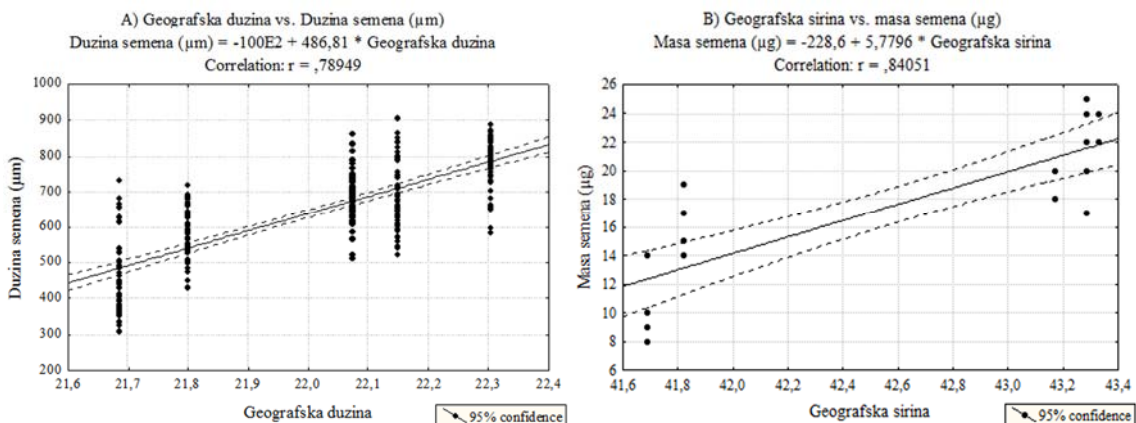
	Geografska sirina	Geografska duzina	Nadmorska visina	2C (pg)	1Cx (pg)	2n
Geografska sirina	1,00	0,20*	-0,03	0,06	0,21*	0,01
Geografska duzina	0,20*	1,00	-0,30*	0,25*	0,02	0,26*
Nadmorska visina	-0,03	-0,30*	1,00	0,28*	0,28*	0,35*
Duzina ( $\mu\text{m}$ )	-0,29*	-0,33*	0,10*	-0,08	-0,28*	0,02
Sirina ( $\mu\text{m}$ )	-0,29*	-0,14*	0,06	-0,10	-0,32*	0,07
D/S	0,20*	-0,12*	0,06	0,06	0,11	-0,04
Seed mass ( $\mu\text{g}$ )	-0,06	0,11	0,67*	0,45*	0,18	0,47*
2C (pg)	0,06	0,25*	0,28*	1,00	0,55*	0,99*
1Cx (pg)	0,21*	0,02	0,28*	0,55*	1,00	0,57*
2n	0,01	0,26*	0,35*	0,99*	0,57*	1,00



**Slika 48.** Grafički prikaz korelacije na nivou roda između mase semena i nadmorske visine.

**Tabela 23.** Vrednosti koeficijenta korelacije između karakteristika semena i citoloških parametara i geografskog položaja za vrstu *R. nathaliae*. Vrednosti obeležene \* su značajne za  $p < 0,01$ .

	Geografska sirina	Geografska dužina	Nadmorska visina	2C (pg)	1Cx (pg)
Geografska sirina	1,00	0,90*	0,82*	0,22	0,22
Geografska dužina	0,90*	1,00	0,55*	0,34	0,34
Nadmorska visina	0,82*	0,55*	1,00	0,07	0,07
Duzina (µm)	0,67*	0,79*	0,39*	0,51*	0,51*
Sirina (µm)	0,71*	0,60*	0,63*	0,29	0,29
D/S	-0,14	0,08	-0,30*	0,27	0,27
Seed mass (µg)	0,84*	0,63*	0,78*	-0,08	-0,08
2C (pg)	0,22	0,34	0,07	1,00	1,00
1Cx (pg)	0,22	0,34	0,07	1,00	1,00



**Slika 49.** Grafički prikaz korelacija kod vrste *R.nathaliae* između A) dužine semena i geografske širine i B) mase semena i geografske širine.

Kada je u pitanju *R. serbica*, postoji značajna negativna korelacija mase semena sa geografskom širinom i dužinom, a pozitivna sa nadmorskom visinom (Tab. 24).

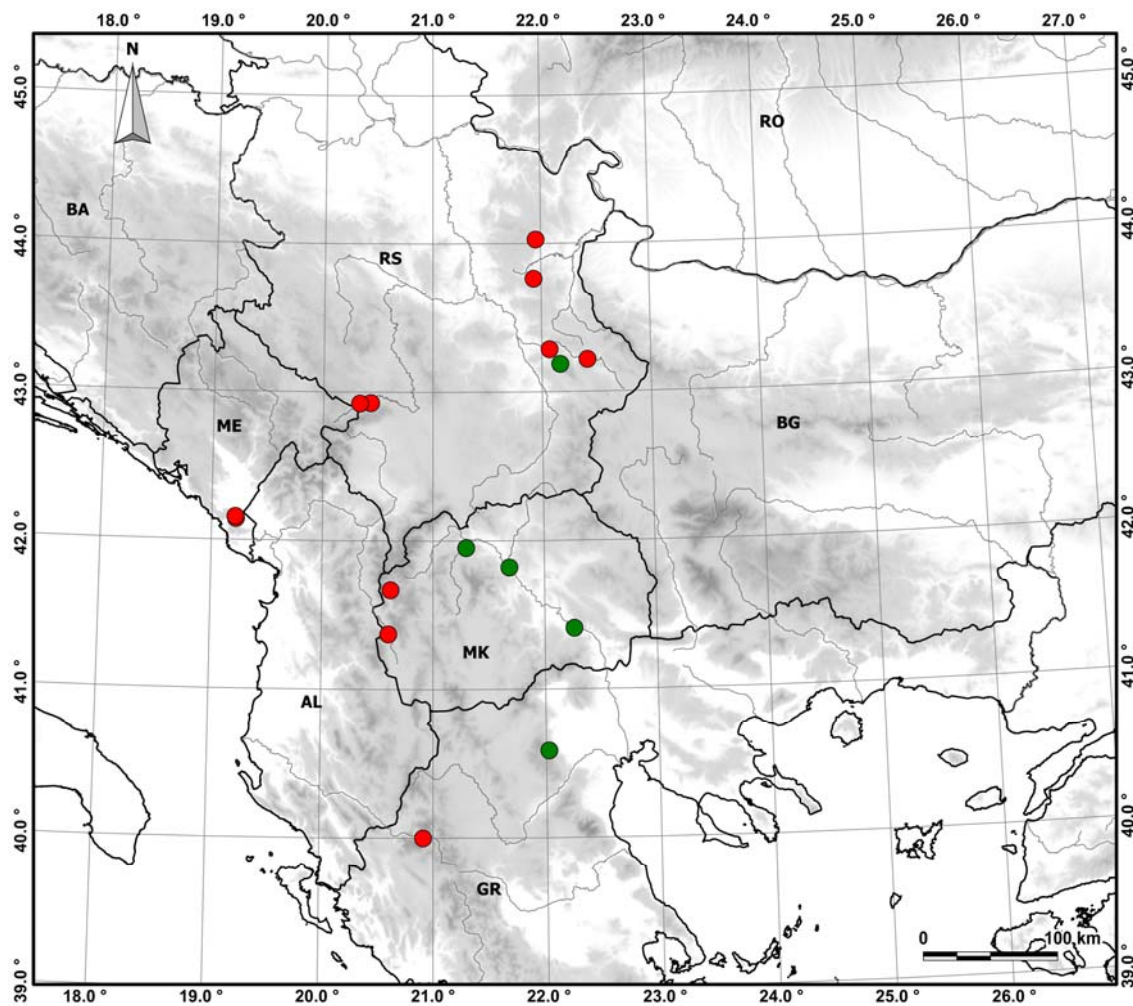


**Tabela 24.** Vrednosti koeficijenta korelacije između karakteristika semena i citoloških parametara i geografskog položaja za vrstu *R. serbica*. Vrednosti obeležene \* su značajne za  $p < 0,01$ .

	Geografska sirina	Geografska dužina	Nadmorska visina	2C (pg)	1Cx (pg)
<b>Geografska sirina</b>	1,00	0,50*	-0,45*	0,28	0,28
<b>Geografska dužina</b>	0,50*	1,00	-0,85*	0,46	0,46
<b>Nadmorska visina</b>	-0,45*	-0,85*	1,00	-0,54*	-0,54*
<b>Duzina (µm)</b>	-0,19*	-0,29*	0,39*	-0,50	-0,49
<b>Sirina (µm)</b>	-0,27*	-0,29*	0,22*	-0,44	-0,43
<b>D/S</b>	0,12	0,10	0,03	0,21	0,20
<b>Seed mass (µg)</b>	-0,63*	-0,71*	0,64*	-0,48	-0,47
<b>2C (pg)</b>	0,28	0,46	-0,54*	1,00	1,00*
<b>1Cx (pg)</b>	0,28	0,46	-0,54*	1,00*	1,00

#### 4. 4. REZULTATI AFLP ANALIZE

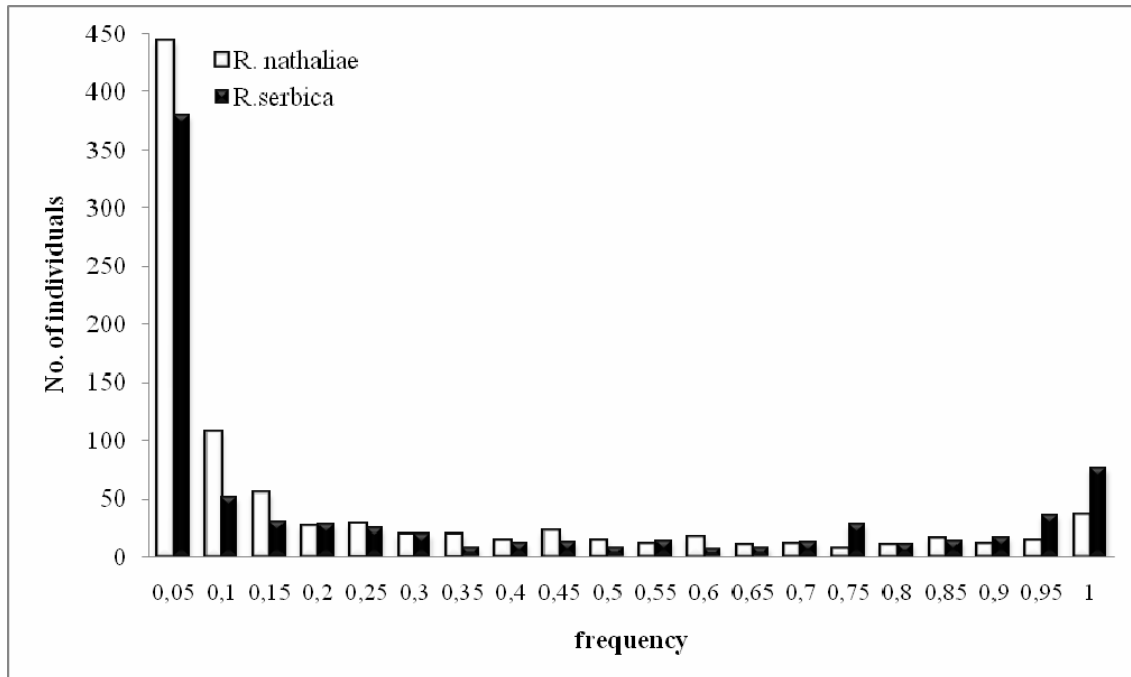
AFLP analiza obuhvatila je ukupno 16 populacija: 5 populacija *R. nathaliae* i 11 *R. serbica* (Karta 5).



**Karta 5.** Rasprostranjenje populacija dve vrste roda *Ramonda*, *R. nathaliae* (zeleni kružići) i *R. serbica* (crveni kružići) koje su uključene u AFLP analizu.

Analizom fragmenata DNK dobijenih AFLP procedurom koristeći tri para prajmera, ukupno je dobijeno 1182 fragmenta: 349 za par E-AAC/M-CTC, 468 za E-ACA/M-CTC i 365 za E-CAG/M-CTC. Četiri fragmenta (0.34%) bilo je prisutno u svim individuama obe vrste. Kod vrste *R. nathaliae* bilo je prisutno 200 specifičnih

fragmenata (16.92%), a kod *R. serbica* 269 (22.76%). Fragmenti niske učestalosti preovladavaju kod obe vrste (Sl. 50).



**Slika 50.** Histogram učestalosti polimorfnih fragmenata kod vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica*.

*Ramonda serbica*, kao heksaploid, ima nešto veći broj dominantnih fragmenata nego diploidna *R. nathaliae*. Nije utvrđen nijedan fragment koji je bio prisutan kod svih individua jedne vrste, a potpuno odsutan kod druge. Nije bilo ni fragmenata karakterističnih za neku od populacija. Bilo je, ipak, nekoliko fragmenata prisutnih kod samo jedne populacije jedne vrste i u nekoliko ili svim populacijama druge vrste.

Prosečan broj fragmenata po individui računat za obe vrste zajedno iznosi 220.3, dok je ukupan broj razdvajajućih fragmenata 1176 (99.5%). Kod *R. nathaliae* prosečan broj fragmenata po individui bio je 184.2, a razdvajajućih fragmenata 903 (76.4%), dok su kod *R. serbica* ove vrednosti 239.4, odnosno 973 (82.3%).

Za procenu genetičkog diverziteta i genetičke strukture populacija korišćene su tri metode. Vrednosti zastupljenosti polimorfnih fragmenata (PLP), kao i očekivane heterozigotnosti (Hj), bile su nešto više dobijene Bayesian metodom nego putem druge

dve metode koje su dale slične rezultate (Tab. 25). Minimalne vrednosti oba parametra (PLP i H<sub>j</sub>) su dobijene kod populacije *R. nathaliae* sa Suve planine u Srbiji, dok su maksimalne vrednosti zastupljene kod *R. serbica* sa planine Timfi u Grčkoj. Variranje očekivane heterozigotnosti nastalo usled uzorkovanja individua (VarI) bilo je veće samo u dve populacije gde je uzorkovan manji broj individua. U svim ostalim slučajevima preovlađuje varijansa nastala detekcijom fragmenata (VarL).

Vrednosti prosečnog genetičkog diverziteta unutar populacija (H<sub>w</sub>) iznosio je od 0.089 do 0.101 u zavisnosti od metode proračuna koji je korišćen (Tab. 26). U ovom slučaju, dominantan je uticaj uzorkovanja populacija na varijabilnost parametra. Ukupan genetički diverzitet (H<sub>t</sub>), prosečan genetički diverzitet između populacija (H<sub>b</sub>), kao i Wright-ov indeks fiksacije (F<sub>st</sub>) imali su nešto više vrednosti metodom frekvencije fragmenata, dok su druge dve metode dale međusobno slične rezultate (Tab. 27). Genetički diverzitet unutar populacija pri tom je veći nego između populacija, dok vrednost indeksa F<sub>st</sub> svakako ukazuje na visoku genetičku diferencijaciju između proučavanih populacija.

Za odvojene populacione analize dve vrste korišćene su dve metode: Bayesian metod sa neravnomernom prethodnom distribucijom i metod frekvence fragmenta (koji pretpostavlja fiksiranu homozigotnost). Dobijeni su slični rezultati (Sl. 51). Genetički diverzitet unutar populacija viši je kod obe vrste od genetičkog diverziteta između populacija. Dok su vrednosti H<sub>w</sub> približno jednake kod dve vrste, H<sub>b</sub> i naročito F<sub>st</sub> su viši kod *R. nathaliae*.

Analiza genetičkih distanci u programu POPULATIONS pokazala je jasnu diferencijaciju dve vrste koje su se našle na različitim krajevima stabla (Sl. 52). Među populacijama vrste *R. nathaliae* najmanja distanca je utvrđena između jedinki sa planine Vermion u Grčkoj i iz Demir Kapije u Makedoniji, dok je najveća između populacija sa lokaliteta Matka u Makedoniji i sa Suve planine u Srbiji (Tab. 28). Kod vrste *R. serbica*, genetički najudaljenije su populacije sa planina Timfi u Grčkoj i Rtnja u Srbiji, dok su genetički najbližnije dve populacije iz Srbije, iz kanjona Lazareve reke i iz Čiflika. Genetičke distance među populacijama *R. nathaliae* su veće nego kod *R. serbica* (Tab. 29).

**Tabela 25.** Rezultati zastupljenosti polimorfnih fragmenata (%) i očekivane heterozigotnosti (Hj) dobijeni putem tri različite metode: A) Bayesian metod sa neravnomernom prethodnom distribucijom, B) metod frekvencije fragmenata i C) metod kvadratnog korena.

Pop ID	A	n	#loc	#loc P	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)	VarI(Hj)	VarI%	VarL(Hj)	VarL(%)
popA	Rnat_Suva pl	26	1182	244	20,6	0,062	0,00380	0,000014	0,000001	10,4	0,000013	89,6
popB	Rnat_Matka	23	1182	419	35,4	0,128	0,00462	0,000021	0,000002	9	0,000019	91
popC	Rnat_Pcinja	26	1182	301	25,5	0,085	0,00433	0,000019	0,000001	7,6	0,000017	92,4
popD	Rnat_Demir Kapija	24	1182	339	28,7	0,101	0,00435	0,000019	0,000002	9,6	0,000017	90,4
popE	Rnat_Vermion	24	1182	305	25,8	0,088	0,00440	0,000019	0,000002	8,7	0,000018	91,3
popF	Rser_Rad. Kamen	28	1182	361	30,5	0,100	0,00455	0,000021	0,000002	9	0,000019	91
popG	Rser_Rtanj	8	1182	332	28,1	0,087	0,00442	0,000020	0,000005	27	0,000014	73
popH	Rser_Radika	22	1182	381	32,2	0,107	0,00474	0,000022	0,000002	10,3	0,000020	89,7
popI	Rser_Kroni e Murici	26	1182	348	29,4	0,092	0,00445	0,000020	0,000002	10,1	0,000018	89,9
popJ	Rser_Kroni e Besit	26	1182	358	30,3	0,109	0,00481	0,000023	0,000002	7,8	0,000021	92,2
popK	Rser_Crni Drim	26	1182	358	30,3	0,109	0,00474	0,000022	0,000002	8,3	0,000021	91,7
popL	Rser_Timfi	16	1182	454	38,4	0,140	0,00509	0,000026	0,000003	10,8	0,000023	89,2
popM	Rser_Mojstir	26	1182	341	28,8	0,087	0,00432	0,000019	0,000002	10,9	0,000017	89,1
popN	Rser_Lazareva reka	24	1182	375	31,7	0,121	0,00506	0,000026	0,000002	6,9	0,000024	93,1
popO	Rser_Ciflik	25	1182	343	29	0,095	0,00453	0,000020	0,000002	9,8	0,000018	90,2
popP	Rser_Godulja	5	1182	326	27,6	0,105	0,00485	0,000024	0,000007	31,1	0,000016	68,9

<b>Pop ID</b>	<b>B</b>	<b>n</b>	<b>#loc</b>	<b>#loc P</b>	<b>PLP</b>	<b>Hj</b>	<b>S.E.(Hj)</b>	<b>Var(Hj)</b>	<b>VarI(Hj)</b>	<b>VarI%</b>	<b>VarL(Hj)</b>	<b>VarL(%)</b>
popA	Rnat_Suva pl	26	1182	179	15,1	0,0553	0,00382	0,000015	0,000001	7	0,000014	93
popB	Rnat_Matka	23	1182	483	40,9	0,1464	0,00503	0,000025	0,000003	13,4	0,000022	86,6
popC	Rnat_Pcinja	26	1182	268	22,7	0,0844	0,0046	0,000021	0,000001	6,7	0,00002	93,3
popD	Rnat_Demir Kapija	24	1182	364	30,8	0,1058	0,00451	0,00002	0,000003	12,7	0,000018	87,3
popE	Rnat_Vermion	24	1182	265	22,4	0,0827	0,00453	0,000021	0,000002	7,6	0,000019	92,4
popF	Rser_Rad. Kamen	28	1182	286	24,2	0,0856	0,00428	0,000018	0,000002	9,4	0,000017	90,6
popG	Rser_Rtanj	8	1182	189	16	0,063	0,00445	0,00002	0,000003	13,7	0,000017	86,3
popH	Rser_Radika	22	1182	292	24,7	0,0942	0,00474	0,000022	0,000002	8,7	0,00002	91,3
popI	Rser_Kroni e Murici	26	1182	245	20,7	0,0803	0,00447	0,00002	0,000001	7,1	0,000019	92,9
popJ	Rser_Kroni e Besit	26	1182	315	26,6	0,0969	0,0046	0,000021	0,000002	9,1	0,000019	90,9
popK	Rser_Crni Drim	26	1182	312	26,4	0,0981	0,00458	0,000021	0,000002	9,5	0,000019	90,5
popL	Rser_Timfi	16	1182	593	50,2	0,1356	0,00491	0,000024	0,000005	19,6	0,000019	80,4
popM	Rser_Mojstir	26	1182	233	19,7	0,0726	0,00417	0,000017	0,000001	8,2	0,000016	91,8
popN	Rser_Lazareva reka	24	1182	348	29,4	0,1081	0,00466	0,000022	0,000002	11,4	0,000019	88,6
popO	Rser_Ciflik	25	1182	264	22,3	0,0822	0,00441	0,000019	0,000002	8,3	0,000018	91,7
popP	Rser_Godulja	5	1182	207	17,5	0,0778	0,00503	0,000025	0,000005	19,9	0,00002	80,1

Pop ID	C	n	#loc	#loc P	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)	VarI(Hj)	VarI%	VarL(Hj)	VarL(%)
popA	Rnat_Suva pl	26	1182	162	13,7	0,0536	0,00379	0,000014	0,000003	19,9	0,000011	80,1
popB	Rnat_Matka	23	1182	405	34,3	0,1194	0,00463	0,000021	0,000002	10,6	0,000019	89,4
popC	Rnat_Pcinja	26	1182	253	21,4	0,0757	0,00431	0,000019	0,000002	11,7	0,000016	88,3
popD	Rnat_Demir Kapija	24	1182	297	25,1	0,0906	0,00433	0,000019	0,000003	13,7	0,000016	86,3
popE	Rnat_Vermion	24	1182	244	20,6	0,0775	0,0044	0,000019	0,000003	14,2	0,000017	85,8
popF	Rser_Rad. Kamen	28	1182	293	24,8	0,0916	0,0046	0,000021	0,000003	13,9	0,000018	86,1
popG	Rser_Rtanj	8	1182	189	16	0,0681	0,00438	0,000019	0,000014	73,9	0,000005	26,1
popH	Rser_Radika	22	1182	296	25	0,0944	0,00479	0,000023	0,000004	17,3	0,000019	82,7
popI	Rser_Kroni e Murici	26	1182	253	21,4	0,0809	0,00449	0,00002	0,000004	17,7	0,000017	82,3
popJ	Rser_Kroni e Besit	26	1182	301	25,5	0,0993	0,00485	0,000024	0,000003	11,6	0,000021	88,4
popK	Rser_Crni Drim	26	1182	307	26	0,1001	0,00477	0,000023	0,000003	12	0,00002	88
popL	Rser_Timfi	16	1182	423	35,8	0,1276	0,00512	0,000026	0,000004	14,4	0,000022	85,6
popM	Rser_Mojstir	26	1182	236	20	0,0764	0,00437	0,000019	0,000004	20	0,000015	80
popN	Rser_Lazareva reka	24	1182	336	28,4	0,112	0,00509	0,000026	0,000002	9,6	0,000023	90,4
popO	Rser_Ciflik	25	1182	255	21,6	0,084	0,00457	0,000021	0,000004	16,9	0,000017	83,1
popP	Rser_Godulja	5	1182	207	17,5	0,0784	0,00469	0,000022	0,000019	88	0,000003	12

**Tabela 26.** Rezultati analize prosečnog genetičkog diverziteta unutar svih proučavanih populacija roda *Ramonda* dobijeni putem tri različite metode: A) Bayesian metod sa neravnomernom prethodnom distribucijom, B) metod frekvencije fragmenata i C) metod kvadratnog korena.

<b>A</b>	<b>Hw</b>	<b>S.E.(Hw)</b>	<b>Var(Hw)</b>	<b>VarI(Hw)</b>	<b>VarL(Hw)</b>	<b>VarP(Hw)</b>
n=16	0,101	0,00467	0,000022	0,000000	0,000001	0,000021
% of Var(Hw)				0,7	5,29	94,01

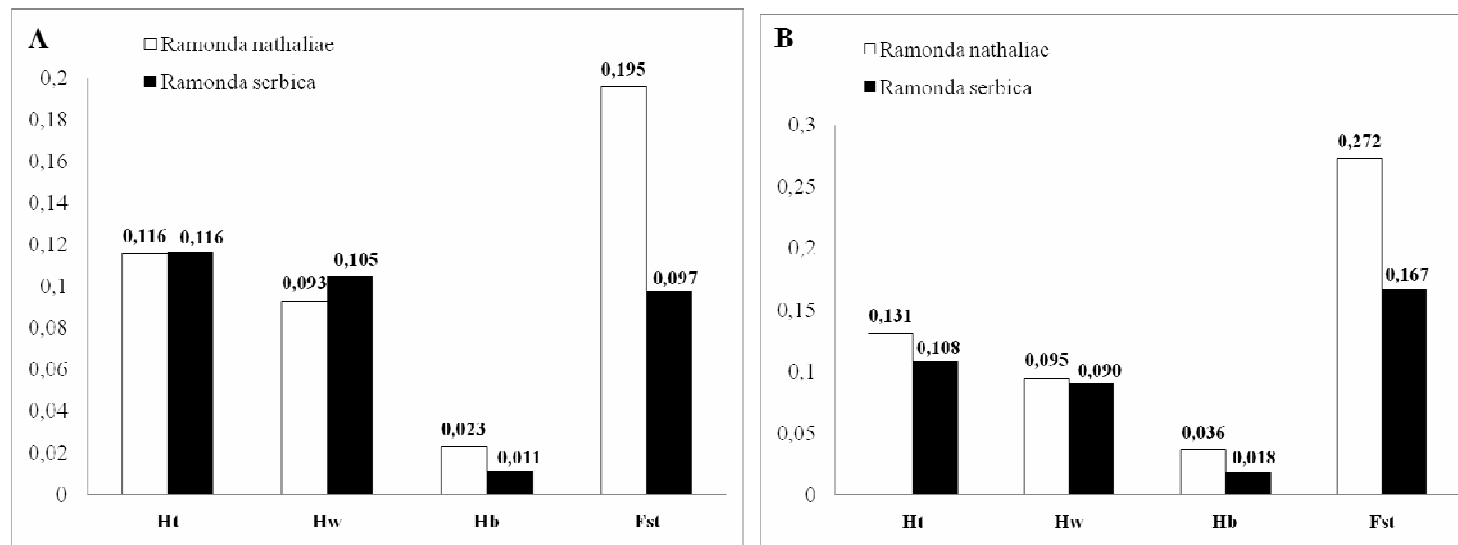
<b>B</b>	<b>Hw</b>	<b>S.E.(Hw)</b>	<b>Var(Hw)</b>	<b>VarI(Hw)</b>	<b>VarL(Hw)</b>	<b>VarP(Hw)</b>
n=16	0,0918	0,00597	0,000036	0,000000	0,000001	0,000034
% of Var(Hw)				0,41	3,24	96,35

<b>C</b>	<b>Hw</b>	<b>S.E.(Hw)</b>	<b>Var(Hw)</b>	<b>VarI(Hw)</b>	<b>VarL(Hw)</b>	<b>VarP(Hw)</b>
n=16	0,0894	0,00482	0,000023	0,000000	0,000001	0,000022
% of Var(Hw)				1,27	4,39	94,34

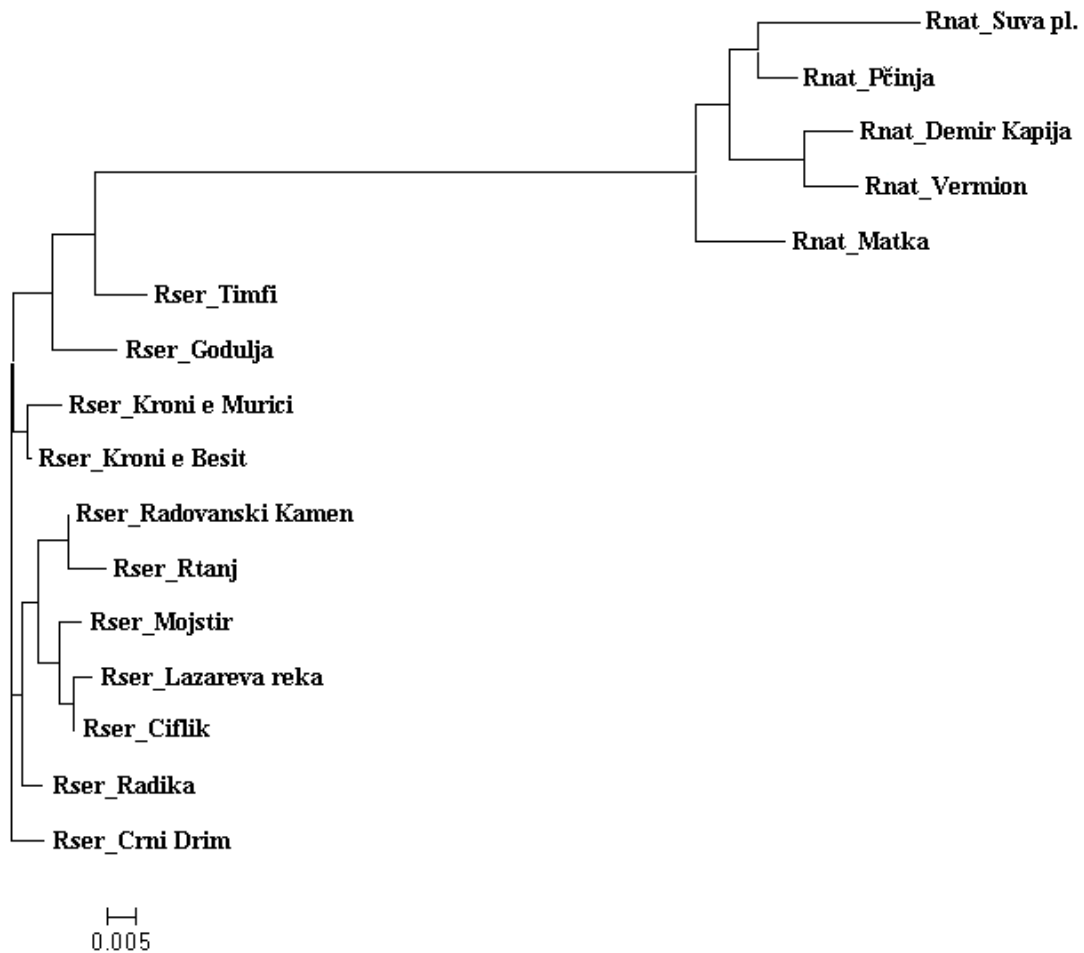


**Tabela 27.** Ukupan genetički diverzitet ( $H_t$ ), prosečan genetički diverzitet unutar populacija ( $H_w$ ), prosečan genetički diverzitet između populacija ( $H_b$ ) i Wright-ov indeks fiksacije dobijeni analizom pomoću tri različite metode za sve proučavane populacije roda *Ramonda*.

n	$H_t$			$H_w$			$H_b$			$F_{st}$		
	Bayesian metod	Metod frekvencije fragmenta	Metod kvadratnog korena	Bayesian metod	Metod frekvencije fragmenta	Metod kvadratnog korena	Bayesian metod	Metod frekvencije fragmenta	Metod kvadratnog korena	Bayesian metod	Metod frekvencije fragmenta	Metod kvadratnog korena
16	0,147	0,164	0,140	0,101	0,092	0,089	0,046	0,072	0,051	0,312	0,443	0,364
S.E.	0,00467	0,00597	0,00482	0,00794	0,01244	0,00884	0,13267	0,10431	0,12390			
Var	0,000022	0,000036	0,000023	0,000063	0,000155	0,000078	0,0176	0,01088	0,01535			



**Slika 51.** Vrednosti ukupnog genetičkog diverziteta ( $H_t$ ), prosečnog genetičkog diverziteta unutar populacija ( $H_w$ ), prosečnog genetičkog diverziteta između populacija ( $H_b$ ) i Wright-ovog indeksa fiksacije ( $F_{st}$ ) za *R. nathaliae* i *R. serbica* dobijenih pomoću dve metode: A) Bayesian metod sa neravnomernom prethodnom distribucijom i B) metod frekvence fragmenta.



**Slika 52.** Stablo dobijeno na osnovu genetičkih distanci ispitivanih populacija vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica*.

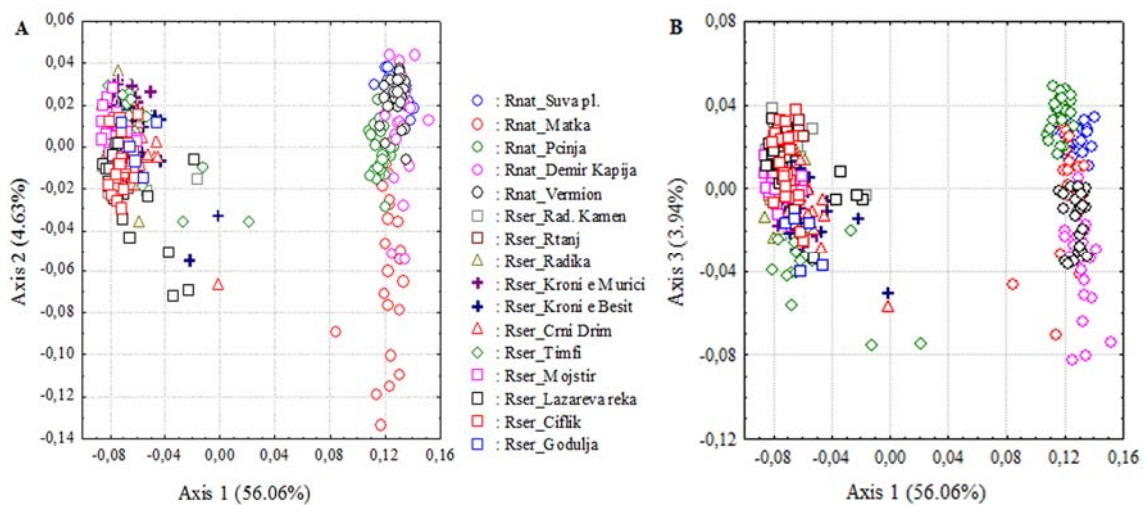
**Tabela 28.** Genetičke distance među 5 populacija vrste *R. nathaliae*.

Pop ID		Suva planina	Matka	Pčinja	Demir Kapija	Vermion
popA	Suva planina	0	0.0571795	0.0347636	0.0491497	0.0458583
popB	Matka	0.0571795	0	0.0313602	0.0386855	0.0442586
popC	Pčinja	0.0347636	0.0313602	0	0.0412845	0.0376907
popD	Demir Kapija	0.0491497	0.0386855	0.0412845	0	0.017557
popE	Vermion	0.0458583	0.0442586	0.0376907	0.017557	0

**Tabela 29.** Genetičke distance među 11 populacija vrste *R. serbica*.

Pop ID		Rad. Kamen	Rtanj	Radika	Kroni e Murici	Kroni e Besit	Crni Drim	Timfi	Mojstir	Lazareva reka	Čiflik	Godulja
popF	Rad. Kamen	0	0.00529401	0.00869723	0.0194838	0.0130067	0.012692	0.0347768	0.0103596	0.0127501	0.00890109	0.0283024
popG	Rtanj	0.00529401	0	0.0153619	0.0254496	0.0210339	0.0199303	0.0462379	0.0187185	0.0220064	0.0179356	0.0372956
popH	Radika	0.00869723	0.0153619	0	0.01044	0.0079307	0.0109035	0.0259851	0.0149037	0.0190986	0.0143543	0.0260018
popI	Kroni e Murici	0.0194838	0.0254496	0.01044	0	0.00699123	0.0172121	0.026981	0.0199711	0.0301669	0.0235488	0.0238648
popJ	Kroni e Besit	0.0130067	0.0210339	0.0079307	0.00699123	0	0.00583695	0.0252587	0.0185331	0.0201018	0.0165974	0.0267481
popK	Crni Drim	0.012692	0.0199303	0.0109035	0.0172121	0.00583695	0	0.0263154	0.0202725	0.0167115	0.0157962	0.029057
popL	Timfi	0.0347768	0.0462379	0.0259851	0.026981	0.0252587	0.0263154	0	0.0303048	0.0305684	0.0298227	0.0263444
popM	Mojstir	0.0103596	0.0187185	0.0149037	0.0199711	0.0185331	0.0202725	0.0303048	0	0.00969258	0.00533146	0.0168932
popN	Lazareva reka	0.0127501	0.0220064	0.0190986	0.0301669	0.0201018	0.0167115	0.0305684	0.00969258	0	0.00397857	0.0188683
popO	Čiflik	0.00890109	0.0179356	0.0143543	0.0235488	0.0165974	0.0157962	0.0298227	0.00533146	0.00397857	0	0.0169745
popP	Godulja	0.0283024	0.0372956	0.0260018	0.0238648	0.0267481	0.029057	0.0263444	0.0168932	0.0188683	0.0169745	0

Analiza glavnih koordinata (PCoA) opisala je varijabilnost pomoću 12 osa. Prva osa je odgovorna za čak 56% variranja i ona jasno deli dve vrste tako da se s jedne strane nalaze populacije *R. nathaliae*, a sa druge *R. serbica* (Sl. 53A), dok druga i treća osa objašnjavaju samo 4.63%, odnosno 3.94% variranja. Druga osa je samo izdvojila populaciju iz Matke od ostalih populacija vrste *R. nathaliae*, dok su populacije *R. serbica* ostale međusobno izmešane. Samo se nekoliko individua ove vrste izdvojilo u središnjem delu grafika. Treća osa je dalje razdvojila populacije *R. nathaliae* iz Makedonije od populacija iz Grčke i Srbije (Sl. 53B). Odnosi među populacijama *R. serbica*, takođe, postaju malo jasniji. S negativne strane treće ose nalaze se populacija sa Timfija i većina individua iz Grčke i Makedonije. Populacije ove vrste iz Srbije uglavnom su locirane iznad treće ose, a samo se po nekoliko individua iz populacija sa lokaliteta Čiflik, Lazareva reka i Godulja, spustilo niže.



**Slika 53.** Grafički prikaz rezultata PCoA analize za proučavane populacije *R. nathaliae* i *R. serbica* za A) prvu i drugu, B) prvu i treću osu.

Analiza molekularne varijanse (AMOVA) urađena je kako za obe vrste zajedno, tako i za svaku vrstu posebno. U prvom slučaju, dobijene vrednosti indeksa fiksacije  $F_{ct}$  i  $F_{st}$  ukazuju na visok nivo genetičke diferencijacije između dve vrste (Tab. 30). Procenat variranja između populacija unutar grupa je nizak (9.91%). Ovo je potvrđeno i u odvojenim analizama dve vrste, naročito za vrstu *R. serbica*. S druge strane,

varijabilnost unutar populacija je visoka, što postaje naročito upadljivo kada se analize urade za svaku vrstu posebno. Analiza indeksa  $F_{st}$  za svaki par populacija pokazuje jasnu diferencijaciju između vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica*, pri čemu su vrednosti za  $F_{st}$  nešto veće među populacijama *R. nathaliae* (Tab. 31).

**Tabela 30.** Rezultati analize molekularne varijanse za obe vrste zajedno, kao i za svaku od vrsta zasebno.

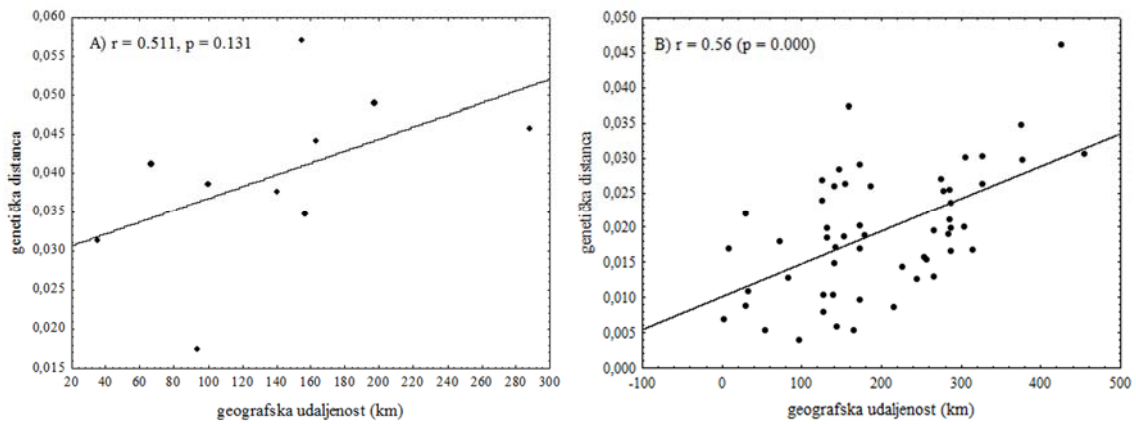
	<i>R. nathaliae</i> + <i>R. serbica</i>	<i>R. nathaliae</i>	<i>R. serbica</i>
	Variranje (%)		
<b>Između grupa</b>	48.51		
<b>Između populacija unutar grupa</b>	9.91	27.83	13.8
<b>Unutar populacija</b>	41.58	72.17	86.2
<b><math>F_{sc}</math> (između populacija unutar vrsta)</b>	0.193		
<b><math>F_{st}</math> (unutar populacija)</b>	0.584	0.278	0.138
<b><math>F_{ct}</math> (između vrsta)</b>	0.485		

Mantel test je korišćen kako bi se utvrdilo da li postoji korelacija između genetičkih i geografskih distanci među populacijama. Rezultati su pokazali umerenu korelaciju kod obe vrste, pri čemu je  $r = 0,51$  ( $p = 0,131$ ) kod *R. nathaliae* (Sl. 54A), a  $r = 0,56$  ( $p = 0,000$ ) kod *R. serbica* (Sl. 54B).

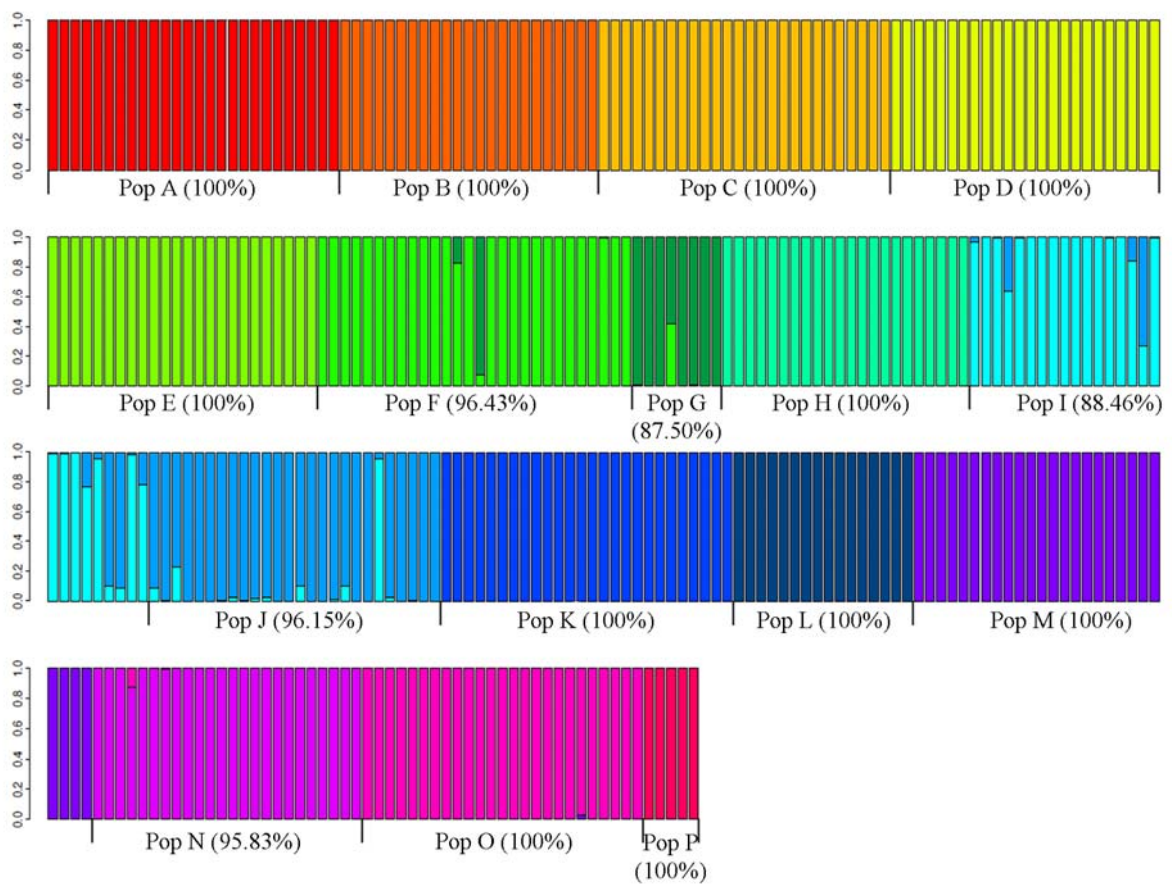
Rezultati diskriminantne analize glavnih komponenti (DAPC) pokazali su da i po genetičkoj strukturi gotovo sve individue pripadaju populacijama iz kojih su i sakupljene (Sl. 55). Izuzeci su se pojavili samo u nekoliko populacija vrste *R. serbica*: sa Radovanski Kamen i Rtnja, dve geografski veoma bliske populacije iz Crne Gore, i samo jedna individua iz Čiflika je po ovoj analizi pripala populaciji iz kanjona Lazareve reke (Tab. 32). Detaljnija analiza koja je obuhvatila samo *R. serbica* dovela je do izdvajanja populacija iz Grčke, Makedonije i Crne Gore s jedne strane prve ose, dok su populacije iz Srbije ostale grupisane s druge strane, dok je druga osa odvojila populaciju iz Grčke od populacija iz Makedonije i Crne Gore (Sl. 56).

**Tabela 31.** Vrednosti indeksa Fsts za svaki par 16 proučavanih populacija vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica* (sve vrednosti su statistički značajne za  $p=0.05$ ).

	Rser Rad. Kamen	Rser Rtanj	Rser Radika	Rser Kroni e Murici	Rser Kroni e Besit	Rser Crni Drim	Rser Timfi	Rser Mojstir	Rser Laz. reka	Rser Čiflik	Rser Godulja	Rnat Suva planina	Rnat Matka	Rnat Pčinja	Rnat Demir Kapija	Rnat Vermion
<b>Rser_Rad. Kamen</b>	0.00000															
<b>Rser_Rtanj</b>	0.04581	0.00000														
<b>Rser_Radika</b>	0.08165	0.12937	0.00000													
<b>Rser_Kroni e Murici</b>	0.17741	0.22964	0.09983	0.00000												
<b>Rser_Kroni e Besit</b>	0.11492	0.16598	0.06956	0.06731	0.00000											
<b>Rser_Crni Drim</b>	0.11175	0.15606	0.09254	0.14849	0.05119	0.00000										
<b>Rser_Timfi</b>	0.23361	0.25756	0.17287	0.19321	0.16954	0.17406	0.00000									
<b>Rser_Mojstir</b>	0.10698	0.19400	0.14256	0.19489	0.16655	0.17819	0.22441	0.00000								
<b>Rser_Lazareva reka</b>	0.11070	0.15837	0.14584	0.22572	0.15098	0.12652	0.18304	0.09316	0.00000							
<b>Rser_Čiflik</b>	0.08831	0.16836	0.12985	0.21020	0.14394	0.13701	0.20887	0.05982	0.03925	0.00000						
<b>Rser_Godulja</b>	0.23086	0.33446	0.19716	0.21137	0.19547	0.20689	0.13542	0.18063	0.12178	0.15869	0.00000					
<b>Rnat_Suva planina</b>	0.68248	0.73162	0.67139	0.68653	0.64401	0.64439	0.61597	0.71326	0.64025	0.68868	0.71876	0.00000				
<b>Rnat_Matka</b>	0.52569	0.49261	0.50326	0.52846	0.48362	0.47960	0.43018	0.55593	0.46698	0.52169	0.45638	0.34480	0.00000			
<b>Rnat_Pčinja</b>	0.60350	0.61799	0.58899	0.61202	0.56520	0.56340	0.52544	0.63737	0.55667	0.60584	0.60219	0.31602	0.19712	0.00000		
<b>Rnat_Demir Kapija</b>	0.59464	0.59632	0.57480	0.59304	0.55072	0.54866	0.49642	0.62244	0.54664	0.59558	0.55629	0.36246	0.21191	0.28286	0.00000	
<b>Rnat_Vermion</b>	0.62588	0.64652	0.61056	0.62860	0.58542	0.58211	0.53937	0.65694	0.58177	0.62988	0.62080	0.38392	0.25597	0.29197	0.14414	0.00000



**Slika 54.** Grafici koji prikazuju korelaciju između genetičke i geografske distance proučavanih populacija vrsta A) *R. nathaliae* i B) *R. serbica*.

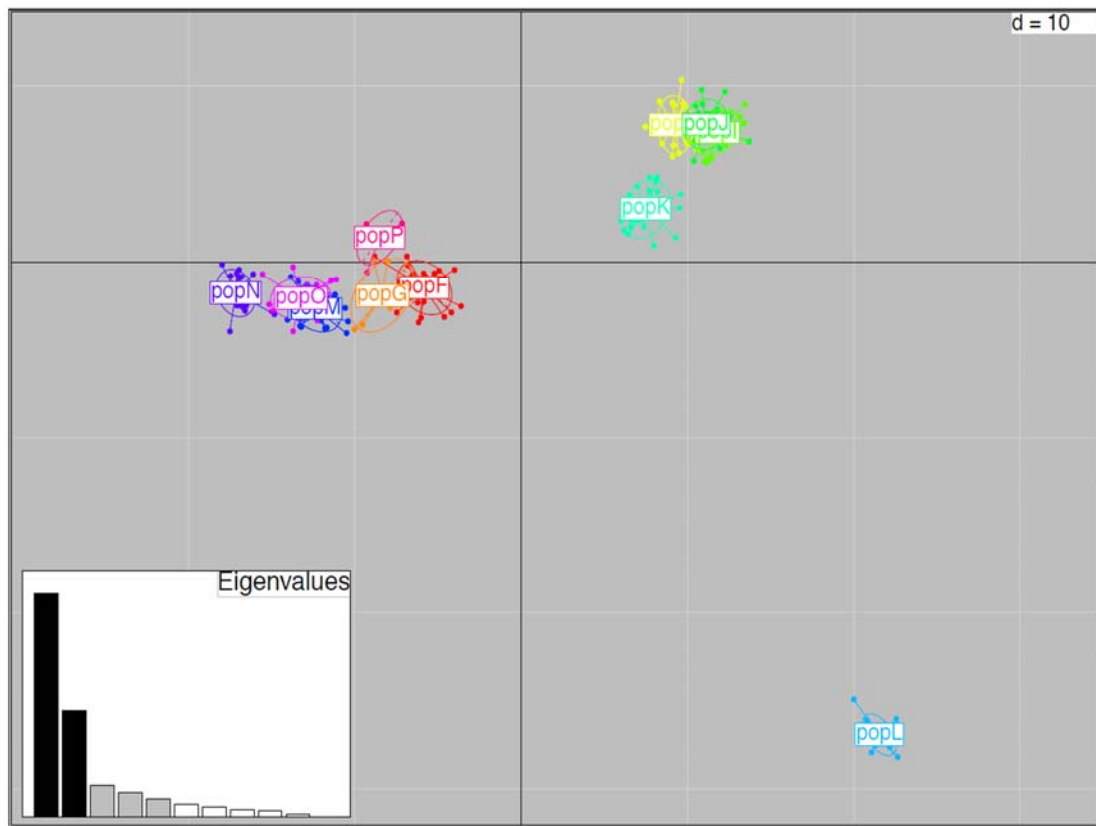


**Slika 55.** Grafički prikaz rezultata DAPC analize o genetičkoj pripadnosti individua određenim populacijama (značenje oznaka populacija u tabeli 32).

**Tabela 32.** Rezultati DAPC analize o genetičkoj pripadnosti individua određenim populacijama.

popID	popA	popB	popC	popD	popE	popF	popG	popH	popI	popJ	popK	popL	popM	popN	popO	popP
	Rnat Suva pl	Rnat Matka	Rnat Pcinja	Rnat Demir Kapija	Rnat Vermion	Rser Rad. Kamen	Rser Rtanj	Rser Radika	Rser Kroni Murici	Rser Kroni Besit	Rser Crni Drim	Rser Timfi	Rser Mojstir	Rser Lazareva reka	Rser Ciflik	Rser Godulja
<b>Pripadnost populaciji</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,88	1,00	0,88	0,96	1,00	1,00	1,00	0,96	1,00	1,00
<b>Veličina grupe pre analize</b>	26	23	26	24	24	28	8	22	26	26	26	16	26	24	25	5
<b>Veličina grupe posle analize</b>	26	23	26	24	24	28	8	22	24	28	26	16	26	23	26	5





**Slika 56.** Grafički prikaz DAPC analize samo za vrstu *R. serbica* (značenje oznaka populacija u tabeli 32).

## 5. DISKUSIJA

### 5. 1. KARIOLOŠKE I CITOGENETIČKE KARAKTERISTIKE ISPITIVANIH VRSTA

Od ranije su u literaturi bili poznati brojevi hromozoma za vrste roda *Ramonda*. Međutim, u opticaju su bile različite vrednosti. Tako se za *R. nathaliae* navode  $2n = 36$  (GLIŠIĆ, 1924) i  $2n = 48$  (RATTER, 1963; CONTANDRIOPOULOS, 1966), a za *R. serbica*  $2n = 72$  (GLIŠIĆ, 1924) i  $2n = 96$  (CONTANDRIOPOULOS, 1966).

Istraživanje broja hromozoma u različitim populacijama ove dve vrste širom Balkanskog poluostrva otkrilo je konstantan broj od  $2n = 2x = 48$  hromozoma za vrstu *R. nathaliae*. Kod svih istraživanih populacija vrste *R. myconi*, takođe je nađeno  $2n = 2x = 48$  hromozoma ili, bar, veličina genoma koja odgovara ovom broju hromozoma.

Što se tiče vrste *R. serbica*, dobijeni rezultat od  $2n = 6x = 144$  hromozoma je bitno drugačiji od ranije poznatih brojeva, ali je potvrđen analizom biljaka iz većeg broja istraživanih populacija. Broj od  $2n = 4x = 96$  hromozoma je pronađen u simpatrijskim populacijama i karakteriše hibridne individue. Što se broja od  $2n = 72$  hromozoma tiče koji navodi GLIŠIĆ (1924), moguće je da se, zapravo, radi o individui nastaloj ukrštanjem hibrida ( $2n = 96$ ) i *R. nathaliae* ( $2n = 48$ ). Međutim, uprkos velikom broju individua za koje je određivan broj hromozoma i, pre svega, veličine genoma, naročito u simpatrijskim populacijama, ovaj broj nije potvrđen ni kod jedne individue niti  $2C$ -vrednost koja bi odgovarala ovom ploidnom nivou (triploid).

Osim navedenih, u pojedinim populacijama vrste *R. serbica* pronađene su individue sa nešto manjim (hipoaneuploidija) ili nešto većim brojem hromozoma (hiperaneuploidija), a u populaciji iz kanjona reke Cijevne, pronađene su i individue sa  $2n = 8x = 192$ , kao i  $2n = 10x = \sim 230$  hromozoma.

U okviru istraživanja za ovu doktorsku disertaciju dobijeni su prvi podaci o postotku nukleotidnih baza DNK (A-T i G-C) u genomima tri vrste roda *Ramonda*, kao i o veličini genoma za vrste *R. nathaliae* i *R. serbica*. Iz literature do sada je bila

poznata samo veličina genoma za *R. myconi* od 2.6 pg (ZONNEVELD ET AL., 2005) što je u saglasnosti sa našim rezultatima ( $2C = 2,55$  pg). Najmanju veličinu genoma ima *R. nathaliae* ( $2C = 2,34$  pg) koja ima najveći procenat GC baza (42,06%). S toga je moguće da je do smanjenja veličine genoma kod ove vrste došlo usled gubitka AT sekvenci ili je kod druge dve vrste došlo do amplifikacije AT sekvenci. Najveću veličinu genoma ima *R. serbica* i to kako preovlađujući heksaploidi sa  $2C = 7,85$  pg, tako i veoma retki dekaploidi sa  $2C = 11,65$  pg. Svi navedeni nivoi ploidije su potvrđeni brojem hromozoma.

U jedine dve simpatrijske populacije, analiza veličine genoma i broja hromozoma dovela je do otkrića postojanja hibridnih individua. Najveći broj takvih biljaka ima tetraploidnu veličinu genoma od prosečno  $2C = 5,14$  pg i  $2n = 96$  hromozoma. Dakle, odlikuju se  $2C$ -vrednošću koja je intermedijarna između dve roditeljske vrste, diploidne *R. nathaliae* i heksaploidne *R. serbica*. Kako ovako nastali hibridi nasleđuju jedan deo genoma od diploidnog (*R. nathaliae*) i tri dela od heksaploidnog roditelja (*R. serbica*), očekuje se da morfološki više liče na *R. serbica*. Na samom terenu vrlo je teško razlikovati hibride od individua *R. serbica* (Sl. 57A). U toku su detaljne analize metodom geometrijske analize rozeta, listova i cvetova, koje će, nadamo se, pokazati koji su to morfološki parametri na osnovu kojih bi bilo moguće prepoznati ih, ali koji će ukazati i na načine nasleđivanja pojedinih karaktera kod ovih biljaka.

Osim tetraploida, uočene su u manjem broju i jedinke sa prosečnom  $2C = 6,19$  pg. Ove jedinke bi mogle biti pentaploidi ( $2n = 5x$ ), ali to, na žalost, nije potvrđeno brojanjem hromozoma. Ovakve jedinke su mogle nastati, s jedne strane, ukrštanjem tetraploidnog hibrida sa heksaploidnom *R. serbica*. No, kako listovi ovih jedinki uglavnom jako podsećaju na listove *R. nathaliae* (Sl. 57B), moguće je, takođe, da su nastale spajanjem neredukovanog gameta ove diploidne vrste i *R. serbica*. U svakom slučaju, ovi potencijalni pentaploidi su u nešto većem broju prisutni na lokalitetu Radovanski Kamen, dok je na Obliku nađena samo jedna ovakva jedinka.



**Slika 57.** Hibridne individue u simpatrijskim populacijama *R. nathaliae* i *R. serbica*: A) tetraploid sa lokaliteta Oblik i B) pentaploid sa lokaliteta Radovanski Kamen.

Drugi tip čine jedinke sa  $2C = 10,04$  pg koje bi mogle biti oktoploidi ( $2n = 8x$ ) nastali spontanim dupliciranjem genoma tetraploidnih hibrida. No, ni ovo nismo uspeli da potvrdimo brojem hromozoma. I jedne i druge individue su dosta retke i praktično se sporadično javljaju s obzirom da čine svega 8,4 % ( $2n = 5x$ ), odnosno 4,5 % ( $2n = 8x$ ) ispitanih individua.

Interesantne podatke pružilo je poređenje monoploidne veličine genoma ( $1Cx$ ). Naime, iako bi očekivali da je kod dve diploidne vrste ona slična, *R. nathaliae*, zapravo, ima znatno nižu  $1Cx$ -vrednost od svega  $1Cx = 1,17$  pg. *Ramonda myconi* sa  $1Cx = 1,27$  pg ima monoploidnu veličinu genoma koja se mnogo više približava ovoj vrednosti kod vrste *R. serbica* ( $1Cx = 1,31$  pg). To još više dolazi do izražaja kada se uporede minimalne i maksimalne vrednosti kod svake vrste, jer se onda vidi da postoje, čak, i veoma slične vrednosti kod pojedinih populacija *R. myconi* i *R. serbica*.

Kada se uporedi monoploidna veličina genoma sa nivoom ploidije, odnosno brojem hromozoma, vidi se da kod roda *Ramonda* generalno postoji pozitivna korelacija između ovih parametara ( $r = 0,67$ ,  $p=0,0000$ ). Dakle, na nivou roda nije uočljivo smanjenje monoploidne veličine genoma sa povećanjem nivoa ploidije, kao što je to slučaj kod mnogih drugih skrivenosemenica (LEITCH & BENNETT, 2004). Međutim, umerena negativna korelacija između  $Cx$ -vrednosti i broja hromozoma postoji kod vrste

*R. serbica* i hibrida, kod kojih individue sa većim brojem hromozoma imaju manju monoploidnu veličinu genoma.

Sve u svemu, poliploidija predstavlja vrlo bitan mehanizam evolucije u rodu *Ramonda*. Osnovni broj hromozoma ( $x$ ) u familiji *Gesneriaceae* je veoma različit, od  $x = 4$  do  $x = 64$ , ali je najčešće između  $x = 8$  i  $x = 17$  (WEBER, 2004). Tri vrste evropskih predstavnika ove familije imaju isti broj hromozoma,  $2n = 48$  i to su *Haberlea rhodopensis*, *R. myconi* i *R. nathaliae*. No, veličine genoma se razlikuju, od najmanje kod *R. nathaliae* ( $2C = 2,34$  pg) do najveće kod *H. rhodopensis* ( $2C = 2,80$  pg, ZONNEVELD ET AL., 2005). Nešto veći broj hromozoma ima *Jankaea heldreichii*,  $2n = 56$  (CONTANDRIOPOULOS, 1966), ali ne i veličinu genoma ( $2C = 2,69$  pg). Dakle, svakako da je diploidni nivo kod roda *Ramonda* stariji. No, ako uzmemo u obzir da je osnovni broj hromozoma za ovaj rod  $x = 24$ , mogli bi zaključiti da se radi o drevnim poliploidima ili paleopoliploidima. Dalja poliploidizacija se desila kasnije pri čemu je nastala *R. serbica*, verovatno spajanjem jednog redukovanog i jednog neredukovanog gameta i daljom duplikacijom ovako nastalog hromozomskog seta. Time bi ova vrsta bila autoploid. Simpatrijska populacija je svakako sekundarnog porekla, nastala kao rezultat migracija dve vrste, *R. nathaliae* sa veće nadmorske visine Suve planine u niže toplije i zaštićenije predele i *R. serbica* iz severnijih populacija više ka jugu (STEVANOVIC ET AL., 1986B). Hibridizacija među njima ne upućuje na zaključak da se radi o nedovoljno « dobrim » vrstama, već pokazuje da mehanizmi koji bi sprečili njihovo međusobno ukrštanje još uvek nisu do kraja efikasni.

Posebne pravilnosti u geografskom rasporedu analiziranih populacija, kada su broj hromozoma i veličina genoma u pitanju, nema. Kod taksona na Balkanu primećuje se umerena negativna korelacija  $2C$ -vrednosti i geografske dužine ( $r = -0,32$ ,  $p = 0,0000$ ), što je povezano sa zapadnijim položajem analiziranih populacija *R. serbica*. Kod vrste *R. nathaliae* uočljiva je umerena pozitivna korelacija ove vrednosti sa nadmorskom visinom ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,0000$ ), s obzirom da se najvećom veličinom genoma kod ove vrste odlikuju upravo visokoplaninske populacije sa Karadžice (2000 m) i Suve planine (1750 m). Do uzoraka iz visokoplaninskih populacija *R. serbica* nismo došli, tako da se ova korelacija za nju ne može ni opovrgnuti ni potvrditi. Znatna

pozitivna korelacija između veličine genoma i nadmorske visine utvrđena je ranije kod pojedinih vrsta, kao što su *Festuca arundinacea* (CECCARELLI ET AL., 1992) i *Dasyphyrum villosum* (CACERES ET AL., 1998). No, poznati su i suprotni primeri, kao što je *Dactylis glomerata* (REEVES ET AL., 1998). Postoji nekoliko objašnjenja ovakve korelacije između veličine genoma i nadmorske visine, kao što su da su individue sa većom veličinom genoma otpornije na mraz (MACGILLIVRAY & GRIME, 1995), da mogu imati teža semena ili duži period cvetanja. No, sva ta objašnjenja su hipotetička i bez dovoljno dokaza.

Kada je u pitanju raspored jedinki u simpatrijskim populacijama, uočljive su pozitivna korelacija između 2C-vrednosti ispitivanih individua i geografske širine i negativna sa nadmorskom visinom na lokalitetu Oblik. Razlog tome je što su tu jedinke *R. serbica* prisutne u nižim delovima smeštenim više severno, dok se njihova brojnost smanjuje sa povećanjem nadmorske visine i smanjenjem geografske širine. Na lokalitetu Radovanski Kamen prisutna je samo umerena negativna korelacija između 2C-vrednosti i geografske dužine ( $r = -0,39$ ,  $p = 0,0000$ ), jer u istočnijem delu populacije preovlađuju jedinke *R. nathaliae* i hibridi, zatim u centralnom delu zajedno žive obe roditeljske vrste i hibridi, dok u zapadnijem delu populacije dominira *R. serbica*.

## 5. 2. MORFLOŠKE KARAKTERISTIKE POLENA

Polenova zrna predstavnika familije *Gesneriaceae* istraživao je u prošlosti veliki broj naučnika. Tako su ERDTMAN (1952) i WEBER (2004) dali opšte opise polenovih zrna ove familije. Drugi autori su detaljno obradili pojedine rodove ili grupe, kao na primer: *Gesneria*, *Hypocyrtia*, *Nematanthus* (MELHELM AND MAURO, 1973), neotropske predstavnike familije (WILLIAMS, 1978), *Columnea* (FRITZE AND WILLIAMS, 1988), *Kohleria* (KVIST AND SKOG, 1992), rodove iz Azije (LUEGMAYR, 1993A), *Cyrtandra* (LUEGMAYR, 1993B; SCHLAG-EDLER & KIEHN, 2001), brazilske predstavnike (GASPARINO, 2008; FOURNEY ET AL., 2010) i druge. Međutim, za evropske predstavnike familije *Gesneriaceae*, detaljni podaci gotovo da ne postoje (HALBRITTER, 2000 ONWARDS). Stoga, rezultati prezentovani u ovom doktoratu predstavljaju prvo detaljno uporedno istraživanje morfologije polenovih zrna sve tri vrste roda *Ramonda*. Ovi rezultati pružaju nove podatke za međusobno razlikovanje tri vrste, za objašnjenje njihovih uzajamnih odnosa i ekoloških specifičnosti na određenim staništima.

Polenova zrna vrsta roda *Ramonda* su mala, 3-kolporna, uglavnom sferoidnog, kružnog oblika. To su, ujedno, i opšte karakteristike polenovih zrna familije *Gesneriaceae* (WEBER, 2004). Dve diploidne vrste, *R. myconi* i *R. nathaliae*, imaju polen slične veličine i oblika. Tako je prosečna dužina polarne ose kod *R. myconi* 14,24  $\mu\text{m}$ , a *R. nathaliae* 16,75  $\mu\text{m}$ . Međutim, polenova zrna vrste *R. serbica* su veća, prosečnog prečnika oko 22  $\mu\text{m}$ , s tim što maksimalne izmerene vrednosti u pojedinim populacijama iznose i do 28  $\mu\text{m}$ . Dostupni bibliografski podaci pokazuju da je prečnik polena paleotropskih predstavnika familije u opsegu od 9 - 24  $\mu\text{m}$ , dok je kod neotropskih 25 - 51  $\mu\text{m}$  (WEBER, 2004). U skladu sa tim, polen diploidnih vrsta se uklapa u opsege paleotropskih predstavnika familije, dok je polen heksaploidne vrste *R. serbica* veći što se može objasniti višim nivoom ploidijske i većom veličinom genoma koja je karakterišće.

Najmanja polenova zrna među balkanskim populacijama karakterišću populaciju vrste *R. nathaliae* iz klisure reke Pčinje. Ova populacija je jedna od retkih koja preživljava na serpentinskoj podlozi, što je verovatno jedan od faktora koji doprinosi

maloj veličini polenovih zrna. Osim toga, i vijabilnost polena ovih biljaka je veoma niska za razliku od ostalih populacija. Kada su biljke sa ovog lokaliteta prebačene u Botaničku baštu "Jevremovac", one su proizvodile polen visoke vijabilnosti (95%), što ukazuje na presudan uticaj negostoljubive serpentinske sredine. Polenova zrna biljaka iz ove populacije odlikuju se i najtanjom egzynom. Jedno od mogućih objašnjenja jeste da im to kroz harmomegacijski mehanizam omogućava lako i brzo klijanje polena u sredini u kojoj povoljni vlažni uslovi veoma kratko traju.

Egzina je kod sve tri vrste mikoretikularno-perforirana. Međutim, razlika u veličini lumena egzine, njihovom broju, kao i broju perforacija unutar lumena je očigledna između *R. nathaliae* i *R. serbica*. Tako *R. nathaliae* ima veoma male brojne lumene unutar kojih obično postoji samo po jedna, ređe više perforacija. S druge strane, *R. serbica* ima duplo veće lumene na površini polenovih zrna unutar kojih gotovo uvek postoji veći broj perforacija. Ako se, pak, pogleda *R. myconi*, veličina lumena njenog polena je mala, ali ipak nešto veća nego kod *R. nathaliae* i to pre svega u ekvatorijalnoj oblasti, a broj perforacija unutar lumena je uglavnom veći od 1. Međutim, pirinejska *R. myconi* kod koje su lumeni veći i sa većim brojem perforacija nego kod *R. nathaliae*, ali manji nego kod *R. serbica*, deli karakteristike egzine sa obe balkanske rodjake.

Rastojanja između pora, kao i indeksi apokolpiuma su slični kod *R. myconi* i *R. nathaliae*, dok su kod vrste *R. serbica* veći u skladu sa većim polenovim zrnima.

Statističke analize su jasno pokazale veću sličnost između polena dve diplodne vrste, *R. myconi* i *R. nathaliae*, i njegovu različitost u odnosu na polen heksaploidne *R. serbica*. Najveće razlike su u dimenzija ekvatorijalne ose, ali kako se vrednosti ovog karaktera preklapaju kod tri vrste, mora se koristiti obazrivo. Osobine površine egzine su drugi parametar za razlikovanje vrsta roda *Ramonda*.

Analize su, takođe, pokazale, veću međusobnu sličnost populacija *R. nathaliae* iz Makedonije u odnosu na populacije iz Srbije. Uzrok tome mogu biti klimatski uslovi koji se u Makedoniji odlikuju višom temperaturom, manjom količinom padavina i nižom vlažnošću vazduha u odnosu na uslove u Srbiji. Treba uzeti u obzir i to što su populacije *R. nathaliae* iz Makedonije sličnije vrsti *R. myconi* nego populacije te vrste



iz Srbije. Ova činjenica može ići u prilog hipotezi da su te dve grupe populacija izvedene iz istog tipa ancestralnih populacija.

### **5. 2. 1. Polen roditeljskih vrsta i hibridnih individua u simpatrijskim populacijama**

Preliminarne analize polena (LAZAREVIĆ ET AL., 2009) koje su usledile nakon otkrića intermedijarnog ploidnog nivoa između *R. nathaliae* i *R. serbica* (LAZAREVIĆ ET AL., 2007; SILJAK-YAKOVLEV ET AL., 2008) ukazale su da su tetraploidne individue zapravo hibridi između dve vrste. Zato su obavljena detaljna istraživanja karakteristika polenovih zrna kako dve roditeljske vrste, tako i hibrida koji se između njih formiraju.

Hibridi se odlikuju velikom heterogenošću u veličini polena. Osim toga, mogu imati 3-, 9- i 12-kolporatna polenova zrna. Poslednja dva tipa (9- i 12- kolporatna zrna) najverovatnije su polijade nastale u toku nepravilne mikrosporogeneze. Sama površina egzine polena hibridnih individua je gotovo ista kao kod vrste *R. serbica*. Statističke analize su pokazale da hibridi, na osnovu karakteristika polenovih zrna, imaju intermedijarne karakteristike, ali da su u znatnoj meri sličniji vrsti *R. serbica*. Vijabilnost polenovih zrna hibrida manja je nego kod roditeljskih vrsta. Nešto veća vijabilnost 9- i 12-kolporatnih zrna može ukazivati na njihovu veću selektivnu prednost.

Iako *R. nathaliae* i *R. serbica* spadaju u reliktno vrste, postoji nekoliko faktora koji doprinose postojanju prirodne hibridizacije između njih. Naime, u većem delu areala ove dve vrste su međusobno razdvojene. Postoje samo dva lokaliteta, gde one žive zajedno, u simpatriji i to su Radovanski Kamen i Oblik, oba u jugoistočnoj Srbiji. Obe vrste cvetaju u isto vreme i imaju slične cvetove koje posećuju isti oprašivači, kao što su *Bombus haematurus* Kriechbaumer 1870. ili neke vrste roda *Bombylus* sp. No, nije isključeno da ih oprašuju i neke druge vrste insekata. Izveden je eksperiment u Botaničkoj bašti "Jevremovac" u kome su pupoljci vrsta *R. nathaliae* i *R. serbica* prekriveni kesicama kako bi se sprečilo njihovo oprašivanje polenom drugih individua. Sakupljeni su plodovi onih individua kod kojih je došlo do njihovog formiranja, ali su svi plodovi bili prazni, bez semena, što je pokazalo da samooprašivanja kod ovih vrsta

ili nema ili je ta pojava veoma retka. Dakle, postojanje hibridnih individua između ove dve vrste ukazuje da, iako su one jasno razdvojene, još uvek nema potpuno efikasnih prepreka njihovom međusobnom ukrštanju, što je slučaj i kod nekih drugih predstavnika familije Gesneriaceae, kao na primer kod nekih predstavnika rodova *Columnea*, *Kohleria* i *Vanhouttea* (KVIST AND SKOG, 1992; FUCHS ET AL., 2011).

### **5. 2. 2. Korelacija karakteristika polena sa veličinom genoma i geografskim položajem**

U okviru statističkih analiza razmatrana je i eventualna korelacija između merenih karaktera polenovih zrna i veličine genoma ili broja hromozoma s jedne strane, odnosno geografskog položaja populacija, s druge strane. Rezultati su pokazali da postoji visok stepen korelacije na nivou roda između veličine polenovih zrna i dužine ekvatorijalne ose, kao i veličine polenovih zrna i sva tri citološka parametra ( $2C$ ,  $1Cx$ ,  $2n$ ). U principu, polenova zrna poliploida su gotovo uvek veća od zrna diploida (ERDMAN, 1952), pa je takav slučaj i kod roda *Ramonda*. Korelacije sa geografskom širinom i dužinom, kao i nadmorskom visinom više dolaze do izražaja na nivou vrsta i to, pre svega, kod vrste *R. nathaliae*. Za nju je karakteristična izrazita pozitivna korelacija između dužine ekvatorijalne ose polena i geografskog položaja. Tako su polenova zrna severnijih populacija veća od onih koje se nalaze južnije. Dijametar im se, takođe, povećava od zapada ka istoku i sa porastom nadmorske visine. Kod vrste *R. serbica* ova povezanost je znatno slabije izražena.

### 5. 3. KARAKTERISTIKE MORFOLOGIJE SEMENA

Nekoliko autora je u prošlosti istraživalo karakteristike semena pojedinih predstavnika familije *Gesneriaceae*. Tako su, na primer, detaljnije istražena semena roda *Kohleria* (KVIST AND SKOG, 1992), zatim rodova *Didissandra*, *Ridleyandra* i *Raphiocarpus* (SONTAG AND WEBER, 1998). Najsveobuhvatnije istraživanje semena vrsta iz familije *Gesneriaceae* objavila je BEAUFORT-MURPHY (1983), koja daje opis i semena svih pet predstavnika familije u Evropi. Međutim, opisi su bazirani na SEM snimcima semena sakupljenih iz herbara, tako da pružaju podatke samo o obliku semena i osnovnim ultrastrukturnim karakteristikama ćelija semenjače. Stoga, rezultati predstavljeni u ovom doktoratu predstavljaju prvu detaljnu uporednu morfološku analizu semena tri vrste roda *Ramonda*, kao i hibridnih individua. Na osnovu tih rezultata dobijeni su podaci o razlikama između semena ove tri vrste, ali i njihovoj reprodukciji i ekologiji.

Rod *Ramonda* karakterišu sitna semena elipsoidnog oblika koja se u velikom broju razvijaju u plodovima. Semena nisu specijalizovana za neki poseban vid rasejavanja. Ona, prilikom pucanja plodova, slobodno padaju na okolne stene i mahovine. No, kako su sitna, moguće je i da vetar ima određenu ulogu u njihovom rasejavanju.

Dimenzije semena tri vrste se u velikoj meri preklapaju. Tako su semena *R. myconi* duga 580 – 1000  $\mu\text{m}$ , a široka 80 – 270  $\mu\text{m}$ . Semena *R. nathaliae* duga su 309 – 908  $\mu\text{m}$ , a široka 111 – 425  $\mu\text{m}$ , dok su ove vrednosti kod vrste *R. serbica* iznose 435 – 954  $\mu\text{m}$  za dužinu, odnosno 101 – 357  $\mu\text{m}$  za širinu. Naročito je velika varijacija u veličini semena kod vrste *R. nathaliae* (koeficijent varijacije je 22% za dužinu i 25% za širinu), verovatno zbog veće varijabilnosti njenih staništa.

Masa semena je slična kod dve diploidne vrste, *R. myconi* i *R. nathaliae*. Ona su lakša nego semena heksaploidne *R. serbica*, tako da je prisutna umerena korelacija između mase semena i veličine genoma i broja hromozoma.

Kod sve tri vrste na površini semena je prisutna oramentacija u obliku trouglastih izraslina. Kako su te strukture različitih dimenzija kod ove tri vrste, mogu

poslužiti kao još jedan karakter za njihovo međusobno razlikovanje. Interesantno je da se u nekim referencama navodi da evropski predstavnici familije Gesneriaceae imaju semena bez posebne ornamentacije (MÖLLER ET AL., 2009). To jeste tačno za druga dva evropska roda ove familije, *Haberlea* and *Jankaia* (BEAUFORT-MURPHY, 1983). Međutim, rezultati naših istraživanja semena roda *Ramonda* pokazuju da na površini semena postoji izražena ornamentacija. Slične strukture mogu se videti i kod nekih afričkih predstavnika familije (*Streptocarpus*), kao i kod nekih azijskih rodova familije Gesneriaceae (*Trisepalum*, *Cyrtandra*). Uloga ovih struktura na površini semena može biti u povećanju sposobnosti da se seme pričvrsti za površinu stene ili mahovina. Postoje, takođe, podaci da površine koje su neravnije i imaju više ornamentacija, mogu da povećaju termodinamičku razmenu kod biljaka koje rastu pod stresnim uslovima vodnog ili temperaturnog režima (BARTHLOTT, 1981), što je često slučaj sa predstavnicima roda *Ramonda*.

Semena hibridnih individua, prosečno duga oko 290  $\mu\text{m}$  i široka oko 74  $\mu\text{m}$ , znatno su sitnija od semena roditeljskih vrsta. Ona se odlikuju vrlo niskim stepenom klijavosti, od svega oko 1%. Kako na dva simpatrijska lokaliteta postoji veliki broj hibridnih individua, može se pretpostaviti da se prva generacija hibrida uspostavlja iz semena, ali da u njihovoj daljoj reprodukciji vegetativno razmnožavanje postaje dominantno.

Na osnovu kako kvantitativnih tako i kvalitativnih karakteristika semena, može se zaključiti da su semena tri vrste međusobno slična, ali i da semena diploidne *R. myconi* dele više zajedničkih osobina sa semenima heksaploidne *R. serbica* nego, takođe diploidne, *R. nathaliae*.

### 5. 3. 1. Klijavost semena

Klijavost semena kod roda *Ramonda* uglavnom je visoka. Izuzetak u ovom istraživanju pretstavlja *R. myconi* čija su semena klijala u izrazito malom broju. No, uzrok tome u ovom slučaju, kao i kod populacije *R. nathaliae* iz klisure Vardara, može biti starost semena i njihovo neadekvatno čuvanje do početka eksperimenta. Kod druge

dve vrste samo su se pojedinačne populacije odlikovale nešto manjom klijavošću, kao što je, na primer, slučaj sa *R. nathaliae* sa serpentinita, ali i obe roditeljske vrste u simpatrijskim populacijama.

### 5. 3. 2. Korelacija karakteristika semena sa veličinom genoma i geografskim položajem

Parametri koji su mereni na semenima uglavnom nisu pokazali statistički značajnu korelaciju sa veličinom genoma ili brojem hromozoma. Izuzetak je umerena korelacija mase semena sa brojem hromozoma i veličinom genoma ( $r_{2n} = 0,47$ ,  $r_{2C} = 0,45$ ,  $p < 0,01$ ). Zbog toga na osnovu dimenzija semena ne možemo zaključivati o nivou ploidije kod jedinki roda *Ramonda*. To i nije tako neočekivano s obzirom da je odnos između veličine genoma i, na primer, mase semena složen i nije pravolinijski (BEAULIEU ET AL., 2007). Naime, kako veličina i masa semena mogu u velikoj meri zavisiti od uslova na staništu (BROCHMANN, 1992), moguće je da su upravo uslovi sredine ti koji u ovom slučaju imaju presudan uticaj. A da je taj uticaj kod roda *Ramonda* zaista prisutan, pokazuju i rezultati po kojima jedinke iz populacije koja je, možda, u najvećoj meri izložena stresnim uslovima sredine, a to je *R. nathaliae* sa serpentinita klisure reke Pčinje, imaju i najmanja semena.

Kada je u pitanju geografski položaj populacija, regresiona analiza je pokazala da se dimezije i masa semena vrste *R. nathaliae* povećavaju sa povećanjem geografske širine (od juga ka severu), sa povećanjem geografske dužine (od zapada ka istoku), kao i sa povećanjem nadmorske visine. Objašnjenje može ležati u različitim uslovima sredine između ovih populacija. Analizirane populacije iz Makedonije su više izložene negativnom dejstvu visoke temperature i nedostatka vlage. U takvim uslovima, jedinke *R. nathaliae* u njima ranije u toku letnje sezone ulaze u stanje anabioze nego biljke iz severnijeg dela areala. Usled toga, njihova semena mogu imati manju količinu rezervnih materija, pa samim tim i manju masu i dimenzije. Kod *R. serbica* korelacija dimenzija semena sa geografskim položajem je manja. No, ovde dolazi do smanjenja mase semena sa geografskom širinom i dužinom, a do povećanja sa nadmorskom visinom. To opet

može biti povezano sa uslovima sredine, koji su, među populacijama iz kojih su uzorkovana semena, najkontinentalniji na staništima populacija u istočnom delu areala. Osim toga, populacije ove vrste sa juga (planina Timfi) i iz JZ Srbije (klisura reke Godulje) nalaze se u planinskim područjima, u kojima bi veća masa semena sa većom količinom rezervnih materija predstavljala prednost u uslovima kraćih i hladnijih leta, sa dužim zadržavanjem snega tokom zime (PLUESS ET AL., 2005).

#### 5. 4. GENETIČKI DIVERZITET POPULACIJA VRSTA *R. nathaliae* I *R. serbica* – EKOLOŠKI I ISTORIJSKI ASPEKT

Na genetički diverzitet populacija biljnih vrsta mogu da utiču različiti faktori, od onih koji su delovali u prošlosti kroz geološku istoriju do onih koji deluju danas i određuju u kojoj meri će se dešavati razmena genetičkog materijala između populacija. Dve endemične balkanske vrste, *R. nathaliae* i *R. serbica*, su dugoživeće biljke, ostaci flore Tercijera u Evropi, danas fragmentarnog rasprostranjenja, što sve zajedno bitno utiče na genetičku strukturu njihovih populacija. Vrednost indeksa fiksacije (0,312 do 0,443 u zavisnosti od metode proračuna), i druge primenjene statističke analize potvrđuju da su dve vrste jasno razdvojene. Međutim, AFLP analiza nije otkrila postojanje tzv. dijagnostičkih fragmenata karakterističnih za jednu od vrsta ili neku od njihovih populacija. Stoga se može zaključiti, da razdvajanje dve vrste nije bilo u tako davnoj prošlosti.

Zastupljenost polimorfnih fragmenata (PLP) i očekivana heterozigotnost ( $H_j$ ) imaju slične vrednosti kod dve vrste ili nešto veće kod *R. serbica* u zavisnosti od primenjene metode proračuna. Kod *R. nathaliae* srednja vrednost očekivane heterozigotnosti u populacijama je oko 0,093, dok je kod *R. serbica* oko 0,105.

Najmanja očekivana heterozigotnost kod *R. nathaliae* zabeležena je u populaciji sa Suve planine ( $H_j = 0,055$ ). Jedno od objašnjenja ovako male genetičke varijabilnosti jesu ekstremni uslovi staništa. Naime, od svih ispitivanih populacija, ona se nalazi na najvećoj nadmorskoj visini od, čak, 1750 m. Diskontinuitet u povoljnim uslovima na ovakvom staništu, kako u davnoj prošlosti, za vreme Ledenog doba, tako i u recentno vreme, mogao je dovesti do smanjenja veličine populacije i ograničenog protok gena, što za posledicu ima i smanjenu genetičku varijabilnost populacije. Najveća očekivana heterozigotnost kod ove vrste zabeležena je na lokalitetu Matka ( $H_j = 0,146$ ) ukazujući na najbolje stanje populacije.

Kod vrste *R. serbica* najmanja očekivana heterozigotnost je u populaciji sa planine Rtanj ( $H_j = 0,063$ ), a najveća kod populacije sa Timfija u Grčkoj ( $H_j = 0,136$ ).

Ostale populacije se odlikuju relativno ujednačenim vrednostima heterozigotnosti, koje se u proseku kreću od 0,08 do 0,1.

Zavisnost genetičke varijabilnosti populacija *R. nathaliae* od geografske širine ( $r = -0,29$ ,  $p < 0,641$ ) i dužine ( $r = -0,69$ ,  $p < 0,199$ ) nije statistički značajna. Da bi se dobili sigurniji podaci o tome za ovu vrstu, neophodno je analizirati veći broj populacija. Kod *R. serbica* uočljivo je umereno smanjenje genetičke varijabilnosti od juga ka severu ( $r = -0,66$ ,  $p < 0,027$ ). Ako bi posmatrali prosečne vrednosti heterozigotnosti po geografskim oblastima kod ove vrste, najnižom genetičkom varijabilnošću odlikuju se populacije u JZ Srbiji, a najvećom u Grčkoj i Makedoniji.

Ni kod srodne vrste sa Pirinejskog poluostrva *R. myconi* nije utvrđeno postojanje fragmenata specifičnih za neku od populacija ili oblasti njenog prostiranja. Za razliku od balkanskih vrsta roda *Ramonda*, njene populacije se, međutim, odlikuju većom genetičkom varijabilnošću. Tako vrednosti očekivane heterozigotnosti dobijene analizom RAPD fragmenata iznose od 0,131 (što je reda veličine maksimalnih vrednosti dobijenih za *R. nathaliae* i *R. serbica*) do 0,255 (DUBREUIL ET AL., 2008). Kod roda *Saintpaulia* genetički diverzitet analiziran je pomoću ISSR prajmera koji su, takođe, dali veće vrednosti heterozigotnosti ( $H = 0,28 - 0,35$ , KOLEHMAINEN, 2008). Ostaje pitanje da li je to posledica različitog vremena njihovog postanka, povoljnijih uslova na njihovim staništima ili različitih metoda istraživanja.

Genetički diverzitet unutar populacija veći je nego između populacija kod obe vrste sa Balkanskog poluostrva, što je zabeleženo i kod srodnog roda *Saintpaulia* (KOLEHMAINEN, 2008). To pokazuje da se između jedinki unutar jedne populacije genetički materijal razmenjuje više nego između jedinki iz različitih populacija, što je generalno karakteristika vrsta kod kojih nema samooplodnje (HAMRICK & GODT, 1996; TORRES ET AL., 2003). To je, s jedne strane, očekivano, s obzirom da su semena kod roda *Ramonda* lagana, ali bez ikakvih adaptacija koja bi im omogućila uspešan transport na veće razdaljine pomoću životinja ili vetra.

Indeks fiksacije je veći kod *R. nathaliae* ( $F_{st} = 0,278$ ) ukazujući na veću međusobnu izolaciju njenih populacija nego što je to slučaj sa populacijama *R. serbica* ( $F_{st} = 0,138$ ). Kod *R. myconi* ( $F_{st} = 0,281$ , DUBREUIL ET AL., 2008) i *R. nathaliae* ove



vrednosti su slične. Veća genetička diferencijacija između populacija vrsta *R. myconi* i *R. nathaliae* može biti posledica njihove veće starosti i duže razdvojenosti populacija u odnosu na *R. serbica* koja je mogla nastati nešto kasnije usled čega se uticaj protoka gena između populacija još uvek oseća.

Vrednosti međupopulacijskih indeksa fiksacije kreću se kod populacija *R. nathaliae* od 0,144 do 0,384 (prosečna vrednost 0,178), a kod *R. serbica* od 0,039 do 0,334 (0,120 u proseku). Raspon ovih vrednosti je znatno manji kod balkanskih predstavnika roda nego kod *R. myconi* gde  $F_{st}$  iznosi od 0,037 do 0,506 (DUBREUIL ET AL., 2008), ali su srednje vrednosti značajno veće nego kod ispitivanih taksona roda *Saintpaulia* kod kojih srednja vrednost međupopulacijskih  $F_{st}$  iznosi svega 0,06 (KOLEHMAINEN, 2008).

Kod *R. nathaliae* najveća genetička izolacija se uočava između populacije sa Suve planine u Srbiji i ostalih istraživanih populacija ove vrste, što je i očekivano s obzirom da je ovaj lokalitet i geografski najudaljeniji od ostatka areala. Međusobno su najbliži populacije sa Vermiona i iz Demir Kapije.

Iako je genetička izolacija između različitih populacija kod vrste *R. serbica* u proseku manja, može se uočiti postojanje 3 grupe: jednu čine biljke sa Timfija u Grčkoj, drugu populacije iz Crne Gore i Makedonije, a treću populacije iz Srbije. Najveća je sličnost između populacija iz Čiflika i Lazareve reke, a najmanja između Timfija i populacija *R. serbica* u Srbiji. Postojanje nekoliko jedinki *R. serbica* koje se na PcoA grafiku nalaze između dve vrste ukazuje na složenost genetičkih odnosa u tim populacijama, moguće duplikacije genoma ili introgresiju.

Kod obe vrste postoji umerena korelacija između genetičkih i geografskih distanci, statistički značajnija kod *R. serbica*. Individue se gotovo u potpunosti pripisuju populacijama iz kojih su i uzorkovane uz svega nekoliko izuzetaka koji ukazuju ili da se radi samo o subpopulacijama ili da su te populacije genetički veoma slične i da su, do ne tako davno, razmenjivale gene. Protok gena između populacija je mali, naročito kod *R. nathaliae* i veća je verovatnoća da se desi između populacija koje su geografski bliže. Postoji izražen efekat izolacije putem distance uočen i kod srodne *R. myconi* (DUBREUIL ET AL., 2008).

Rezultati jasno potvrđuju razdvojenost dve vrste, *R. nathaliae* i *R. serbica*, s tim što se obe odlikuju relativno niskom genetičkom varijabilnošću. Genetička varijabilnost populacija zavisi od velikog broja faktora, između ostalog od veličine populacije, veličine areala, životne forme, načina razmnožavanja i dr. Vrste ograničenog rasprostranjenja obično se odlikuju manjom genetičkom varijabilnošću od široko rasprostranjenih rođaka (HAMRICK & GODT, 1996; GE ET AL., 1999). Razlog tome leži u većoj verovatnoći dešavanja efekta osnivača (eng. *founder effect*) ili efekta uskog grla (eng. *bottleneck effect*), jer su populacije endemičnih vrsta obično manje od populacija široko rasprostranjenih vrsta (UTELLI ET AL., 1999). HAMRICK & GODT (1996) analizirali su veliki broj vrsta i podatke o njihovoj genetičkoj varijabilnosti. Po njima prosečna vrednost očekivane heterozigotnosti za endemične vrste kod kojih nema samooprašivanja iznosi 0,142. Ako im se semena, pri tom, ne raznose na velike razdaljine, što je verovatno slučaj i sa *R. nathaliae* i *R. serbica*, prosečna očekivana heterozigotnost je nešto manja, oko 0,130. S obzirom da je kod roda *Ramonda* u velikoj meri prisutno i vegetativno razmnožavanje, moguće je da ono dodatno snižava vrednost genetičke varijabilnosti u populacijama.

Kada su u pitanju predstavnici roda *Ramonda*, neizostavno se mora uzeti u obzir efekat ledenog doba na populacije ovih tercijernih relikata. Naime, smatra se da su ove vrste u toplom i vlažnom periodu Tercijera bile šire rasprostranjene na Balkanskom poluostrvu, naročito na planinama. Sa zahlađenjem klime, one se povlače više ka jugu i na manje nadmorske visine. Pri tom osnivanju populacija na novim lokalitetima, dolaze do izražaja uticaji efekta osnivača i uskog grla koji dovode do smanjenja genetičke varijabilnosti populacija. Potrebno je dosta vremena da se u novonastaloj populaciji uspostavi genetička ravnoteža (NEI ET AL., 1975). Kada je ledeno doba završeno, mnoge biljne vrste su ponovo počele da šire svoje areale, sada iz refugijalnih staništa u kojima su našle skrovište tokom nepovoljnog perioda (HEWITT, 1996). Istraživanja pokazuju da se populacije koje se nalaze na ishodnim refugijalnim staništima odlikuju većom heterozigotnošću od onih koje su nastale prilikom kasnijeg širenja vrste (COMES & KADEREIT, 1998; UTELLI ET AL., 1999; NI ET AL., 2006). One se obično odlikuju stabilnijom populacionom dinamikom i većom veličinom populacije. Nasuprot tome, u

populacijama koje su nastale prilikom kasnije ekspanzije vrste još uvek se oseća efekat uskog grla. Što su udaljenije od refugijalnog staništa, taj uticaj je veći, a genetički diverzitet u njima manji (COMES & KADEREIT, 1998).

U skladu sa ovim polazištem i rezultatima koje smo dobili, mogli bismo zaključiti da je Matka jedno od refugijalnih staništa vrste *R. nathaliae*. Verovatno da su tokom glacijacije populacije *R. nathaliae* sa visokih planina, kao što su Suva planina, Karadžica – Jakupica i Nidže, našle utočište u obližnjim klisurama. Odatle su se, zatim, proširile po zaklonjenim klisurama zapadno od Vardara i dalje ka jugu. Mali deo njihovih populacija mogao je preživeti i na samim planina, u kom slučaju bi se, zbog male brojnosti i smenjivanja povoljnih i veoma nepovoljnih perioda, one odlikovale malim genetičkim diverzitetom. Što se tiče populacije na Suvoj planini, vrlo je verovatno da je ova vrsta tu postojala pre Ledenog doba. Sa zahlađenjem klime, uspostavljaju se nove populacije na manjim nadmorskim visinama, kao što su populacije kod sela Divljana, Radovanski Kamen i Oblik. Sa ponovnim otopljanjem, populacija na Suvoj planini se obnavlja, ali je povećanje genetičkog diverziteta u njoj usporeno usled nepovoljnijih uslova visokoplaninskog staništa. Velike genetičke distance i indeksi fiksacije između populacije na Suvoj planini i populacija *R. nathaliae* u Makedoniji ukazuju na činjenicu da su u JI Srbiji populacije ove vrste postojale pre Ledenog doba, a da su se u toku njega u klisurama ove oblasti formirala refugijalna pribežišta nezavisno od onih u Makedoniji.

Kod vrste *R. serbica* uočljiv je umereni trend opadanja genetičkog diverziteta od juga ka severu. Populacije sa juga areala (Grčka i Makedonija) odlikuju se većom heterozigotnošću u odnosu na one iz Srbije. S druge strane, i populacija sa samog severa areala, iz klisure Lazareve reke, karakteriše se nešto većom heterozigotnošću. S obzirom da se populacije iz Bugarske uglavnom odlikuju malom brojnošću (BILZ, 2011), za očekivati je da je u njima genetički diverzitet mali. Ako uporedimo genetičke distance i indekse fiksacije među populacijama, uočljivo je da su njihove vrednosti manje nego kod *R. nathaliae*. S obzirom da je način reprodukcije, oprašivanja i raznošenja semena kod dve vrste isti, objašnjenje za razliku u nivou diferencijacije između populacija najverovatnije leži u manjoj starosti vrste *R. serbica* ili je ona kasnije odreagovala na

prestanak Ledenog doba i otopljanje. U svakom slučaju, i ovde je postojalo više refugijuma iz kojih su preživele populacije proširile areal. Potencijalna ishodna refugijalna staništa su na severo-zapadu Grčke (Timfi), klisurama zapadne Makedonije, ali i na severo-istoku Srbije (klisura Lazareve reke). Verovatno da i neke populacije u Albaniji, takođe, predstavljaju refugijalna staništa još iz Ledenog doba. No, na žalost, materijal iz Albanije nam u trenutku rada na AFLP-u nije bio dostupan. Kako su najveće genetičke distance između populacije Timfi u Grčkoj i ostalih analiziranih populacija, za pretpostaviti je da su staništa u Grčkoj tešnje povezana sa populacijama u Albaniji. Populacije iz Crne Gore i Makedonije verovatno vode poreklo iz zajedničke refugijalne oblasti. Što se tiče lokaliteta u Srbiji, populacije u jugozapadnim delovima, po svemu sudeći, vode poreklo iz refugijuma sa severoistoka areala. Za populacije u JI Srbiji moguće je da su nastale prilikom spuštanja areala više ka jugu, a da je kasnije, posle Ledenog doba došlo do priliva genetičkog materijala iz južnijih refugijuma Makedonije.

## 6. ZAKLJUČAK

Balkansko poluostrvo je jedan od refugijuma u kome su pribežište našle brojne biljne i životinjske vrste za vreme Ledenog doba. *Ramonda nathaliae* i *R. serbica* su Tercijerni relikti, ostaci tropske i subtropske flore, nekada mnogo šire rasprostranjene na Balkanskom poluostrvu. Za vreme glacijacije, one se se povukle u klisure i kanjone, gde preživljavaju do današnjih dana. Kao „biljke koje vaskrsavaju“ i retki predstavnici familije *Gesneriaceae* u Evropi, ineteresantne su za različite tipove istraživanja.

Osnovni broj hromozoma kod roda *Ramonda* je  $x = 24$ . U svim istraživanim populacijama, broj hromozoma kod vrste *R. nathaliae* bio je  $2n = 48$ , isto kao kod *R. myconi* sa Pirinejskog poluostrva, a kod *R. serbica*  $2n = 144$ . Dakle, *R. myconi* i *R. nathaliae* su diploidi, a *R. serbica* je heksaploid. Veliki osnovni broj hromozoma ukazuje da se radi o drevnim poliploidima ili paleopoliploidima. Dalja, kasnija poliploidizacija dovela je do nastanka *R. serbica*, koja je verovatno autoploid. U populaciji ove vrste iz kanjona reke Cijevne, pronađeno je i nekoliko individua koje se odlikuju još većim brojem hromozoma i to  $2n = 8x = 192$  i  $2n = 10x = \sim 230$ .

Naša istraživanja pružaju prvi uvid u veličinu genoma dve vrste roda *Ramonda* sa Balkanskog poluostrva koja omogućavaju i poređenje sa pirinejskom *R. myconi*. Prosečna veličina genoma kod *R. myconi* je  $2C = 2,55$  pg, *R. nathaliae*  $2C = 2,34$  pg i *R. serbica*  $2C = 7,85$  pg, s tim što retki dekaploidi ove vrste imaju  $2C = 11,65$  pg. Monoploidna veličina genoma otkrila je veću sličnost između *R. myconi* ( $1Cx = 1,27$  pg) i *R. serbica* ( $1Cx = 1,31$  pg), dok *R. nathaliae* ima manju vrednost ovog parametra ( $1Cx = 1,17$  pg). Posebne pravilnosti u geografskom rasporedu istraživanih populacija u pogledu veličine genoma nema. Jedino je kod *R. nathaliae* uočljivo da visokoplaninske populacije sa Karadžice i sa Suve planine imaju nešto veću veličinu genoma.

Posebno su interesantni podaci o brojevima hromozoma i veličini genoma u simpatrijskim populacijama sa Oblika i Radovanskog Kamena. To su jedina dva lokaliteta gde dve balkanske vrste roda *Ramonda* žive zajedno. Na ovim lokalitetima,

našim rezultatima je po prvi put dokazano da, pored diploidnih individua *R. nathaliae* i heksaploida *R. serbica*, žive i hibridne individue nastale njihovim ukrštanjem. Naime, opsežnim istraživanjem broja hromozoma i, naročito, veličine genoma u ovim populacija (ukupno je analizirano 226 individua na Obliku i 179 na Radovanskom Kamenu) ustanovljeno je da postoje u znatnom broju i tetraploidne hibridne individue sa  $2n = 4x = 96$  hromozoma i  $2C = 5,14$  pg u proseku. Ove individue je na terenu teško morfološki razlikovati pre svega od vrste *R. serbica*, tako da su u toku detaljna morfometrijska istraživanja u ovim populacijama kako bi se utvrdilo na osnovu kojih karakterata bi bilo moguće prepoznati ih. Osim tetraploida, u simpatrijskim populacijama su u malom broju zastupljene i jedinke sa  $2C = 6,19$  pg koje bi mogle biti pentaploidi nastali ukrštanjem tetraploidnog hibrida sa heksaploidnom *R. serbica* ili spajanjem neredukovanog gameta diploidne *R. nathaliae* i *R. serbica*. Pronađene su, takođe, u malom broju i jedinke sa  $2C = 10,04$  pg, potencijalni oktoploidi koji su mogli nastati spontanom dupliciranjem genoma tetraploidnih hibrida.

Sve tri vrste roda *Ramonda* imaju polenova zrna slična ostalim predstavnicima familije *Gesneriaceae*. To su mala, 3 – kolporatna zrna, uglavnom sferoidnog, kružnog oblika. Kod dve diploidne vrste, *R. myconi* i *R. nathaliae* ona su slične veličine, dok su kod vrste *R. serbica* ona veća u skladu sa većom veličinom genoma. No, kako se minimalne i maksimalne veličine polenovih zrna tri vrste delimično preklapaju, ovaj karakter se mora koristiti obazrivo za njihovo razlikovanje. Polen populacija *R. nathaliae* iz Makedonije sličniji je polenu vrste *R. myconi* nego što je to slučaj sa populacijama iz Srbije. Mogući razlog je da te dve grupe populacija vode poreklo iz istih ancestralnih populacija.

Egzina polenovih zrna je kod roda *Ramonda* mikroretikularno-perforatna. Detalji njene morfologije se značajno razlikuju kod *R. nathaliae* kod koje je ona više perforatna, sa malim lumenima i *R. serbica* kod koje su lumeni egzine krupni sa velikim brojem perforacija. Karakteristike egzine polenovih zrna vrste *R. myconi* su intermedijarne između dve balkanske rođake.

Polen hibridnih individua je vrlo heterogen po broju kolpi (3-, 9- i 12-kolporatna zrna) i veličini polenovih zrna. Najverovatnije je da su 9- i 12- kolporatna zrna polijade

koje nastaju u procesu nepravilne mikrosporogeneze. Polen hibridnih individua je i manje vijabilnosti od polena roditeljskih vrsta.

Semena roda *Ramonda* su sitna, elipsoidnog oblika, bez adaptacija za neki poseban tip rasejavanja. Razlike u njihovim dimenzijama kod tri vrste su male, tako da se dužina i širina semena ne mogu koristiti kao jasan karakter za razlikovanje vrsta. Međutim, na površini semena prisutne su trouglaste strukture čija visina se razlikuje kod tri vrste. One su najizraženije kod *R. myconi* (visine 46 – 87  $\mu\text{m}$ ), nešto su manje kod *R. serbica* (32 – 44  $\mu\text{m}$ ), a najmanje kod *R. nathaliae* (21 – 30  $\mu\text{m}$ ). Njihova moguća uloga je u boljem pričvršćivanju za podlogu.

Masa semena je umereno korelisana sa veličinom genoma i brojem hromozoma, tako da su semena *R. serbica* veće mase nego kod diplodnih *R. myconi* i *R. nathaliae*.

Semena hibridnih individua su 2 do 3 puta manja od semena roditeljskih vrsta. Za razliku od *R. nathaliae* i *R. serbica* čija semena klijavu u velikom procentu, kod hibrida ona se odlikuju izuzetno malom klijavašću (1%). Postojanje hibrida između *R. nathaliae* i *R. serbica* pokazuje da mehanizmi koji bi sprečili njihovo uspešno ukrštanje još uvek nisu u potpunosti uspostavljeni. Kako su semena hibrida veoma male klijavosti, oni ostaju lokalizovani samo u simpatrijskim populacijama, u kojima su, ipak, dostigli veliku brojnost, verovatno zahvaljujući vegetativnom razmnožavanju.

U ekološkom pogledu, interesantni rezultati su dobijeni za populaciju vrste *R. nathaliae* sa serpentinske podloge iz klisure reke Pčinje. Naime, *R. nathaliae* je jedina među evropskim predstavnicima familije *Gesneriaceae* koja naseljava i serpentinsku podlogu. Uprkos čitavom nizu negativnih faktora koji na tom lokalitetu deluju (visoka temperatura, mala vlažnost, nedostatak hranljivih elemenata, visok sadržaj teških metala u podlozi i dr.), njene jedinke tu opstaju i formiraju relativno brojnu populaciju. Rozete su u proseku manjih dimenzija nego u populacijama sa krečnjaka. Odlikuju se najmanjim polenovim zrnama najslabije vijabilnosti među istraživanim populacijama, najmanjim semenima, pa čak i najmanjom veličinom genoma. Njen opstanak na ovakvom staništu je verovatno moguć upravo zahvaljujući poikilohidričnosti, koja povećava verovatnoću preživljavanja u najnepovoljnijem letnjem, toplom i sušnom periodu godine.

AFLP analiza genetičke strukture populacija dve vrste pokazala je jasnu razdvojenost *R. nathaliae* i *R. serbica*. Obe vrste odlikuju se relativno malim genetičkim diverzitetom, što je česta odlika endemičnih vrsta, ovde dodatno izražena zbog vegetativnog razmnožavanja i često negativnog uticaja spoljašnje sredine na uspešnost reprodukcije. Odsustvo dijagnostičkih fragmenata ukazuje, međutim, na ne tako davno odvajanje dve vrste.

Genetički diverzitet populacija dve vrste oslikava i uticaj Ledenog doba i savremenih uslova na njihovim staništima. Naime, današnji disjunktne areali dve vrste svakako su nastali kao posledica Ledenog doba, kada su ove vrste potražile utočište u skrivenijim klisurama i kanjonima. Ta refugijalna staništa su za *R. nathaliae* verovatno bila u klisurama zapadne Makedonije, kao što je Matka, ali i u klisurama JI Srbije. Vrsta *R. serbica* opstala je u refugijumima na SZ Grčke i Makedonije, ali i na SI Srbije, na primer u kanjonu Lazareve reke. Iz tih refugijalnih staništa nakon glacijacije, ponovo su počele da šire svoj areal, a novoobrazovane populacije odlikuju se manjim genetičkim diverzitetom usled efekta osnivača i uskog grla.

Kod obe vrste je dominantna varijabilnost unutar, a ne između populacija, što sugeriše na izolaciju putem distance. Indeksi fiksacije i genetičke distance među populacijama su veći kod *R. nathaliae*, na osnovu čega se može zaključiti da je ona starija vrsta čije su populacije duže vreme međusobno izolovane. Ovi parametri u populacijama *R. serbica* imaju znatno manje vrednosti, što ukazuje na mlađi nastanak populacija i doskorašnji protok gena među njima.

Populacije koje se odlikuju većim genetičkim diverzitetom imaju veću sposobnost odgovara na spoljašnje uslove sredine. Ukoliko je njihov genetički diverzitet manji, one su podložnije nepovoljnim uticajima spoljašnje sredine. Iako populacije dve balkanske vrste roda *Ramonda* najčešće deluju stabilne i sa velikim brojem individua, nizak genetički diverzitet u njima pokazuje da populacije obe vrste treba zaštititi. U tom smislu posebnu pažnju treba posvetiti populacijama koje se odlikuju nižim genetičkim diverzitetom, ali i simpatrijskim populacijama kao jedinim lokalitetima gde dve reliktno i endemične vrste, *R. nathaliae* i *R. serbica* žive zajedno i obrazuju hibride.



## 7. LITERATURA

- AGELET, A., MUNTANÉ, J., PARADA, M. & VALLÈS, J. (2002): Plantes medicinals del Pirineu català. Remeis i altres usos de 40 plantes de la cultura popular pirinenca. Sant Vicenç de Castellet, Farell.
- ALEXANDER, M. P. (1969): Differential staining of aborted and non-aborted pollen. - *Stain Technology* 44: 117–122.
- ANDERSON, M. J. (2003): PCO: a FORTRAN computer program for principal coordinate analysis. Department of Statistics, University of Auckland, New Zealand. <http://www.stat.auckland.ac.nz/~mja/Programs.htm>
- ARIF, I. A., BAKIR, M. A., KHAN, H. A., AL FARHAN, A. H., AL HOMAIDAN, A. A., BAHKALI, A. H., AL SADOON, M. AND SHOBRAK, M (2010): A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. – *International Journal of Molecular Sciences* 11: 2079-2096.
- AUGUSTI, A., SCARTAZZA, A., NAVARI-IZZO, F., SGHERRI, C. L. M., STEVANOVIĆ, B., BRUGNOLI, E. (2001): Photosystem II photochemical efficiency, zeaxanthin and antioxidant contents in the poikilohydric *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. - *Photosynthesis Research* 67: 79-88.
- BARTHLOTT, W. (1981): Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. - *Nordic Journal of Botany* 1: 345-355.
- BEAUFORT-MURPHY, H. T. (1983): The seed-surface morphology of the Gesneriaceae, utilizing the scanning electric microscope and a new system for diagnosing seed morphology. - *Selbyana* 6: 220-422.
- BEAULIEU, J. M., MOLES, A. T., LEITCH, I. J., BENNETT, M. D., DICKIE, J. B. & KNIGHT, C. A. (2007): Correlated evolution of genome size and seed mass. - *New Phytologist* 173: 422-437.

- BILZ, M. (2011): *Ramonda serbica*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Downloaded on 1 June 2012.
- BOISSIER, E. (1875): *Flora orientalis sive enumeratio plantarum in oriente a Graecia et Aegypto ad Indiae fines*, vol. 4 pars. 1. H. Georg, Genevae et Basileae.
- BORHIDI, A. (1968): Karyological studies on South-European plant species. - *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* 14: 253-260.
- BORNMÜLLER, J. (1925/28): *Beitrage zur Flora Mazedoniens*. Engler's Botanische Jahrbücher.
- BREMER, K., FRIIS, E. M. AND BREMER, B. (2004): Molecular phylogenetic dating of asterid flowering plants shows early Cretaceous diversification. – *Systematic Biology* 53: 496-505.
- BROCHMANN, C. (1992): Pollen and seed morphology of Nordic *Draba* (Brassicaceae): phylogenetic and ecological implications. - *Nordic Journal of Botany* 12: 657-673.
- BROWN, R. (1839): On *Cyrtandrae*. [Part reprint from BENNETT, J. J. & BROWN, R., *Plantae Javanicae Rariores*, part 1 incl. t. 24, mostly preprint from part 2: 105-122 and t. 25].
- BURTT, B. L. (1963): Studies in the Gesneriaceae of the Old World XXIV. Tentative keys to the tribes and genera. – *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 24: 205-220.
- BURTT, B. L. (1998): Climatic accommodation and phytogeography of the Gesneriaceae of the Old World. In: Mathew, P. and Sivadasan M. (eds.), *Diversity and taxonomy of tropical flowering plants*, 1-27. Mentor Books, Kerala, India.
- CACERES, M. E., DE PACE, C., SCARASCIA MUGNOZZA, G. T., KOTSONIS, P., CECCARELLI, M., CIONINI, P. G. (1998): Genome size variations within *Dasypyrum villosum*: correlations with chromosomal traits, environmental factors and plant phenotypic characteristics and behaviour in reproduction. – *Theoretical and Applied Genetics* 96: 559-567.

- CALDUCH, J., F., ANTICH, J. B., APARICIO, J. M. R., ARASA, A. T., ARRUFAT, M. S., BALADA, R. L., BELTRAN, J. G., CARDERO, S. A., FORCADELL, J.-M. R., MAYOL, M. M., MESA, D. R., MOISES, J. R., MORO, J. D., RIBA, M. R., ROYO, F. P., DE TORRES, L. E. (2007): Presencia de *Ramonda myconi* (L.) Rchb. a la Serra de Montsia. –Toll Negre 9: 6-13.
- CECCARELLI, M., FALISTOCCO, E., CIONINI, P. G. (1992): Variation of genome size and organization within hexaploid *Festuca arundinacea*. - Theoretical and Applied Genetics 83: 273-278.
- CHAKRABORTY, R. AND JIN, L. (1993): Determination of relatedness between individuals by DNA fingerprinting. – Human Biology 65: 875-895.
- COMES, H. P. & KADEREIT, J. W. (1998): The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. – Trends in plant sciences Vol. 3, No. 11: 432-438.
- CONTANDRIOPOULOS, J. (1966): Contribution à l'étude caryologique des Gesneriacées d'Europe et de leur germination. 91 Congrès des Sociétés Savantes, Rennes 3: 271-280.
- CRONK, Q. C. B., KIEHN, M., WAGNER, W. & SMITH, J. F. (2005): Evolution of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) in the Pacific Ocean: The origin of a supertramp clade. – American Journal of Botany 92: 1017-1024.
- ČERNJAVSKI, P. (1928): Anabioza *Ramondia nathaliae* Pancic- Petr. –Journal de la Soc. Bot. de Russie, T. 13, IV: 1-2.
- DASKALOVA, E., DONTCHEVA, S., ZEKAJ, Z., BACU, A., SOTA, V., ABDULLAI, K., GASHI, B., MINKOV, I., TONEVA, V., KONGJIKA, E. (2012): Initial determination of polymorphism and *In vitro* conservation of some *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae* populations from Albania, Macedonia and Bulgaria. – Biodiversity and Ecosystems, Vol. 26, No. 1, DOI: 10.5504/50YRTIMB.2011.0004
- DOLEŽEL, J., BARTOŠ, J., VOGLMAYR, H. & GREILHUBER, J. (2003): Nuclear DNA content and genome size of trout and human. - Cytometry 51A: 127-128.

- DONTCHEVA, S., DASKALOVA, E., YAHUBYAN, G., DENEV, I., MINKOV, I. TONEVA, V. (2009): Conservation of the protected resurrection species *Ramonda serbica* Panc. – Habitat montana district, Bulgaria as *in vitro* plants through a modified micropropagation system. – Biotechnology and Biotechnol. Eq. 23/2009/SE, Special Edition On-line, 369-372.
- DRAŽIĆ, G., MIHAILOVIĆ, N., STEVANOVIĆ, B. (1998): Chlorophyllase activity under the drought. - Ekologija (Beograd), 33(1-2): 91-96.
- DRAŽIĆ, G., MIHAILOVIĆ, N., STEVANOVIĆ, B. (1999): Chlorophyll metabolism in leaves of higher Poikilohydric plants *Ramonda serbica* Panč. and *Ramonda nathaliae* Panč. et Petrov. during dehydration and rehydration. - Journal of Plant Physiology 154: 379-384.
- DUBREUIL, M., RIBA, M. & MAYOL., M. (2008): Genetic structure and diversity in *Ramonda myconi* (Gesneriaceae): effects of historical climate change on a preglacial relict species. - American Journal of Botany 95 (5): 577-587.
- ERDTMAN, G. (1943): An Introduction to Pollen Analysis. Waltham, Mass., U.S.A.: Chronica Botanica Company.
- ERDTMAN, G. (1952): Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms (An Introduction to Palynology). Stockholm, Sweden: Almqvist & Wiksel.
- EXCOFFIER, L. AND LISCHER, H. E. L. (2010): Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. – Molecular Ecology Resources 10: 564-567.  
<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/Arlequin35.html>
- FEULGEN, R., AND ROSSENBECK, H. (1924): Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Hoppe-Seyler's Zeitschr. - Physiol. Chem. 135: 203-248.
- FOURNEY DA SILVA, A. C., MENDONÇA, C. B. F., LOPES, T. C. C. & GONÇALVES-ESTEVEZ, V. (2010). Palinologia de espécies de Gesneriaceae Rich. & Juss. ocorrentes no estado do Rio de Janeiro. - Acta Botanica Brasilica 24 (3): 812-824.

- FRITZE, K. & WILLIAMS, N. H. (1988): The taxonomic significance of pollen morphology in the *Columnnea* alliance (Gesneriaceae: Gesnerioideae). - *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 168-191.
- FRIVALDSKZY, I. (1835): Közlések a' Balkany' vidékén tett természettudományi utazásról. *Magyar Tud. Tars. Evk.* 2: 235-276.
- FUCHS, M. C. P., DE SOUSA, S. M., SANMARTIN-GAJARDO, I. & VICCINI, L. F. (2011): Chromosome number in meiotic stage cells and pollen viability of *Vanhouttea hilariana* Chautems, *Vanhouttea brueggeri* Chautems and an interespecific hybrid (Gesneriaceae). - *Anales de Biología* 33: 35-40.
- GAFF, D. F. & HALLAM, N. D. (1974): Resurrecting desiccated plants. In: Bielecki, R. L., Ferguson, A. R., Creswell, M. M. (eds.): *Mechanisms of regulation of plant growth*. - *Roy. Soc. NZ Bull.* 12: 389-393.
- GALBRAITH, D., HARKINS, K., MADDOX, J., AYRES, N., SHARMA, D. AND FIROOZABADY, E. (1983): Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. - *Science* 220: 1049-1051.
- GASPARINO, E. C. (2008): *Palinotaxonomia de especies brasileiras de Gesneriaceae, com enfase nas ocorrentes no Estado de Sao Paulo*. Tese Doutorado, Instituto de Botanica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente.
- GE, S., WANG, K.-Q., HONG, D.-Y., ZHANG, W.-H. AND ZU, Y.-G. (1999): Comparisons of Genetic Diversity in the Endangered *Adenophora lobophylla* and Its Widespread Congener, *A. potaninii*. - *Conservation Biology*, Vol. 13, No. 3: 509-513.
- GLIŠIĆ, LJ. (1924): *Development of the female x-generation and embryo in Ramonda*. PhD thesis, University of Belgrade, Yugoslavia.
- GLIŠIĆ, O., STEVANOVIĆ, B., BOKOROV, M. (1997): Morfoloske promene trihoma indumentuma na listovima *Ramonda serbica* Panc. Tokom procesa dehidracije. In: *Elektronska mikroskopija u medicini i nauci o materijalima*, 40 godina elektronske mikroskopije u Srbiji, 11-12.

- GODELLE, B., CARTIER, D., MARIE, D., BROWN, S. C. AND SILJAK-YAKOVLEV, S. (1993): Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. - *Cytometry* 14: 618-626.
- HALBRITTER, H. (2000 onwards): *Haberlea rhodopensis*. In: BUCHNER, R. & WEBER, M. PalDat – a palynological database: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. <http://www.paldat.org/>
- HAMRICK, J. L. & GODT, M. J. W. (1996): Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. – *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, Vol. 351, No. 1345, Plant Life Histories: Ecological Correlates and Phylogenetic Constraints (Sep. 30, 1996): 1291-1298.
- HAYEK, A. (1917): Beitrag zur kenntnis der Flora des albanisch-montenegrinischen Grenzgebietes. – *Kaiserl. Akad. Wis., Wien, Math.-Naturwiss. Kl., Denkschr.* 96: 127-210.
- HESSE, M., HALBRITTER, H., ZETTER, R., WEBER, M., BUCHNER, R., FROSCH-RADIVO, A. & ULRICH, S. (2009): *Pollen Terminology. An Illustrated Handbook*. Wien: Springer-Verlag.
- HEWITT, G. M. (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. – *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- HOLMGREN, P. K., HOLMGREN, N. H., AND BARNETT, L. C. (eds.) (1990): *Index Herbariorum. Part1: The Herbaria of the World. Regnum Vegetabile [series]*, vol. 120. New York Botanical Garden, Bronx, New York.
- HORVAT, I. (1935): Istraživanje vegetacije planina Vardarske banovine. – *Ljetop. Ak. zn. i umj.* 47, Zagreb.
- JANKOVIĆ, M., STEVANOVIĆ, V. (1981): Contribution to the knowledge of phytocoenoses with *Ramonda serbica* Panč. in the gorges of N Šara mountain. – *Ekologija (Beograd)*, 16: 1-34
- JOMBART, T., DEVILLARD, S., BALLOUX, F. (2010): Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. – *BMC Genetics* 11: 94

- JOVANOVIĆ, Ž., RAKIĆ, T., STEVANOVIĆ, B., RADOVIĆ, S. (2011): Characterization of oxidative and antioxidative events during dehydration and rehydration of resurrection plant *Ramonda nathaliae*. - *Plant Growth Regulation*, Vol. 64, No. 3: 231-240.
- JOVANOVIĆ-DUNJIĆ, R. (1953): Fitocenoza Ramondija u Srbiji. – Godišnjak Biološkog instituta u Sarajevu, God. V (1952), Sv. 1-2 (Spomenica Karlu Maly-u), Sarajevo.
- JOVANOVIĆ-DUNJIĆ, R. (1974): *Ramonda* Rich. In: JOSIFOVIĆ, M. (ed.). Flora SR Srbije 7: 282-284, Beograd.
- KOLEHMAINEN, J. (2008): Ecology, population genetics and conservation of the African violet (*Saintpaulia*, Gesneriaceae). Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Finland. Academic Dissertation.
- KONGJKA, E., ZEKA, ZH., ÇAUSHI, E., STAMO, I., BABANI, F. (2001): Use of biotechnological methods for the Albanian genetic resources. – *Options Méditerranéennes, Série A n. 47*: 171-182.
- KOŠANIN, N. (1921): La distribution géographique des deux espèces de *Ramondia* du Balkan. *Academie des Sciences et Arts de Belgrade*, 34-49.
- KOŠANIN, N. (1939): Gradja za biologiju *Ramondia nathaliae*, *R. serbica* i *Ceterach officinarum*. - *Spomenik Srp. Kralj. Akad. LXXXIX, Prvi razred* 20: 1-68. Srpska Kraljevska Akademija, Beograd.
- KURTO, A., LAMPINEN, R. AND JUNIKKA, L. (eds.) (2004): Atlas florae Europaeae. Distribution of vascular plants in Europe. 13 Rosaceae. The Committee for Mapping the Flora of Europe and Societas Biologica Fennica, Helsinki, 14-15.
- KVIST, L. P. & SKOG, L. E. (1992) : Revision of *Kohleria* (Gesneriaceae). - *Smithsonian Contribution to Botany* 79: 1-83.
- LAKUŠIĆ, R. (1968): Planinska vegetacija jugoistočnih Dinarida. – *Glasnik Republičkog zavoda za zaštitu prirode i prirodnjačke zbirke i Titogradu*, 1: 9-77.
- LANGELLA, O. (1999): POPULATIONS version 1.2.30: population genetic software. CNRS UPR9034.

- LAZAREVIC, M., SILJAK-YAKOVLEV, S., STEVANOVIC, V., CATRICE, O., BROWN, S. C., STEVANOVIC, B. (2007): Genome size and ploidy level of *Ramonda serbica* and *R. nathaliae* in two sympatric populations from South Serbia. – Abstract Book, III Congress of Ecologists of the Republic of Macedonia with International Participation, Struga, 06-09.10.2007, Macedonian Ecological Society, pp. 39.
- LAZAREVIĆ, M., SILJAK-YAKOVLEV, S., LAZAREVIĆ, P., STEVANOVIĆ, B., STEVANOVIĆ, V. (2009): Pollen and seed morphology of resurrection plants *Ramonda serbica*, *R. nathaliae* and its hybrids. –5th Balkan Botanical Congress, Book of Abstracts, 07-11 September 2009, Belgrade, Serbia, pp. 116.
- LEITCH, I. J. & BENNETT, M. D. (2004): Genome downsizing in polyploid plants. – Biological Journal of the Linnean Society 82: 651-663.
- LEPPER, L. (1970): Beitrage zur Chromosomenzahlen-Dokumentation. - Naturwiss. Reihe 19: 369-376.
- LUEGMAYR, E. (1993a). Pollen characters of Old World Gesneriaceae (Cyrtdandroideae). - Grana 32 (4-5): 221-232.
- LUEGMAYR, E. (1993b). Pollen of Hawaiian *Cyrtandra* (Gesneriaceae), including notes on Southeast Asian taxa. - Blumea 38: 25-38.
- MACGILLIVRAY, C. W & GRIME, J. P. (1995): Genome size predicts frost resistance in British herbaceous plants: implications for rates of vegetation response to glabl warming. – Functional Ecology 9: 320-325.
- MARIE, D. AND BROWN, S. (1993): A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. - Biology of the Cell 78: 41-51.
- MARKU, H. (2007). Libri i Kuq i Florës Shqiptare. Tiranë.
- MAYER, V., MÖLLER, M., PERRET, M. & WEBER, A. (2003): Phylogenetic position and generic differentiation of Epithemateae (Gesneriaceae) inferred from plastid DNA sequence data. – American Journal of Botany 90: 312-329.
- MELHELM, T. & MAURO, C. (1973): Pollen morphological studies in Gesneriaceae. - Hoehnea 3: 13-27.



- MICEVSKI, K. (1956): Eine überprüfung der verbreitungsgebiete von *Ramonda nathaliae* Panc. et Petrov. und *Ramonda serbica* Panc. in Mazedonien und eine zusammenfassung der charakteristischen merkmale der beiden arten. - *Annuaire de la Faculté de Philosophie de l'Université de Skopje* 9: 121-142.
- MILNE, C. (1975): Chromosome numbers in the Gesneriaceae: V. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 33(3): 523-525.
- MÖLLER, M., PFOSSER, M., JANG, C.-G., MAYER, V., CLARK, A., HOLLINGSWORTH, M. L., BARFUSS, M. H. J., WANG, Y.-Z., KIEHN, M. & WEBER, A. (2009): A preliminary phylogeny of the 'didymocarpoid Gesneriaceae' based on three molecular data sets: incongruence with available tribal classifications. - *American Journal of Botany* 96 (5): 989-1010.
- MÜLLER, J., SPRENGER, N., BORTLIK, K., BOLLER, T., WIEMKEN, A. (1997): Desiccation increases sucrose levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in the Gesneriaceae. – *Physiologia Plantarum* 100: 153-158.
- NEI, M., MARUYAMA, T. AND CHAKRABORTY, R. (1975): The bottleneck effect and genetic variability in populations. – *Evolution* 29, 1-10.
- NI, X., HUANG, Y., WU, L., ZHOU, R., DENG, S., WU, D., WANG, B., SU, G., TANG, T. & SHI, S. (2006): Genetic diversity of the endangered Chinese endemic herb *Primulina tabacum* (Gesneriaceae) revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). – *Genetica* 127: 177-183.
- NIKETIĆ, M. (1996): Floristička raznovrsnost specijalnog rezervata prirode Jelašnička klisura. – V Kongres ekologa Jugoslavije. Zbornik sažetaka. Društvo ekologa Srbije u saradnji sa Društvom ekologa Crne Gore, Beograd, 35.
- OLMSTEAD, R. G., DEPAMPHILIS, C. W., WOLFE, A. D., YOUNG, N. D., ELISONS, W. J. AND REEVES, P. A. (2001): Disintegration of the Scrophulariaceae. – *American Journal of Botany*, Vol. 88, No. 2: 348-361.
- PANČIĆ, J. (1874): Flora Knezevine Srbije. Beograd.
- PEEV, D. (ed.) (2011). Red Data Book of the republic of Bulgaria. Vol. 1. Plants and Fungi. Bulgarian Academy of Sciences, Ministry of the Environment and Water of Bulgaria.

- PETKOVIĆ, B., MARIN, P., TATIĆ, B., STEFANOVIĆ, M. (1985): Novo nalazište srpske ramondije (*Ramonda serbica* Panč.) u klisuri reke Godulje, leve pritoke Ibra. - Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, Tom XIX: 169-175.
- PETKOVIĆ, B., TATIĆ, B., MARIN, P., ILIJIN-JUG, M. (1986): Novo nalazište srpske ramondije (*Ramonda serbica* Panč.) u klisuru Crne reke desne pritoke Ibra. - Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, Tom XX: 65-71.
- PETKOVIĆ, B., TATIĆ, B., MARIN, P., ILIJIN-JUG, M. (1988): Dve nove zajednice srpske ramondije (*Ramonda serbica* Panč.) u gornjem toku sliva reke Ibra. - Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, Tom XXII: 107-117.
- PETROVIĆ, S. (1882): Flora okoline Niša. Kraljevsko-srpska državna štamparija, Beograd.
- PETROVIĆ, S. (1885): Ramondije u Srbiji i familija Cirtandraceje. - Glasnik Srpskog Učenog Društva XXX, Nova serija 62: 101-123.
- PICO, F. X. & RIBA, M. (2002). Regional-scale demography of *Ramonda myconi*: remnant population dynamics in a preglacial relict species. - Plant Ecology 161: 1-13.
- PICÓ, F. X., MÖLLER, M., OUBORG, N. J. AND CRONK, Q. C. B. (2002): Single Nucleotide Polymorphism in the Coding Region of the Developmental Gene *Gcyc* in Natural Populations of the Relict *Ramonda myconi* (Gesneriaceae). - Plant Biology 4: 625-629.
- PLUESS, A. R., SCHÜTZ, W., STÖCKLIN, J. (2005): Seed weight increases with altitude in the Swiss Alps between related species but not among populations of individual species. - Oecologia 144: 55-61.
- PUNT, W., HOEN, P. P., BLACKMORE, S., NILSSON, S. & LE THOMAS, A. (2007): Glossary of pollen and spore terminology. - Review of Palaeobotany and Palynology 143 (1-2): 1-81.

- QUARTACCI, M., GLIŠIĆ, O., STEVANOVIĆ B., NAVARI-IZZO. F. (2002): Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* Panč. following dehydration and rehydration - *Journal of Experimental Botany* 53(378): 2159-2166.
- QUEZEL, P. (1967). La vegetation des hautes sommets du Pinde et de l'Olympe de Thessalie. – *Vegetation*, 14, 127-228.
- QUEZEL, P. (1968): Signification phytosociologique des Gésneriacées Grecques. *Collectanea Botanica* 7: 947-973.
- RADULOVIĆ, N. S., BLAGOJEVIĆ, P. D., PALIĆ, R. M., ZLATKOVIĆ, B. K., STEVANOVIĆ, B. M. (2009): Volatiles from vegetative organs of the palaeoendemic resurrection plants *Ramonda serbica* Panč. and *Ramonda nathaliae* Panč. e Petrov. – *Journal of the Serbian Chemical Society* 74(1): 35-44.
- RAKIC, T., QUARTACCI, M. F., CARDELLI, R., NAVARI-IZZO, F., STEVANOVIĆ, B. (2009): Soil properties and their effects on water and mineral status of resurrection *Ramonda serbica*. – *Plant Ecology* 203: 13-21.
- RATTER, J. A. & PRENTICE, H. T. (1964): Chromosome numbers in the Gesneriaceae. II- Notes of Royal Botanic garden of Edinburgh 25: 303-307.
- RATTER, J. A. (1963): Some chromosome numbers in the Gesneriaceae. – Notes of Royal Botanic garden of Edinburgh 24: 221-229.
- RAVEN, P. H. & AXELROD, D. I. (1974). Angiosperm biogeography and past continental movements. – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 539-673.
- REEVES, G., FRANCIS, D., STUART DAVIES, M., ROGERS, H. J. AND HODKINSON, T. R. (1998): Genome size is Negatively Correlated with Altitude in Natural Populations of *Dactylis glomerata*. – *Annals of Botany* 82 (suppl 1): 99-105.
- RICHARD, L. C. M. (1805): *Ramonda*. In: Persoon, C. H. (ed.), *Synopsis Plantarum* 1: 216-217. C. F. Cramarum, Paris.
- RIX, E.M. & WEBB, D.A. (1972). *Ramonda* L.C.M. Richard. In: TUTIN, T.G., HEYWOOD, V.H., BURGESS, N.A., MOORE, D.M., VALENTINE, D.H., WALTERS, S.M. & WEBB, D.A. (eds.), *Flora Europaea*, vol. 3. Diapensiaceae to Myoporaceae. Cambridge University Press, Cambridge, 284-285.

- ROHLENA, J. (1942): *Conspectus florum montenegrinae*. – *Preslia* 20-21: 1-506.
- SABOVLJEVIĆ, A., SABOVLJEVIĆ, M., RAKIĆ, T., STEVANOVIC, B. (2008): Establishment of procedures for *in vitro* maintenance, plant regeneration, and protoplast transfection of the resurrection plant *Ramonda serbica*. – *Belgian Journal of Botany* 141(2): 178-184.
- SCHLAG-EDLER, B. & KIEHN, M. (2001). Palynology of South Pacific Cyrtandra (Gesneriaceae) with notes on some Hawaiian taxa. - *Grana* 40 (4-5): 192-196.
- SGHERRI, C., STEVANOVIĆ, B., NAVARI-IZZO, F. (2004): Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. - *Physiologia Plantarum*, 122(4): 478-485.
- SILJAK-YAKOVLEV, S., STEVANOVIĆ, V., TOMAŠEVIĆ, M., BROWN, S. C., STEVANOVIC, B. (2008): Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*: Cytogeography of living fossils. – *Environmental and Experimental Botany* 62: 101-112.
- SKOG, L. E. & BOGGAN, J. K. (2007). *World Checklist of Gesneriaceae*. Washington, DC: Department of Botany, Smithsonian Institution. Website: <http://botany.si.edu/Gesneriaceae/Checklist> [accessed 19 September 2012].
- SMITH, J. F. (2000): Phylogenetic signal common to three data sets: Combining data which initially appear heterogeneous. – *Plant Systematics and evolution* 221: 179-198.
- SMITH, J. F., HILEMAN, L. C., POWELL, M. P. & BAUM, D. A. (2004): Evolution of *GCYC*, a Gesneriaceae homolog of *CYCLOIDEA*, within Gesnerioideae (Gesneriaceae). – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 765-779.
- SONTAG, S. & WEBER, A. (1998): Seed coat structure of *Didissandra*, *Ridleyandra* and *Raphiocarpus* (Gesneriaceae). - *Beitraege zur Biologie der Pflanzen* 70: 179-190.
- SOŠKA, TH. (1933): Beitrag zur Marmorflora der Umgebung von Prilep (Süd-serbien). – *Bull. Inst. Jard. Bot. Univ. Belgrade* 2(3): 176-182.
- SOŠKA, TH. (1937/40): Beitrag zur Kenntnis der Schluchtenfloren von Süd-serbien, I, II, III, IV Teil. *Glasnik Skopskog naučnog društva*, knj. XVIII, XX, XXII.

- STEFANOFF, B. AND GEORGIEV, T. (1937): *Ramondia serbica* Panc. in Bulgaria. - *Annuaire de l'Universite de Sofia* 15 (2): 42-53.
- STEFANOV, K., MARKOVSKA, Y., KIMENOV, G. & POPOV, S. (1992): Lipid and sterol changes in leaves of *Haberlea rhodopensis* and *Ramonda serbica* at transition from biosis into anabiosis and vice versa caused by water stress. - *Phytochemistry* 31: 2309-2314.
- STEFANOVIĆ, M., GRUBIŠIĆ, D., NEŠKOVIĆ, M. (1986): Uticaj svetlosti i hormona na klijanje semena *Ramonda serbica* Panč. (*Gesneriaceae*). - *Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu*, Tom XX: 1-7.
- STEVANOVIĆ, B. (1986): Ecophysiological characteristics of the species *Ramonda serbica* Panč. and *Ramonda nathaliae* Panč. et Petrov. - *Ekologija* (Beograd) 21(2): 119-132.
- STEVANOVIĆ, B. (1989-1991): Water relations of *Ramonda serbica* Panč. and *Ramonda nathaliae* Panč. et Petrov. in different habitat conditions. - *Glasnik Instituta za botaniku i Botaničke bašte Univerziteta u Beogradu* 23: 44-50.
- STEVANOVIĆ, B., GLIŠIĆ, O. (1997): Ecoanatomical differences between balkan endemorelic species of *Gesneriaceae*. - *Bocconea* 5: 661-666.
- STEVANOVIĆ, B., GLIŠIĆ, O., ŠINŽAR, J. (1996): Electrolyte leakage in relation to the desiccation effect in poikilohydric *Ramonda serbica* Panč. - *Archives of Biological Sciences, Beograd*, 48(3-4): 23P-24P.
- STEVANOVIĆ, B., PHAM THI, A. T. MONTEIRO DA PAULA, F., VIERA DA SILVA, J. (1992): Effect of dehydration and rehydration on the polar lipid and fatty acid composition of *Ramonda* species. - *Canadian Journal of Botany* 70: 107-113.
- STEVANOVIĆ, B., ŠERBAN, N. (1997): Lamelarna tela u hidratisanim ćelijama mezofila kod vrsta roda *Ramonda* i odstranjivanje ostarelih mitohondrijskih membrana. - *In: Elektronska mikroskopija u medicini i nauci o materijalima, 40 godina elektronske mikroskopije u Srbiji*, 19-20.
- STEVANOVIĆ, B., ŠINŽAR, J., GLIŠIĆ, O. (1997/1998): Electrolyte leakage differences between poikilohydrous and homoiohydrous species of *Gesneriaceae*. - *Biologia Plantarum* 40: 299-303.

- STEVANOVIĆ, V. & BULIĆ, Z. (1992): New data on chorology and phytocoenology of the species *Ramonda serbica* Panč. (Gesneriaceae) in Montenegro. – Glasnik Republičkog Zavoda za Zaštitu Prirode – Prirodnjački Muzej 25: 7-16.
- STEVANOVIĆ, V., NIKETIĆ, M., STEVANOVIĆ, B. (1986): O rasprostranjenju endemo-reliktne vrste *Ramonda serbica* Panč. u SR Makedoniji. - Glasnik Prirodnjačkog Muzeja u Beogradu, ser. B, 41: 89-95.
- STEVANOVIĆ, V., NIKETIĆ, M., STEVANOVIĆ, B. (1986): Sympatric area of the sibling and endemo-relic species *Ramonda serbica* Panč. and *R. nathaliae* Panč. et Petrov. (Gesneriaceae) in southeast Serbia (Yugoslavia). - Glasnik Instituta za botaniku i Botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, 20: 45-54.
- STEVANOVIĆ, V., NIKETIĆ, M., STEVANOVIĆ, B. (1987): Fitocenološke karakteristike simpatričkih staništa endemo-reliktnih vrsta *Ramonda serbica* Panč. i *R. nathaliae* Panč. et Petrov. - Glasnik Instituta za botaniku i Botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, 21: 17-26.
- STEVANOVIĆ, V., NIKETIĆ, M., STEVANOVIĆ, B. (1991): Chorological differentiation of the endemic and relic species *Ramonda serbica* Panč. and *R. nathaliae* Panč. et Petrov. (Gesneriaceae) on the Balkan Peninsula. – Bot. Chron. 10: 507-515.
- STEVANOVIĆ, V., OSTOJIĆ, D., TOMOVIĆ, G. STEVANOVIĆ, B. (1997): Discovery of endemo-relict species *Ramonda nathaliae* Pančić et Petrović (Gesneriaceae) in Šara Mt. - Archives of Biological Sciences, Beograd, 49(3-4): 27P-28P.
- STEVANOVIĆ, V., STEVANOVIĆ, B. (1985): *Asplenio cuneifolii-Ramondetum nathaliae* - nova hazmofitska fitocenoza na serpentinitima severne Makedonije. - Glasnik Prirodnjačkog Muzeja u Beogradu, ser. B, 40: 45-54.
- STOREY, M., MAHONEY, J. J., SAUNDERS, A. D., DUNCAN, R. A., KELLEY, S. P. AND COFFIN, M. F. (1995): Timing of hot spot-related volcanism and the break-up of Madagascar and India. – Science 267: 852-855.
- STRID, A. (1991): Gesneriaceae. In: STRID, A. AND TAN, K. (eds.), Mountain Flora of Greece, Volume Two, 259-263. Edinburgh University Press.

- TAN, K., SFIKAS, G. & VOLD, G. (2008). Reports 82-90. In: VLADIMIROV, V., DANE, F. & TAN, K. (eds.), New floristic records in the Balkans: 8. – *Phytologia Balcanica* 14(2): 291-304.
- TATIC, B. STEFANOVIĆ, M. (1976): Chemical analysis of stones and soil of the habitats of *Ramonda* species in Yugoslavia. – *Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu*, Tom XI nov. ser., No 1-4, 127-131.
- TOMOVIĆ, G. (2007): Fitogeografska pripadnost, distribucija i centri diverziteta balkanske endemične flore u Srbiji. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- TORRES, E., IRIONDO, J. M., PEREZ, C. (2003): genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. – *American Journal of Botany* 90(1): 85-92.
- UTELLI, A.-B., ROY, B. A. AND BALTISBERGER, M. (1999): History can be more important than 'pollination syndrom' in determining the genetic structure of plant populations: the case of *Aconitum lycoctonum* (Ranunculaceae). – *Heredity* 82: 574-584.
- VANDAS, C. (1909): Reliquiae Formanekianae, Brunae.
- VEKEMANS, X. (2002): AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- VELČEV, V., JORDANOV, D., GANČEV, SL. (1973): Untersuchung an *Ramonda serbica* Panc. in Bulgarien. – *Bull. Inst. Bot. Acad. Bulg. Svien.* 24: 131-167.
- VELČEV, V., KOŽUHAROV, S., ANČEV, M. (eds.) (1992): Atlas of the Endemic Plants in Bulgaria. – Bulgarian Academy of Science, Sofia. 204 p.
- VELENOVSKY, J. (1898): *Flora Bulgarica, Supplementum. Pragae.*
- VELJOVIĆ-JOVANOVIĆ, S., KUKAVICA, B., STEVANOVIĆ, B. AND NAVARI-IZZO, F. (2006): Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. – *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No.8: 1759-1768.

- VLADIMIROV, V. (2011): *Ramonda serbica*. In: PEEV, D. (ed.). Red Data Book of the republic of Bulgaria. Vol. 1. Plants and Fungi. Bulgarian Academy of Sciences, Ministry of the Environment and Water of Bulgaria.
- VOLIOTIS, D. (1981): Neue und seltene Taxa für die griechische Flora aus dem Voras Gebirge VI. – *Botanica Chronica* 1 (2): 115-123.
- VOS, P. HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T. V. D., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PEIEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- WANG, Y.-Z., LIANG, R.-H., WANG, B.-H., LI, J.-M., QIU, Z.-J., LI, Z.-Y., WEBER, A. (2010): Origin and phylogenetic relationships of the Old World Gesneriaceae with actinomorphic flowers inferred from ITS and *trnL-trnF* sequences. – *Taxon* 59(4): 1044-1052.
- WEBER, A. (2004): Gesneriaceae. Pp. 63-158. In: KUBITZKI, K. & KADEREIT, J. W. (eds.), *The families and genera of vascular plants*, vol. 7, Flowering plants: Dicotyledones; Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae). Berlin: Springer.
- WEBER, A. (2012): Gesneriaceae. A Scientific Perspective. [http://www.gesneriads.ca/Articles/Weber%20-%20Scientific%20Overview/Gesneriaceae\\_Article\\_Weber.htm](http://www.gesneriads.ca/Articles/Weber%20-%20Scientific%20Overview/Gesneriaceae_Article_Weber.htm). Last downloaded on 6 June 2012.
- WETTSTEIN, R. (1892): Beitrag zur Flora Albaniens. Bearbeitung der von J. Dörfler im Jahre 1890 im Gabiete des Šar-Dagh gesammelten Pflanzen. – *Bibliotheca Botanica* 5(26): 1-103.
- WIEHLER, H. (1983): A synopsis of Neotropical Gesneriaceae. – *Selbyana* 6: 1-219.
- WIEHLER, H. (1994): A re-examination of *Sanango racemosum*. 4. Its new systematic position in the Gesneriaceae. – *Taxon* 43: 625-632.
- WILLIAMS, N. H. (1978): Pollen structure and the systematics of the neotropical Gesneriaceae. – *Selbyana* 2: 310-322.
- ZAGANIARIS, D. N. (1940): Herbarium macedonicum. Tertium et quartum mille. – *Epist. Epet. Shol. Fis. Math. Epist. Panepist. Thessaloniki* 6: 38-139.



- ZIMMER, E. A., ROALSON, E. H., SKOG, L. E., BOGGAN, J. K. AND IDNURM, A. (2002): Phylogenetic relationships in the Gesnerioideae (Gesneriaceae) based on nrDNA and cpDNA *trnL-F* and *trnE-T* spacer region sequences. – American Journal of Botany 89: 296-311.
- ZONNEVELD, B. J. M., LEITCH, I. J. AND BENNETT, M. D. (2005): First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. - Annals of Botany 96: 229-244.
- ŽIVKOVIĆ, T., QUARTACCI, F. M., STEVANOVIĆ, B., MARINONE, F., NAVARI-IZZO, F. (2005): Low-molecular weight substances in the poikilohydric plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. - Plant Science, 168(1): 105-111.



**BIOGRAFIJA AUTORA**  
**diplomirani biolog Maja Lazarević**

Dipl. biolog **Maja Lazarević (rođena Tomašević)** rođena je 18. marta 1976. godine u Beogradu gde je sa odličnim uspehom završila osnovnu školu i III beogradsku gimnaziju. Školske 1995./96. godine upisala je studije biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je na Katedri za ekologiju i geografiju biljaka 2002. god. sa temom „*Uticaj aerozagađenja u gradskim uslovima na ekofiziološke i morfo-anatomske karakteristike vrsta Carpinus betulus L. i Ligustrum ovalifolium Hassk.*“ sa ocenom 10. Studije na Fakultetu završila je sa prosečnom ocenom 9,53.

Po završetku studija, 2002. godine upisala je poslediplomske studije na smeru Ekologija biljaka, a 2003. g. dobila je Stipendiju Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije.

Od 2005. do 2007. angažovana je kao asistent-pripravnik na Katedri za ekologiju i geografiju biljaka, zatim kao istraživač-pripravnik, a od 2010. god. do danas kao istraživač-saradnik. Učestvovala je u realizaciji praktičnih vežbi na predmetima: Biogeografija, Ekologija biljaka, Ekologija i geografija biljaka, Osnovi ekologije i Principi ekologije. Osim toga, 2008. godine bila je angažovana i kao saradnik u nastavi na Katedri za hranljivo i otrovno bilje, na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu.

Školske 2006./07. godine upisala je doktorske studije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, studijski program Ekologija, biogeografija i zaštita biodiverziteta, modul Ekologija i geografija biljaka.

Tokom svog dosadašnjeg rada Maja Lazarević je učestvovala u 3 nacionalna i 4 međunarodna projekta. Boravila je na stručnim usavršavanjima u inostranstvu iz oblasti palinologije, citogenetike i molekularne biologije (Univerzitet Paris-Sud XI, Orsay i Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette, Francuska). Dva puta bila je dobitnik stipendije Ambassade Francuske.

Rezultate svog dosadašnjeg istraživačkog rada objavila je u okviru 5 naučnih radova u međunarodnim i nacionalnim časopisima, kao i 19 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Aktivno se služi engleskim i francuskim jezikom.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Маја Р. Лазаревић

број индекса \_\_\_\_\_ DA 060121

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Цитогенетичка, палинолошка и филогеографска истраживања рода *Ramonda*

(Gesneriaceae) на Балканском полуострву

- 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, \_\_01. 10. 2012.\_\_

Маја Лазаревић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Маја Р. Лазаревић

Број индекса DA 060121

Студијски програм Екологија, биогеографија и заштита биодиверзитета

Наслов рада Цитогенетичка, палинолошка и филогеографска  
истраживања рода *Ramonda* (Gesneriaceae) на Балканском полуострву

Ментор проф. др Владимир Стевановић, коментор др Соња Шилјак - Јаковљев

Потписани/а Маја Р. Лазаревић

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, 01.10.2012.

Маја Лазаревић

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

Цитогенетичка, палинолошка и филогеографска ситраживања рода

Ramonda (Gesneriaceae) на Балканском полуострву

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_01. 10. 2012. \_\_\_

Moja Lazarević