**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**
**ШУМАРСКИ ФАКУЛТЕТ**

# ДЕФИНИСАЊЕ ТАКСОНОМСКОГ СТАТУСА БУКВЕ У СРБИЈИ- фаза II

Коначан извештај

Београд, мај 2018. год.

Пројекат „*Дефинисање таксономског статуса букве у Србији - фаза II*“ реализован је на основу Уговора број 401-00-781/2017-10 од 22.05.2017. године о коришћењу средстава Буџетског фонда за шуме Републике Србије за реализацију развојно-истраживачких и осталих пројеката у складу са стратегијом развоја шумарства РС.

Пројекат је реализовао мултидисциплинарни истраживачки тим са Универзитета у Београду, у следећем саставу:

1. др Мирјана Шијачић-Николић, ред. проф. Универзитета у Београду - Шумарског факултета, руководилац пројекта
2. др Јелена Алексић, виши научни сарадник Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
3. др Марина Нонић, доцент Универзитета у Београду - Шумарског факултета
4. др Јована Деветаковић, доцент Универзитета у Београду - Шумарског факултета
5. дипл. инж. Вела Јанков, лаборант Универзитета у Београду - Шумарског факултета

У реализацији пројекта, у оквиру лабораторијских истраживања, учествовала је и мастер инжењер Ивона Керкез, студент докторских студија на Катедри Семенарства, расадничарства и пошумљавања.

Коначан извештај о реализацији пројекта усвојило је Наставно-научно веће Шумарског факултета одлуком број 01-1927/1 од 17.05.2018. године.

| | |
|---|---|
| Руководилац пројекта | Декан |
| Проф. др Мирјана Шијачић-Николић | Проф. др Ратко Ристић |
| _____ | _____ |

## ДЕФИНИСАЊЕ ТАКСОНОМСКОГ СТАТУСА БУКВЕ У СРБИЈИ - фаза II

### Проширени резиме

Таксономски положај букве у Србији је предмет размимоилажења мишљења различитих аутора већ дужи низ година. Постоје бројна неслагања о броју, идентитету и дистрибуцији врста унутар рода *Fagus* L. Док домаћи аутори: Мишић (1957), Јовановић М. (1971), Јовановић Б. (1985), Јовановић Б. и Цвјетићанин (2005), али и Hazler *et al*. (1997), мезијску букву у Србији описују као засебну врсту (*Fagus moesiaca* /Domin, Maly/ Czeczott.), већина страних аутора јој тај ранг оспорава и спушта је на ранг подврсте, Gömöry *et al*. (1999, 2007), али и Јанковић (1970), или је чак наводе као синоним *Fagus sylvatica* L. (Denk *et al*., 2002). Такође, бројна генетичка истраживања букве у Европи оспоравају мезијској букви ранг врсте (Gömöry *et al*., 1998, 1999, 2007; Comps *et al*., 2001; Denk *et al*., 2002; Gailing and von Wüelisch, 2004). У публикацији *European Atlas of Forest Tree Species* (San-Miguel-Ayanz *et al*., 2016) наводе се *Fagus sylvatica* L. и *Fagus orientalis* Lipsky као врсте присутне у Европи, док се *Fagus moesiaca* (Domin, Maly) Czeczott. ни не спомиње.

Присутан проблем препознало је и Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде - Управа за шуме и финансијски подржало истраживања на пројекту под називом „*Дефинисање таксономског статуса букве у Србији*“, у чијој реализацији је учествовао мултидисциплинарни истраживачки тим Универзитета у Београду.

Активности на дефинисању таксономског статуса букве у Србији започете су 2016. године (I фаза), истраживањима која су имала за циљ процену генетичке варијабилности на нивоу природних популација, применом морфолошких, анатомских и молекуларних маркера. Истраживањима је обухваћено укупно 13 природних популација букве, које су распоређене равномерно унутар ареала врсте у Србији: Борања, Голија, Гоч, Жагубица, Јавор, Копаоник, Кукавица, Мироч, Рудник, Сењски Рудник, Стара планина, Тара и Фрушка гора. На локалитетима је одабрано по 20 тест стабала, са којих су сакупљени листови, купуле, успавани пупољци и/или семе. Применом морфолошких маркера обављена је процена међупопулационе варијабилности на нивоу листова, купула и семена. Применом анатомских маркера обављена је процена међупопулационе варијабилности на основу анатомске структуре петељке листова. Молекуларно-генетичка истраживања су обављена применом нуклеарних микросателитских маркера (*SSRs*), специфичних за букву.

Истраживања у оквиру друге фазе пројекта била су усмерена на процену варијабилности између различитих провенијенција букве из провенијеничног теста, који је основан у наставној бази „Мајданпечка домена“ Шумарског факултета, Универзитета у Београду. Анализама је обухваћено 20 провенијенција букве: 5 српских, 5 босанских, 2 хрватске, 3 немачке, 2 румунске и по једна мађарска, аустријска и швајцарска. Применом морфолошких маркера процењена је варијабилност листова у две сукцесивне године (2016. и 2017.), која је послужила као основа за кластеризацију провенијенција.

За молекуларно-генетичке анализе, на нивоу различитих провенијенција, коришћени су нуклеарни микросателити, који су коришћени и у првој фази истраживања за анализе индивдуа из природних популација са подручја Србије. Поред тога, у циљу повећања резолуције за извођење закључака о таксономском статусу букве у Србији, коришћени су и додатни молекуларни маркери - додатни нуклеарни микросателити, као и хлоропластни микросателити. Ови молекуларни маркери су тестирани како код индивидуа са подручја Србије, тако и код индивидуа из европских провенијенција.

Истраживањима (у обе фазе) је обухваћено 328 индивидуа букве, од којих 192 индивидуе из 13 природних популација са подручја Србије и 136 индивидуа из 14 различитих европских провенијенција.

У циљу дефинисања таксономског статуса букве у Србији, резултати молекуларно-генетичких анализа добијених на нивоу природних популација (фаза I), обједињени су и компарирани са резултатима молекуларно-генетичких анализа спроведених на нивоу различитих провенијенција букве (фаза II). Анализом варијабилности нуклеарних и хлоропластних микросателита у испитиваним популацијама и провенијенцијама утврђени су параметри генетичког диверзитета и генетичке диференцијације.

На основу свеобухватних истраживања генетичке варијабилности букве на нивоу природних популација у Србији и различитих провенијенција, из провенијеничног тетста који је основан у наставној бази „Мајданпечка домена“ Шумарског факултета, Универзитета у Београду, применом морфолошких, анатомских и молекуларних маркера закључено је следеће: ***генетички профили популација букве из Србије значајније не одступају од генетичких профила популација из Европе, што говори да се, на основу анализираног узорка, буква у Србији не може издвојити као посебна врста.***

Јасно дефинисање таксономског статуса букве у Србији биће могуће тек након анализе генетичког профила популација букве из источног и јужног дела Балканског полуострва, где према новијим литературним подацима може постојати мезијска буква (Magri *et al*., 2006; Gömöry и Paule, 2010).

Поред тога, имајући у виду потенцијално хибридно порекло мезијске букве (Gömöry и Paule, 2010), за издвајање појединих популација и/или индивидуа букве као засебног таксона (мезијска буква), потребно је у анализе укључити не само једног потенцијалног родитеља (европску букву), већ и другог потенцијалног родитеља (источну букву).

**DEFINING THE TAXONOMIC STATUS OF BEECH IN SERBIA - Phase II**

## SUMMARY

Taxonomic status of beech in Serbia has been the subject of dispute among various authors for many years. There are many different opinions related to number, identity and distribution of species within the genus *Fagus* L. While some domestic authors, such as Mišić (1957), Jovanović, M. (1971), Jovanović, B.(1985), Jovanović, B. & Cvjetićanin, R. (2005), but also Hazler *et al*. (1997), describe *Fagus moesiaca* (Domin, Maly) Czeczott. in Serbia as separate species, most foreign authors deny that rank and classify it as subspecies, such as Gömöry *et al*. (1999; 2007), Janković, M. (1970), or use it as the synonym of *Fagus sylvatica* L. (Denk *et al*., 2002). Numerous genetic studies of beech in Europe challenge the rank of Moesian beech as a species (Gömöry *et al*., 1998, 1999, 2007; Comps *et al*., 2001; Denk *et al*., 2002; Gailing and von Wüelisch, 2004). The publication *European Atlas of Forest Tree Species* (San-Miguel-Ayanz*etal*., 2016), lists *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky as species present in Europe, while *Fagus moesiaca* (Domin, Maly) Czeczott. was not even mentioned.

The problem has also been recognized by the Ministry of agriculture, forestry and water management – Forest Directorate and this institution financially supported research on the project entitled „*Defining the taxonomic status of beech in Serbia*“, which was implemented by the multidisciplinary researching team from University of Belgrade.

Activities on defining the taxonomic status of beech in Serbia started in 2016, with research whose aim was to evaluate genetic variability at the level of natural populations using morphological, anatomical and molecular markers. The research involved a total of 13 natural beech populations, distributed evenly within the range of this species in Serbia: Mt. Boranja, Mt. Golija, Mt. Goč, Žagubica, Mt. Javor, Mt. Kopaonik, Mt. Kukavica, Mt. Miroč, Mt. Rudnik, Senjski Rudnik, Mt. Stara planina, Mt. Tara and Mt. Fruška gora. A total of 20 test trees were selected in the sites and their leaves, cupules, dormant buds and/or seed were collected. Morphological markers were used to assess variability among populations at the level of leaves, cupules and seed. Anatomical markers were used to assess inter-population variability, based on the anatomical structure of the petioles. Molecular-genetic research was performed using nuclear microsatellite markers (*SSRs*) specific for beech.

The research within the second phase of the project were aimed at assessing the variability among the different beech provenances from the provenance trail that was established in the teaching base „Majdanpečka domena“ of the Faculty of Forestry, University of Belgrade. The analysis included 20 beech provenances: 5 Serbian, 5 Bosnian, 2 Croatian, 3 German, 2 Romanian, and one Hungarian, Austrian and Swiss provenance. The assessment of leaf variability was done using morphological markers in two successive years (2016 and 2017), which served as the basis for the clustering of provenances.

Nuclear microsatellites which were used within the first phase of the study, for analysis of individuals from natural populations from Serbia, were also used for molecular-genetic analyzes at the level of different provenances. Additionally, in order to increase the resolution for conclusions on the taxonomic status of beech in Serbia, additional molecular markers were used - additional nuclear microsatellites, as well as chloroplast microsatellites. These molecular markers have been tested both for individuals from Serbia and for individuals from European provenances.

The research (in both phases) included 328 beech individuals, of which 192 individuals from 13 natural populations from Serbia and 136 individuals from 14 different European provenances.

In order to define the taxonomic status of beech in Serbia, the results of molecular-genetic analyzes obtained at the level of natural populations (Phase I) have been summarized and compared with the results of molecular-genetic analyzes carried out at the level of different beech provenances (Phase II). The parameters of genetic diversity and genetic differentiation were determined by the analysis of the variability of nuclear and chloroplast microsatellites in the studied populations and provenances.

Based on the comprehensive research of the genetic variability of beech, at the level of natural populations in Serbia and different provenances from the provenance trial established in the teaching base „Majdanpečka domena“ of the Faculty of Forestry, University of Belgrade, using morphological, anatomical and molecular markers, it was concluded as follows: ***the genetic profiles of beech populations from Serbia do not significantly deviate from the genetic profiles of populations from Europe, which indicates that, based on the analyzed sample, beech in Serbia cannot be distinguished as a separate species*****.**

Clearly defining the taxonomic status of beech in Serbia will only be possible after analyzing the genetic profile of beech populations from the eastern and southern parts of the Balkan Peninsula where, according to recent literature data, a Moesian beech may exists (Magri *et al*., 2006; Gömöry and Paule, 2010).

Additionally, given the potentially hybrid origin of the Moesian beech (Gömöry and Paule 2010), in order to distinguish beech populations and/or individuals as a separate taxon (Moesian beech), it is necessary to include not only one potential parent (European beech), but also another potential parent (Eastern beech) in analyses.

# САДРЖАЈ


Списак слика у тексту по поглављима ..... 8
Списак табела у тексту по поглављима ..... 8
Списак графикона у тексту по поглављима ..... 9
Списак карти у тексту по поглављима ..... 9

1. УВОД ..... 10
2. ПРОВЕНИЈЕНИЧНИ ТЕСТ БУКВЕ У НБ „МАЈДАНПЕЧКА ДОМЕНА“ ..... 13
   2.1. Климатске карактеристике локалитета на коме је основан провенијенични тест у годинама у којима су вршена истраживања морфолошких карактеристика листова ... 17
3. АНАЛИЗА ВАРИЈАБИЛНОСТИ МОРФОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА ЛИСТОВА РАЗЛИЧИТИХ ПРОВЕНИЈЕНЦИЈА БУКВЕ ..... 21
   3.1. Материјал и метод рада ..... 21
   3.2. Варијабилност морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција букве сакупљених 2016. године ..... 23
   3.3. Варијабилност морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција букве сакупљених 2017. године ..... 26
   3.4. Варијабилност површина листова различитих провенијенција букве сакупљених у 2016. и 2017. години ..... 30
   3.5. Компаративна анализа морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција, сакупљених 2016.и 2017. године ..... 32
   3.6. Генетичка диференцијација провенијенција букве ..... 35
4. МОЛЕКУЛАРНО-ГЕНЕТИЧКЕ АНАЛИЗЕ РАЗЛИЧИТИХ ПРОВЕНИЈЕНЦИЈА БУКВЕ ..... 38
   4.1. Материјал и метод рада ..... 38
      4.1.1. Одабир европских провенијенција букве за другу фазу молекуларно-генетичких анализа ..... 39
      4.1.2. Сакупљање и припрема биљног материјала ..... 40
      4.1.3. Хомогенизација биљног материјала ..... 40
      4.1.4. Екстракција тоталне геномске ДНК ..... 41
      4.1.5. Провера приноса и квалитета ДНК изолата ..... 42
      4.1.6. Одабир додатних нуклеарних и хлоропластних микросателита ..... 45
      4.1.7. Паралелно умножавање једарних и хлоропластних микросателита ланчаном реакцијом полимеразе (*PCR - Polymerase Chain Reaction*) ..... 46
      4.1.8. Провера успешности PCR амплификације на агарозном гелу ..... 49
      4.1.9. Утврђивање дужине продуката PCR амплификације (*scoring*) ..... 50
   4.2. Резултати - утврђивање нивоа генетичког диверзитета и генетичке диференцијације провенијенција букве ..... 54
      4.2.1. Карактеристике микросателитских локуса коришћених и истраживању ..... 54
      4.2.2. Процена одступања дистрибуције фреквенци генотипова од очекивања према Харди-Вајнберговој равнотежи и неравнотежа везаности између парова једарних микросателитских локуса ..... 55
      4.2.3 Параметри генетичког диверзитета ..... 60
      4.2.4. Генетичка диференцијација провенијенција ..... 61
   4.3. Закључак на основу молекуларно-генетичких анализа ..... 77
5. ЗАКЉУЧЦИ ..... 79
6. ЛИТЕРАТУРА ..... 81

## СПИСАК СЛИКА У ТЕКСТУ ПО ПОГЛАВЉИМА

**Слика 2.1.** Провенијенични тест букве на локалитету „Припор-фељешана“ у Наставној бази Шумарског факултета „Мајданпечка домена“ (фото Шијачић-Николић, 2017)
**Слика 2.2.** Просторна расподела средње годишње температуре (°C)
**Слика 2.3.** Просторна расподела средње годишње температуре одређена методом перцентила
**Слика 2.4.** Просторна расподела годишње количине падавина у милиметрима
**Слика 2.5.** Просторна расподела годишње количине падавина одређена методом перцентила
**Слика 2.6.** Осунчавање у часовима

**Слика 3.1.** Анализиране морфометријске карактеристике листова

**Слика 4.1.** Припрема биљног материјала за хомогенизацију
**Слика 4.2.** ДНК изолати на агарозном гелу под ултраљубичастим осветљењем
**Слика 4.3.** Преношење ДНК изолата у стрипове
**Слика 4.4.** Визуелизација продуката паралелног PCR умножавања додатних једарних и хлоропластних микросателита (L представља лествицу)
**Слика 4.5.** Визуелизација продуката паралелног PCR умножавања локуса из микса 3 на агарозном гелу (L представља лествицу)
**Слика 4.6.** Електроферограми на којима се виде дужине продуката PCR амплификације микросателитских локуса из микса 1 (први електроферограм), микса 2 (други електроферограм) и миксева 3 и 4 који су спојени (трећи електроферограм)
**Слика 4.7.** Дужине продуката PCR амплификације 5 микросателитских локуса из микса 1 код одабраних индивидуа букве из европских провенијенција (локуси: csolfagus_31, Fagsyl_003994, Fagsyl_000905, csolfagus_19 и Fagsyl_003273, респективно)
**Слика 4.8.** Дужине продуката PCR амплификације 5 микросателитских локуса из микса 2 код одабраних индивидуа букве (локуси: FS 1-03, FS 1-15, sfc1063, DE576_A_0 и mfc5, респективно)
**Слика 4.9.** Дужине продуката PCR амплификације 3 једарна микросателитских локуса из микса 3 код одабраних индивидуа букве (локуси: sfc1143, sfc0018 и csolfagus_06, респективно) и 4 хлоропластна микросателитска локуса из микса 4 код одабраних индивидуа букве (локуси: ccmp6, ccmp10, ccmp7 и cmcs12, респективно)
**Слика 4.10.** MDS график на којем су визуелизоване Fst вредности између парова свих испитиваних популација путем представљања у дводимензионалном простору (*stress* вредност 0.2359)
**Слика 4.11.** MDS график на којем су визуелизоване Fst вредности између парова популација са подручја Србије путем представљања у дводимензионалном простору (*stress* вредност 0.2272)
**Слика 4.12.** Резултати PCoA анализе свих испитиваних популација/провенијенција
**Слика 4.13.** Резултати PCoA анализе популација са подручја Србије
**Слика 4.14.** Утврђивање оптималног броја генетичких група у STRUCTURE анализе са свим испитиваним популацијама на основу дистрибуције постериорних вероватноћа за сваки K (горња слика) и применом $\Delta K$ методе (доња слика).
**Слика 4.15.** Резултати STRUCTURE анализе са свим испитиваним популацијама означеним бројевима од 1 до 27 по редоследу датом у табели 1 за K = 2, 3, 4 и 5, респективно
**Слика 4.16.** Дистрибуција 3 генска пула по природним популацијама и провенијеницијама представљеним на локалитетима са којих потичу
**Слика 4.17.** Утврђивање оптималног броја генетичких група за STRUCTURE анализу са природним популацијама са подручја Србије на основу дистрибуције постериорних вероватноћа за сваки K (горња слика) и применом $\Delta K$ методе (доња слика)
**Слика 4.18.** Резултати STRUCTURE анализе са природним популацијама са подручја Србије означеним бројевима од 1 до 13 по редоследу датом у табели 1 за K = 2, 3, 4 и 5, респективно
**Слика 4.19.** Дистрибуција 2 генска пула по популацијама са подручја Србије

## СПИСАК ТАБЕЛА У ТЕКСТУ ПО ПОГЛАВЉИМА

**Табела 2.1.** Основни подаци о провенијенцијама букве које су уграђене у провенијенични тест у наставној бази „Мајданпечка домена“ Шумарског факултета

**Табела 3.1.** Преглед провенијенција укључених у анализе морфолошких карактеристика листова (2016. и 2017.)
**Табела 3.2.** Дескриптивна статистика за морфолошка својства листова провенијенција букве (2016.)

**Табела 3.3.** Резултати анализе варијансе за морфолошка својства листова провенијенција букве (2016.)
**Табела 3.4.** LSD – тест за морфолошка својства листова различитих провенијенција (2016.)
**Табела 3.5.** Дескриптивна статистика за морфолошка својства листова провенијенција букве (2017.)
**Табела 3.6.** Резултати анализе варијансе за морфолошка својства листова провенијенција букве (2017.)
**Табела 3.7.** LSD – тест за морфолошка својства листова различитих провенијенција (2017.)
**Табела 3.8.** Дескриптивна статистика за површине листова различитих провенијенција букве (2016. и 2017.)
**Табела 3.9.** Резултати анализе варијансе за површине листова провенијенција букве (2016. и 2017.)
**Табела 3.10.** LSD – тест за површине листова провенијенција букве (2016. и 2017.)
**Табела 3.11.** Средње вредности дужине листова (mm), различитих провенијенција букве (2016. и 2017.)
**Табела 3.12.** Средње вредности ширине листова (mm), различитих провенијенција букве (2016. и 2017.)
**Табела 3.13.** Просечан број нерава на листовима различитих провенијенција букве (2016. и 2017.)

**Табела 4.1.** Преглед локалитета, броја узоркованих индивидуа по локалитету и типа сакупљеног материјала за изолацију ДНК (пупољци или листови)
**Табела 4.2.** Шема ДНК изолата у стриповима
**Табела 4.3.** Карактеристике раније коришћених једарних микросателита
**Табела 4.4.** Карактеристике додатних једарних и хлоропластних микросателита
**Табела 4.5.** Параметри генетичког диверзитета и индекси фиксације код популација букве са подручја Србије
**Табела 4.6.** Параметри генетичког диверзитета и индекси фиксације код провенијенција букве из провенијеничног огледа
**Табела 4.7**. Fst вредности између парова свих испитиваних популација су представљене испод дијагонале, а изнад дијагонале су представљене P вредности за ниво статистичке значајности од 95% (статистички значајне вредности су подебљане)
**Табела 4.8.** Fst вредности између парова природних популацијаса подручја Србије су представљене испод дијагонале, а изнад дијагонале
**Табела 4.9.** Резултати AMOVA анализе са свим испитиваним популацијама/провенијенцијама
**Табела 4.10.** Резултати AMOVA анализе са популацијама са подручја Србије
**Табела 4.11.** Резултати хијерархијске AMOVA анализе са свим испитиваним популацијама/провенијенцијама
**Табела 4.12.** Резултати хијерархијске AMOVA анализе са популацијама са подручја Србије

## СПИСАК ГРАФИКОНА У ТЕКСТУ ПО ПОГЛАВЉИМА

**Графикон 3.1.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу морфолошких параметара листова (2016.)
**Графикон 3.2.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу морфолошких параметара листова (2017)
**Графикон 3.3.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу морфолошких параметара листова (2016. и 2017.)
**Графикон 3.4.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу површина листова (2016. и 2017.)

## СПИСАК КАРТИ У ТЕКСТУ ПО ПОГЛАВЉИМА

**Карта 2.1.** Локалитети провенијенција које су уграђене у провенијенични тест букве који је основан на локалитету Дебели Луг

## 1. УВОД

Таксономски положај букве у Србији је предмет размимоилажења мишљења различитих аутора већ дужи низ година. Постоје бројна неслагања о броју, идентитету и дистрибуцији врста унутар рода *Fagus* L.. Док домаћи аутори: Јовановић и Цвјетићанин, 2005; Мишић, 1957; Јовановић М., 1971; Јовановић Б., 1985, али и Hazler *et al*. (1997), мезијску букву у Србији описују као засебну врсту (*Fagus moesiaca* /Domin, Maly/ Czeczott.), већина страних аутора јој тај ранг оспорава и спушта је на ранг подврсте, Gömöry *et al*., 1999, 2007, али и Јанковић, 1970 или је чак наводи као синоним *Fagus sylvatica* L. (Denk *et al*., 2002). Такође, бројна генетичка истраживања букве у Европи оспоравају мезијској букви ранг врсте (Denk *et al*., 2002; Gailing and von Wüelisch, 2004; Comps *et al*., 2001; Gömöry *et al*., 1998, 1999, 2007). У *European Atlas of Forest Tree Species* (San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), 2016, Publication Office of the European Union, Luxembourg) наводе се *Fagus sylvatica* L. и *Fagus orientalis* Lipsky као врсте присутне у Европи, док се *Fagus moesiaca* (Domin, Maly) Czeczott. ни не помиње (http://forest.jrc.ec.europa.eu/european-atlas-of-forest-tree-species/atlas-download-page/). Наводи се да је и статус *Fagus orientalis* Lipsky као посебне врсте дискутабилан, имајући у виду да је по својим особинама веома слична европској букви, па је неки аутори наводе и као подврсту.

Овакво стање указује на велике недоумице у вези са таксономским статусом букве у Србији, што је последњих година све израженије у хармонизацији са међународном номенклатуром, нарочито европском, у којој се *Fagus moesiaca* (Domin, Maly) Czeczott. не прихвата као посебна врста. Стога су присутни проблеми везани за сакупљање и промет репродуктивног материјала букве из Србије, као и код публиковања резултата научних истраживања, која се раде са буквом на подручју Србије, а желе се презентовати у европским оквирима.

Присутан проблем препознало је и Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде - Управа за шуме и финансијски подржало истраживања која су реализована у две фазе:

**1. Пројекат „Дефинисање таксономског статуса букве у Србији“ (2016-2017)** у чијој реализацији је учествовао мултидисциплинарни истраживачки тим са Универзитета у Београду, који су чинили:

1. др Мирјана Шијачић-Николић, ред. проф. Универзитета у Београду - Шумарског факултета, руководилац пројекта
2. др Драгица Вилотић, ред. проф. Универзитета у Београду - Шумарског факултета
3. др Милан Кнежевић, ред. проф. Универзитета у Београду - Шумарског факултета
4. др Раде Цвјетићанин, ред. проф. Универзитета у Београду - Шумарског факултета
5. др Владан Иветић, ванр. проф. Универзитета у Београду - Шумарског факултета
6. др Драгица Станковић, научни саветник Универзитета у Београду - Шумарског факултета
7. др Јелена Алексић, виши научни сарадник Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (поглавље 8)
8. др Марина Нонић, доцент Универзитета у Београду - Шумарског факултета
9. др Душан Јокановић, доцент Универзитета у Београду - Шумарског факултета

10. др Јована Деветаковић, доцент Универзитета у Београду - Шумарског факултета
11. др Марко Перовић, доцент Универзитета у Београду - Шумарског факултета

У реализацији пројекта су, у оквиру лабораторијских истраживања, учествовале дипл. инж. Вела Јанков и студент докторских студија на катедри Семенарства, расадничарства и пошумљавања мастер инжењер Ивона Керкез.

Истраживања су започета 2016. године и имала су за циљ процену генетичке варијабилности на нивоу природних популација букве, применом морфолошких, анатомских и молекуларних маркера. Истраживањима је обухваћено укупно 13 природних популација, које су распоређене равномерно унутар ареала врсте у Србији: Фрушка гора, Борања, Тара, Рудник, Сењски Рудник, Гоч, Голија, Јавор, Копаоник, Мироч, Жагубица, Стара планина и Кукавица. На сваком локалитету одабрано је по 20 тест стабала, са којих су сакупљени листови, купуле, успавани пупољци и/или семе. За свако стабло одређена је географска ширина и дужина, надморска висина на коме се стабло налази, пречник и висина стабла. Стабла су фотографисана, трајно обележена и лоцирана на карти.

Применом морфолошких маркера обављена је процена међупопулационе варијабилности на нивоу листова, купула и семена. Применом анатомских маркера обављена је процена међупопулационе варијабилности на основу анатомске структуре петељке листова. Молекуларно-генетичка истраживања су обављена применом нуклеарних микросателита (*Simple Sequence Repeat – SSRs*) специфични за букву. Резултати спроведених истраживања на пројекту „Дефинисање таксономског статуса букве у Србији“ приказани су по областима истраживања у извештају, који је поднет Министарству пољопривреде, шумарства и водопривреде - Управи за шуме (https://upravazasume.gov.rs/domaci-projekti/).

**2. Пројекат „Дефинисање таксономског статуса букве у Србији - фаза II“ (2017-2018)**, у чијој реализацији је учествовао тим са Универзитета у Београду, који су чинили:

1. др Мирјана Шијачић-Николић, ред. проф. Универзитета у Београду - Шумарског факултета, руководилац пројекта
2. др Јелена Алексић, виши научни сарадник Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
3. др Марина Нонић, доцент Универзитета у Београду - Шумарског факултета
4. др Јована Деветаковић, доцент Универзитета у Београду - Шумарског факултета
5. дипл. инж. Вела Јанков, лаборант Универзитета у Београду - Шумарског факултета

У реализацији пројекта, у оквиру лабораторијских истраживања, учествовала је и студент докторских студија на катедри Семенарства, расадничарства и пошумљавања мастер инжењер Ивона Керкез.

Део започетих истраживања процене генетске варијабилности букве применом морфолошких, анатомских и молекуларних маркера, на нивоу природних популација из Србије, настављен је на нивоу провенијеничног теста букве, који је основан на територији Наставне базе „Мајданпечка домена“ Шумарског факултета Универзитета у Београду, на локалитету „Припор-фељешана“. За оснивање теста коришћене су саднице 22 европске провенијенције које воде порекло из Србије (6), Хрватске (2), Босне и Херцеговине (6), Мађарске (1), Немачке (3), Аустрије (1), Швајцарске (1) и Румуније (2). Тест је основан од двогодишњих и трогодишњих садница, при чему су саднице исте провенијенције сађене у блокове (50 садница по блоку) у два понављања.

Процена варијабилности морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција букве обављена је у две сукцесивне године (2016. и 2017.). Добијени резултати су компарирани са резултатима ранијих истраживања (Шијачић-Николић *et al*., 2012; Šijačić-Nikolić *et al*., 2013).

Молекуларно-генетичке анализе спроведене су током 2017. и 2018. године, на нивоу различитих европских провенијенција букве, међу којима су и провенијенције из балканског дела ареала. Резултати молекуларно-генетичких анализа добијених на нивоу природних популација (фаза I), обједињени су и компарирани са резултатима молекуларно-генетичких анализа спроведених на нивоу различитих провенијенција букве (фаза II), што је послужило као основа за процену генетичке диференцијације анализираних популација/провенијенција. Коришћени су једарни микросателити који су коришћени и у првој фази истраживања, за анализе индивдуа из природних популација са подручја Србије, уз употребу додатних молекуларних маркера (једарних и хлоропластних микросателита). Анализом варијабилности нуклеарних и хлоропластних микросателита у испитиваним популацијама/провенијенцијама утврђени су параметри генетичког диверзитета и генетичке диференцијације.

Прикупљени подаци о степену варијабилности на нивоу природних популација букве у Србији и различитих европских провенијенција букве, применом генетичких маркера, послужили су као основа за дефинисање њеног таксономског статуса у Србији.

До сада добијени резултати спроведених истраживања, у оквиру оба пројекта, пријављени су за публиковање у међународним часописима, а део истих ће бити саопштен на научним скуповима.

## 2. ПРОВЕНИЈЕНИЧНИ ТЕСТ БУКВЕ У НБ „МАЈДАНПЕЧКА ДОМЕНА“

Провенијенични тестови служе за процену степена варијабилности и адаптивног потенцијала различитих врста дрвећа, за утврђивање степена дивергентности изолованих популација као и за одређивање разлика у генетичкој варијабилности између и унутар различитих провенијенција. Такође, представљају вид конзервације генфонда одређене врсте *ex situ* (Шијачић-Николић и Миловановић, 2010).

Према Gömöry (2010), главни циљ истраживања у провенијеничним тестовима је идентификација провенијенција које се карактеришу добрим прирастом и адаптибилношћу, како би се искористиле као извор семена за будућа пошумљавања.

Eriksson и Ekberg (2001) наводе два циља у истраживањима везаним за провенијеничне тестове: (1) *примарни,* чија је главна сврха примењивост у пракси, и састоји се у идентификовању провенијенција које дају најбоље производне резултате на датом станишту и (2) *научни*, који треба да уђе у траг адаптацији која се одвија, као и станишним факторима који на ту адаптацију утичу. Из тих разлога, провенијеничне тестове треба оснивати на више различитих локалитета, што омогућава тестирање интеракције "провенијенција х локалитет". Тестирањем провенијенција у различитим станишним условима могу се идентификовати провенијенције које се карактеришу специфичном адаптибилношћу, као и оне које се карактеришу општом адаптибилношћу (Kang, 2002).

Први провенијенични тест је основан 1820. године. До данас је основано више од 50 ових тестова, од различитих врста шумског дрвећа из умерене климатске зоне. У Србији је број основаних провенијеничних тестова релативно мали, као и број врста које су обухваћене тестирањем: орах, дивља трешња, дуглазија, лужњак, смрча, црни и бели бор, јавор и буква.

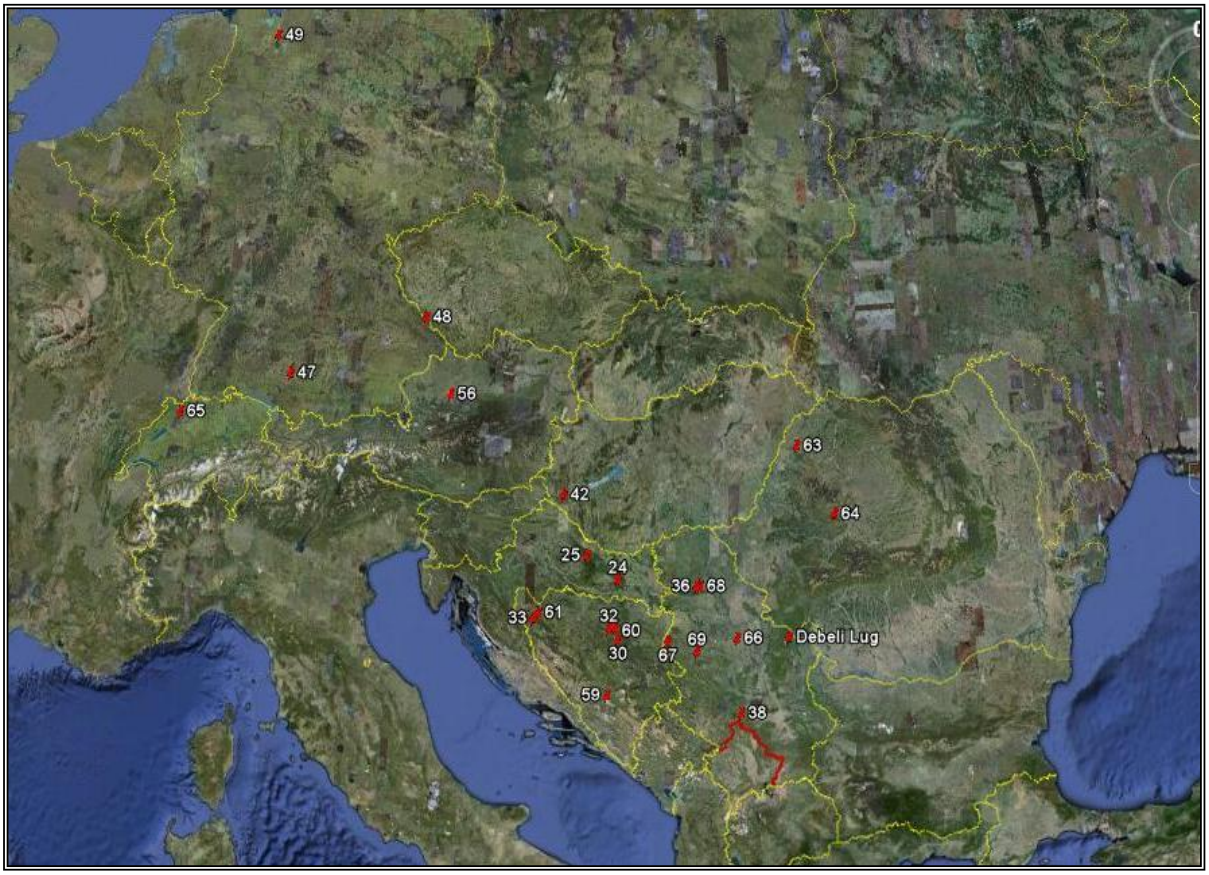
Први провенијенични тестови букве у Србији основани су 2007. године у оквиру мреже европских провенијеничних тестова. Мрежа је оснивана у шест циклуса: 1986.; 1987.; 1988.; 1995.; 1998. и 2007. године (von Wuehlisch, 2004). Главни разлог за оснивање ових тестова била је нарастајућа потреба за семеном букве у централној Европи током седамдесетих година прошлог века. Како се у то време семе, углавном, увозило из југоисточне Европе, јавила се потреба за тестирањем садног материјала, произведеног из овог семена, у циљу упознавања његових особина. Убрзо се схватило да није довољно само тестирање у оквиру засебних провенијеничних тестова, него да је неопходно установити мрежу тестова у којима би се исте провенијенције тестирале у различитим условима средине.

Последња серија европских провенијеничних тестова основана је током 2007. године, када је основано укупно 7 провенијеничних тестова: по 2 у Србији и Немачкој и по један у Хрватској, БиХ и Италији. У овим провенијеничним тестовима заступљено је 20 провенијенција из балканског региона: Србија, Хрватска, БиХ и 12 провенијенција из региона западне и централне Европе: Швајцарска, Немачка, Аустрија, Италија, Мађарска и Румунија. Тестови су конципирани тако да је 15 провенијенција заступљено у провенијеничним тестовима на свим локалитетима (von Wuehlisch *et al*., 2010).

Чињеница да се на једном локалитету, у оквиру провенијеничног теста, налази већи број различитих европских провенијенција, међу којима су провенијенције из балканског дела ареала, искоришћена је за сакупљање полазног материјала за тестирање генетичке варијабилности букве, у циљу дефинисања њеног таксономског статуса у Србији.

Уз минималне трошкове, сакупљен је биљни материјал (листови и пупољци) различитих провенијенција у оквиру провенијеничног теста који је основан у Наставној бази „Мајданпечка домена“ Шумарског факултета, Универзитета у Београду, на локалитету „Припор-фељешана“ (N 44°19'34.01", E 21°52'20.39"), чија је надморска висина 742 m. Тест је основан на локалитету на коме просечна годишња темепература ваздуха износи 8,8 °C; просечна температура ваздуха током вегенатионог периода 15,1 °C; сума годишњих падавина 829 mm и сума падавина током вегетационог периода 455 mm.

За оснивање теста коришћене су саднице 22 европске провенијенције, које воде порекло из Србије (6), Хрватске (2), Босне и Херцеговине (6), Мађарске (1), Немачке (3), Аустрије (1), Швајцарске (1) и Румуније (2), карта 2.1.




**Карта 2.1.** Локалитети провенијенција које су уграђене у провенијенични тест букве који је основан на локалитету Дебели Луг

Тест је основан од двогодишњих (провенијенције 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68 и 69) и трогодишњих садница (провенијенције 24, 25, 30, 32, 33, 36, 38, 42, 47, 48, 49 и 56). Саднице исте провенијенције су сађене у блокове (50 садница по блоку), у два понављања, са размаком садње 2.0 × 1.0 m, слика 2.1.

**Слика 2.1.** Провенијенични тест букве на локалитету „Припор-фељешана“ у Наставној бази Шумарског факултета „Мајданпечка домена“ (фото Шијачић-Николић, 2017)

Основне карактеристике провенијенција које су уграђене у овај провенијенични тест приказане су у табели 2.1.

Од момента оснивања до данас, у оквиру провенијеничних тестова основаних у Србији, спроведена су различита истраживања, у циљу процене варијабилности различитих провенијенција букве, применом морфолошких, анатомских, физиолошких и молекуларних маркера (Шијачић-Николић *et al.*, 2009; 2012, 2013; Стојнић *et al.*, 2010 a,b,c,d; 2011; 2012; 2013, von Wuehlisch, *et al.*, 2010).

**Табела 2.1.** Основни подаци о провенијенцијама букве које су уграђене у провенијенични тест у наставној бази „Мајданпечка домена“ Шумарског факултета

| Бр. | Провенијенција | Земља порекла | Феографска дужина | | Географска ширина | | Надморска висина (m) | Експозиција | Просечна годишња темп. | Сума годишњих падавина |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Степени | Минута | Степени | Минута | | | ($^oC$) | (mm) |
| 24 | Sjeverini Dilj Caglinski* | Хрватска | 18 | 1 | 45 | 17 | 350 | NE | 10,8 | 779 |
| 25 | Vrani kamen 12a, 15b* | Хрватска | 17 | 19 | 45 | 37 | 600 | NS | 8,5 | 972 |
| 30 | Tajan, Zepce* | БиХ | 18 | 3 | 44 | 23 | 700 | N | 10,3 | 804 |
| 32 | Crni Vuh, Tesang* | БиХ | 17 | 59 | 44 | 33 | 500 | N | 9,6 | 1069 |
| 33 | Grmec, Bosanska Krupa* | БиХ | 16 | 16 | 44 | 46 | 650 | NS | 10,3 | 1304 |
| 36 | Fruska gora* | Србија | 19 | 55 | 45 | 10 | 370 | N-NE | 11,2 | 782 |
| 38 | Kopaonik* | Србија | 20 | 50 | 43 | 10 | 820 | - | 3,6 | 985 |
| 42 | Valkonya 19A* | Мађарска | 16 | 45 | 46 | 30 | 300 | S | 9,5 | 800 |
| 47 | Schelklingen* | Немачка | 10 | - | 48 | - | 650 | - | 6 | 840 |
| 48 | Höllerbach 81024* | Немачка | 13 | 14 | 49 | 1 | 755 | - | 5 | 1200 |
| 49 | Hasbruch 81001* | Немачка | 8 | 26 | 53 | 8 | 35 | NS | 8,6 | 760 |
| 56 | Scharnstein, Mitterndorf* | Аустрија | 13 | 58 | 47 | 54 | 480 | W | 7,4 | 1263 |
| 59 | Vranica-Bistrica** | БиХ | 17 | 49 | 43 | 33 | 750 | N | 8,8 | 826 |
| 60 | Crini vrh** | БиХ | 17 | 59 | 44 | 33 | 500 | N | 9,6 | 1069 |
| 61 | Grmec, Bastra-Corkova** | БиХ | 16 | 14 | 44 | 45 | 720 | - | 10,3 | 1304 |
| 63 | Alesd, U.P.II / 51A** | Румунија | 22 | 15 | 47 | 11 | 490 | S-W | 8,5 | 800 |
| 64 | Alba-Iulia, U.P.V/154A** | Румунија | 23 | 5 | 46 | 10 | 860 | N | 8 | 850 |
| 65 | Sihlwald, 101** | Швајцарска | 7 | 21 | 47 | 12 | 1050 | NW | 5,3 | 1274 |
| 66 | Avala** | Србија | 20 | 45 | 44 | 23 | 475 | S-SE | 11,9 | 668 |
| 67 | Boranja** | Србија | 19 | 45 | 44 | 0 | 410 | N-NW | 10,9 | 837 |
| 68 | Fruska gora** | Србија | 19 | 55 | 45 | 10 | 370 | N-NE | 11,2 | 782 |
| 69 | Cer** | Србија | 19 | 50 | 44 | 12 | 745 | SE | 10,9 | 837 |

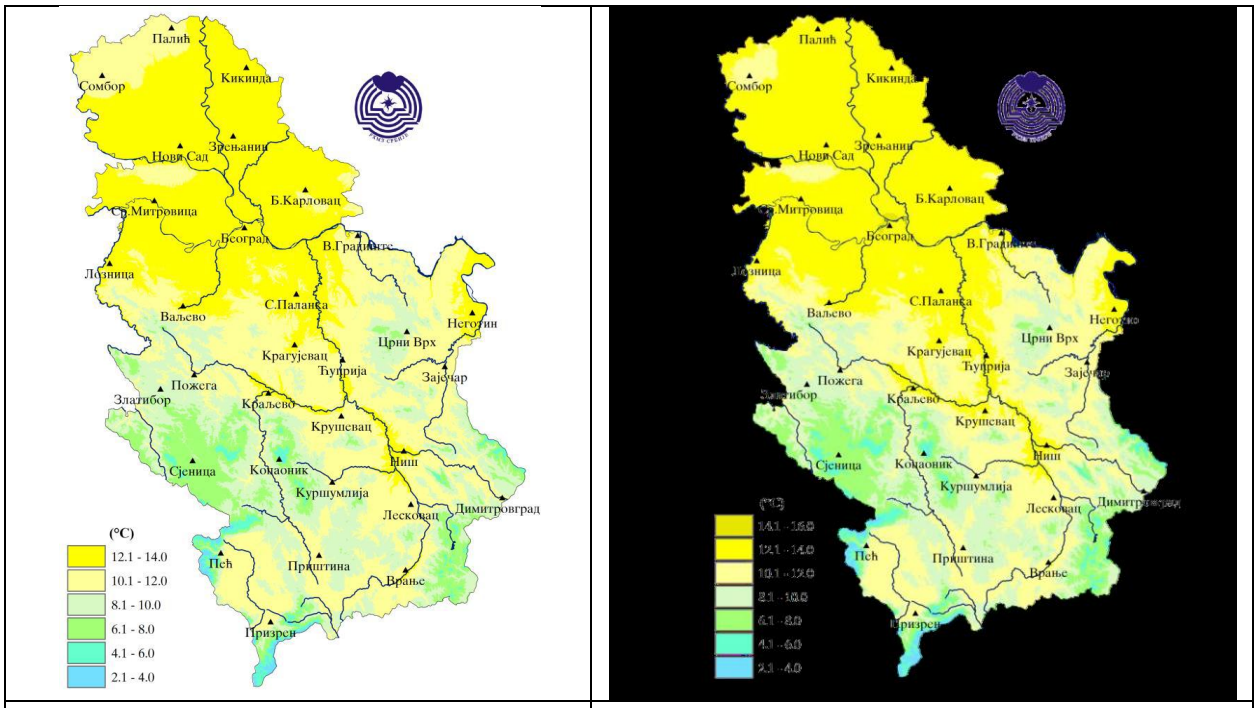
Напомена: * семе сакупљено 2003. године; ** семе сакупљено 2004 године

## 2.1. Климатске карактеристике локалитета на коме је основан провенијенични тест у годинама у којима су вршена истраживања морфолошких карактеристика листова

Утицај фактора спољашње средине на фенотиспке карактеристике опште је познат. Морфолошке особине листова различитих провенијенција букве, резултат су интеракције генофонда самих провенијенција и фактора спољашње средине у којима су се оне развијале. Имајући у виду да је реч о мање-више уједначеним условима станишта, на којима је основан провенијенични тест, климатске карактеристике и година у којима су вршена истраживања, могу имати значајан утицај на добијене резултате.

Компарација климатских података у две истраживане године, 2016. и 2017. обављена је на основу Годишњих билтена за Србију, Републичког хиброметеоролошког завода Србије (http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteorologija/ciril/2016.pdf; http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteorologija/ciril/2017.pdf). Према овим подацима, **2016.** година на територији Србије је дефинисана као ***топла и кишна***, а **2017**. година као ***топла и сушна.***

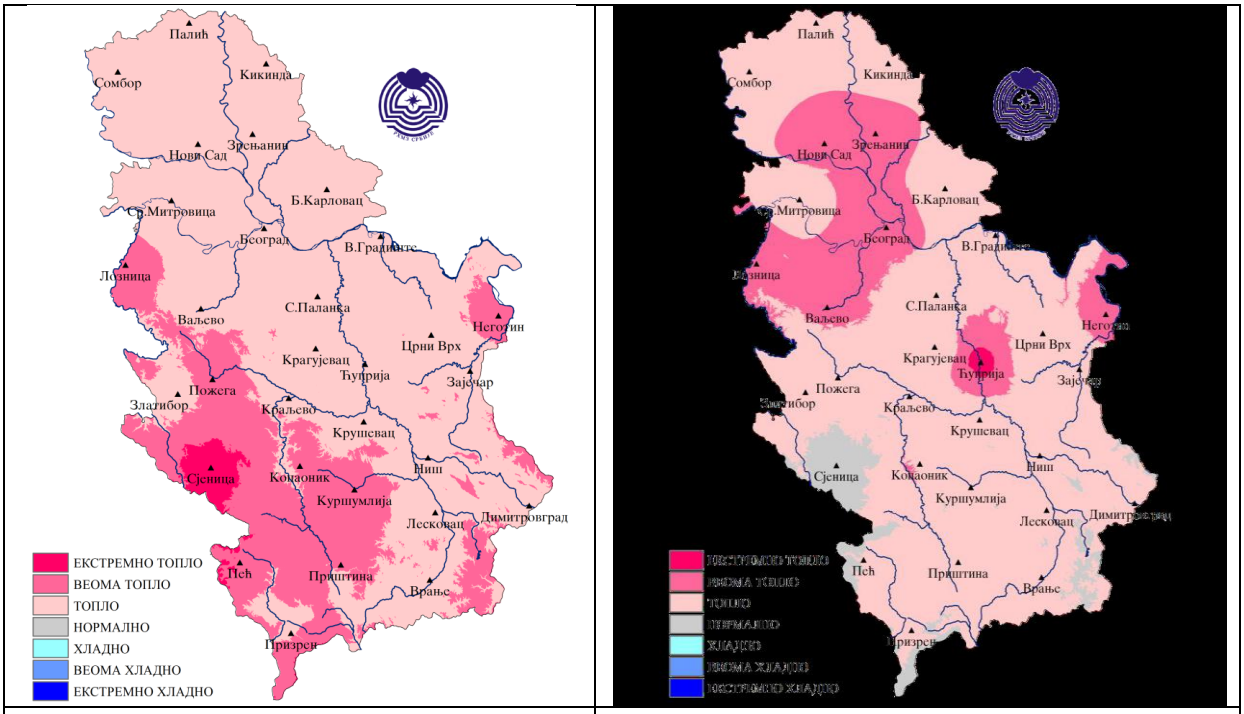
Према просторној расподели средњих годишњих температура (°C), може се констатовати да је на подручју провенијеничног теста, просечна средња годишња температура, у обе посматране године, била у распону од 10,1-12,0 °C (слика 2.2).




| 2016 | 2017 |
|---|---|

**Слика 2.2.** Просторна расподела средње годишње температуре (°C)

Просторна расподела средње годишње температуре одређена методом перцентила, за анализиране године, приказана је на слици 2.3. На подручју провенијеничног теста, у обе посматране године, констатовано је веома топло време.



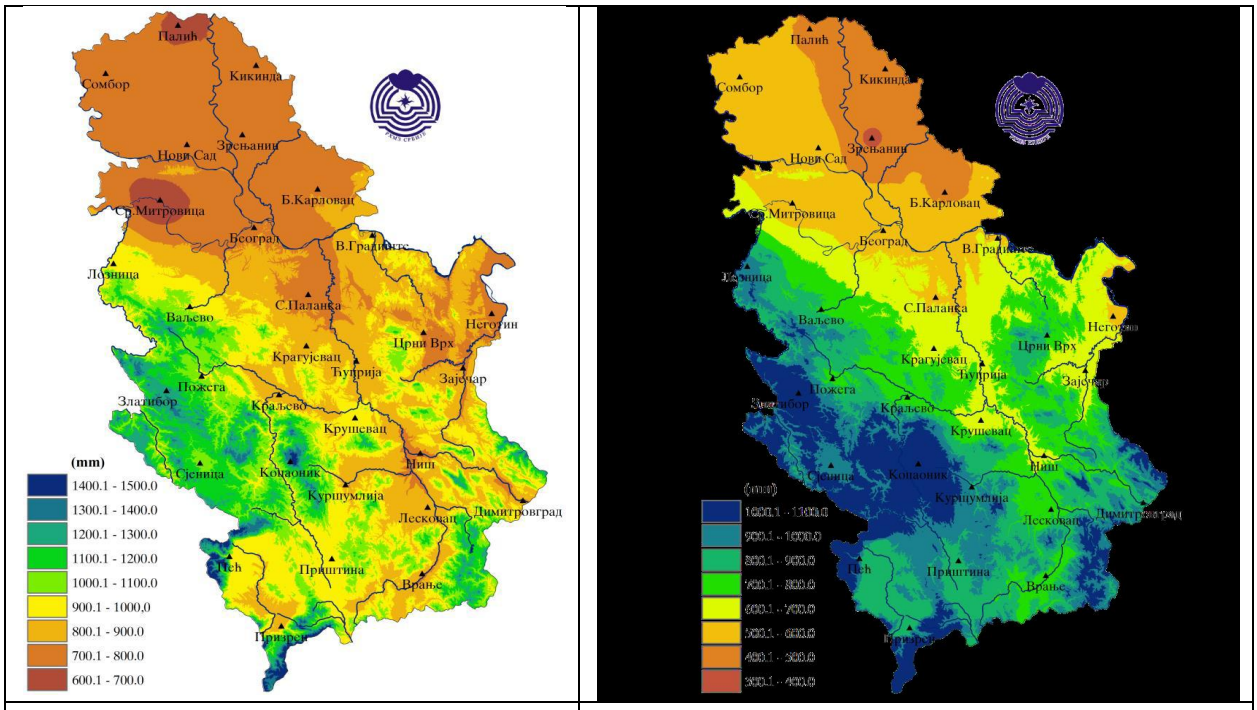

**Слика 2.3.** Просторна расподела средње годишње температуре одређена методом перцентила

Просторна расподела годишње количине падавина у милиметрима, за анализиране године, приказана је на слици 2.4. Може се констатовати да је на подручју провенијеничног теста, у 2016-ој години, годишња количина падавина била у распону од 900,1 до 1000,0 mm, односно у 2017-ој години у распону од 700,1 до 800,0 mm.

Просторна расподела годишње количине падавина одређена методом перцентила, за анализиране године, приказана је на слици 2.5. Подручје на коме је основан провенијенични тест у 2016-ој години окарактерисано је као веома кишно, а у 2017-ој години као нормално.

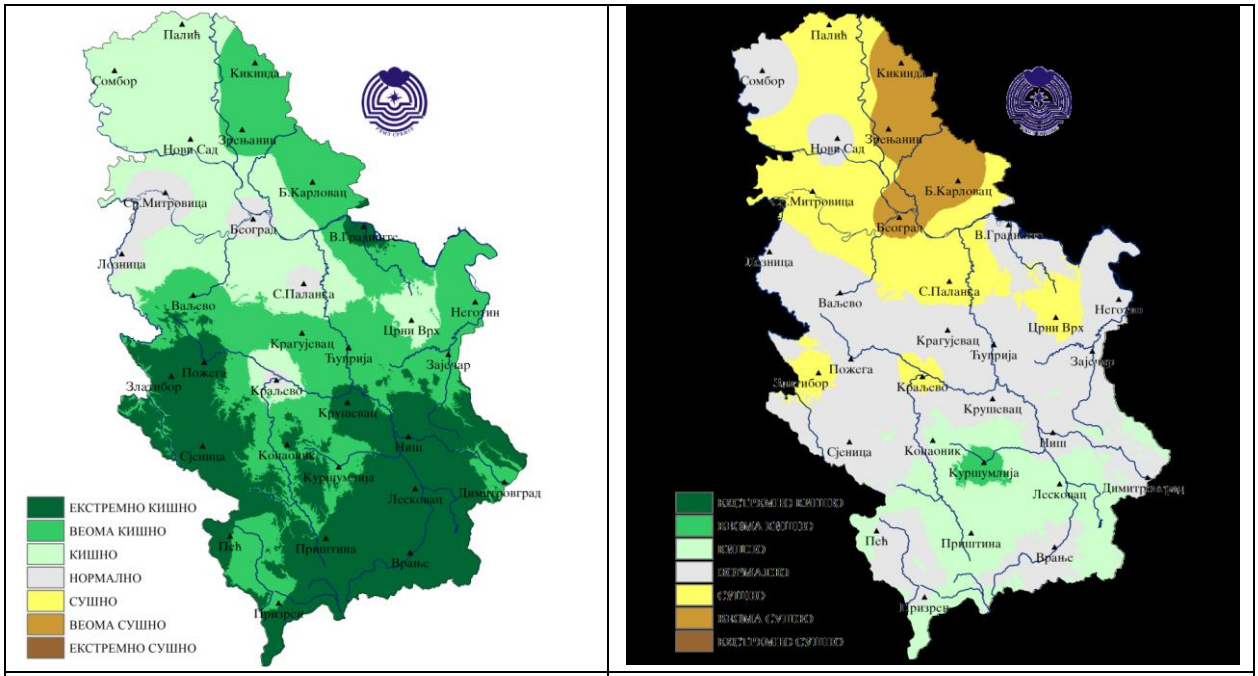
Број осунчаних часова на подручју провенијеничног теста у 2016-ој години креће се од 1901,0 до 2000,0 односно од 2201,0 до 2300,0 у 2017-ој години (слика 2.6) .

**На основу анализираних климатских карактеристика локалитета на коме је основан провенијенични тест, може се констатовати да су обе анализиране године имале исту средњу годишњу температуру, у распону од 10,1-12,0 °C; да се 2016. година одликовала већом количином падавина (900,1 до 1000,0 mm) у односу на 2017. годину (700,1 до 800,0 mm), а да је 2017. година имала већи број осунчаних часова (2201,0 до 2300,0) од 2016. године (1901,0 до 2000,0).**



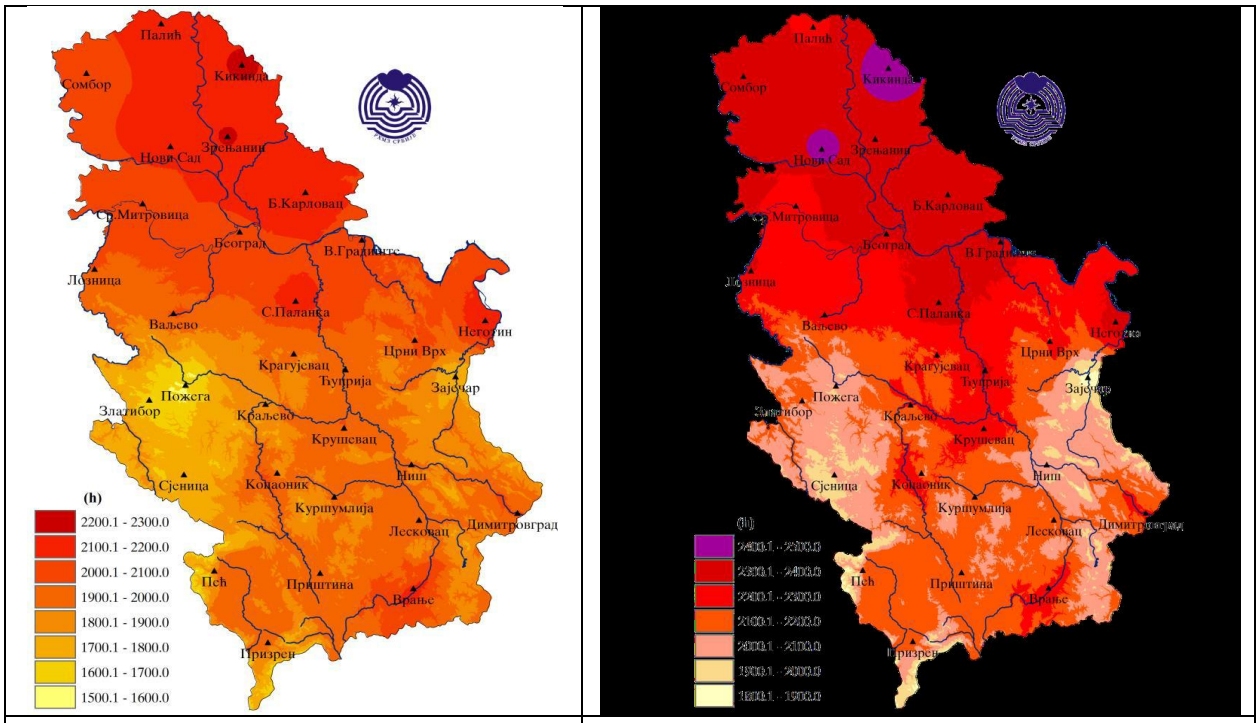

| 2016 | 2017 |
|---|---|

**Слика 2.4.** Просторна расподела годишње количине падавина у милиметрима




| 2016 | 2017 |
|---|---|

**Слика 2.5.** Просторна расподела годишње количине падавина одређена методом перцентила




| 2016 | 2017 |
|---|---|

**Слика 2.6.** Осунчавање у часовима

# 3. АНАЛИЗА ВАРИЈАБИЛНОСТИ МОРФОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА ЛИСТОВА РАЗЛИЧИТИХ ПРОВЕНИЈЕНЦИЈА БУКВЕ

За детерминацију врста лист представља једно од најзначајнијих морфолошких својстава, поред коре, изданака, избојака, пупољака, цветова, плодова и семена. Такође, на основу морфолошких карактеристика листова, могуће је говорити о варијабилности на различитим нивоима. Варијабилнсот свих морфолошких својстава листова није иста. Нека својства, попут димензија листова, су више подложна утицају фактора спољашње средине, за разлику од броја пари нерава, назубљености листа, присуства, односно одсуства длакавости, који је, у највећој мери, генетички детерминисан.

За потребе дефинисања таксономског статуса букве у Србији, један део истраживања посвећен је анализи варијабилности морфолошких својстава листова на нивоу природних популација (I фаза). У II фази пројекта, истраживања су настављена на нивоу различитих провенијенција букве, у циљу утврђивања диференцијације између анализираних популација/провенијенција.

Анализа морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција букве обављена је у две сукцесивне године - 2016. и 2017., на нивоу 17, односно 16 провенијенција. Анализа је обухватила 6 морфолошких својстава листова (дужину и ширину листа, дужину петељке, број нерава са леве, односно десне стране у односу на лисни нерв и размак између 3. и 4. нерва), као и утврђивање површине листова. Улазни подаци за примењену статистику обухватају 30.600 анализираних својстава, на нивоу 170 индивидуа у 2016-ој години и 48.000 анализираних својстава, на нивоу 160 индивидуа у 2017-ој години, што укупно износи 59.400 својстава укључених у анализе.

## 3.1. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Анализа морфолошких својстава листова спроведена је на узорку од по десет, случајно изабраних стабала, из сваке одабране провенијенције. Са сваког стабла, сакупљно је по 30 листова (укупно 300 листова по провенијенцији). Листови су сакупљани у две узастопне године, 2016. и 2017. Преглед провенијенција укључених у истраживања, по годинама, дат је у табели 3.1.

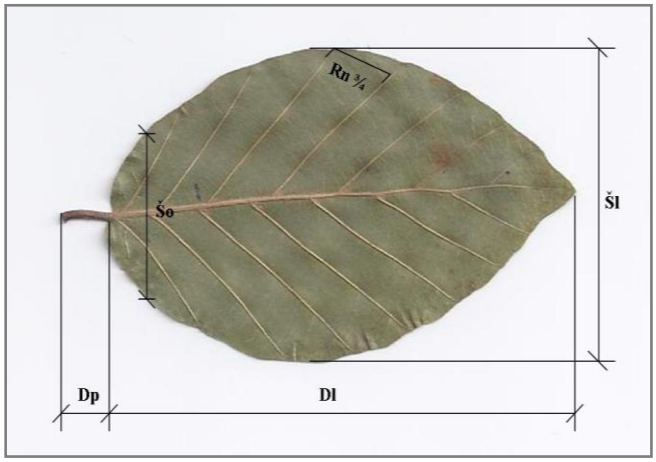
На хербаризованом материјалу мерена су следећа фолијарна својства (слика 3.1):

- дужина листа (Dl),
- ширина листа (Šl),
- дужина петељке (Dp),
- број нерава – лево (Nl),
- број нерава – десно (Nd),
- размак између 3. и 4. нерва (Rn ¾).

Површине листова одређене су на хербаризованим листовима сакупљеним 2016. и 2017. године, на узорку од по 30 листова са 10 стабала из сваке провенијенције, укупно 300 листова по провенијенцији. Површина сваког појединачног листа је измерена помоћу софтвера ImageJ2.0.0.

**Табела 3.1.** Преглед провенијенција укључених у анализе морфолошких карактеристика листова (2016. и 2017.)

| Ознака провенијенције | Име провенијенције | Земља порекла | 2016 | 2017 |
|---|---|---|---|---|
| **HR 24** | Sjeverni dilj Čaglinski | Хрватска | + | + |
| **HR 25** | Vrani Kamen | Хрватска | + | + |
| **BIH 30** | Tajan, Žepče | Босна и Херцеговина | + | |
| **BIH 32** | Crni vrh, Tešanj | Босна и Херцеговина | + | + |
| **BIH 33** | Grmeč, Bosanska krupa | Босна и Херцеговина | + | + |
| **SRB 36** | Fruška Gora | Србија | + | + |
| **SRB 38** | Kopaonik | Србија | + | + |
| **HU 42** | Valkonya | Мађарска | + | + |
| **DE 47** | Schelklingen | Немачка | + | + |
| **DE 48** | Höllerbach | Немачка | + | + |
| **DE 49** | Hasbruch | Немачка | + | + |
| **AT 56** | Scharnstein, Mitterndorf | Аустрија | + | + |
| **BIH 60** | Crini vrh | Босна и Херцеговина | | + |
| **BIH 61** | Grmec, Bastra-Corkova | Босна и Херцеговина | | + |
| **RO 63** | Alesd U.P.II/51A | Румунија | + | + |
| **RO 64** | Alba – Iulia U.P.V/154A | Румунија | + | + |
| **CH 65** | Sihlwald, 101 | Швајцарска | | + |
| **SRB 66** | Avala | Србија | + | |
| **SRB 67** | Boranja | Србија | + | |
| **SRB 69** | Cer | Србија | + | |
| **УКУПНО** | | | **17** | **16** |




**Слика 3.1.** Анализиране морфометријске карактеристике листова

Прикупљени подаци обрађени су помоћу статистичког програма STATISTICA 8.0 и STATGRAFIC. За свако анализирано фолијарно својство урађена је дескриптивна статистика (распон варирања, средња вредност и стандардна девијација). Међупровенијенична варијабилност, на нивоу анализираних карактеристика, утврђена је анализом варијансе (ANOVA). Додатно тестирање обављено је помоћу LSD-теста и Кластер анализе, у циљу процене блискости/удаљености између анализираних провенијенција.

## 3.2. Варијабилност морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција букве сакупљених 2016. године

Резултати дескриптивне статистичке анализе морфолошких својстава листова различитих провенијенција букве, сакупљених у 2016. години, приказани су у табели 3.2.

На основу добијених резултата, може се констатовати да су дужина и ширина листа најваријабилнија својства, затим, по степену варијабилности, долази дужина петељке, док су број нерава, као и размак између 3 и 4 нерва знатно мање варијабилна својства.

Према *дужини листа* све провенијенције могу се поделити у три групе:

- **прва група,** у којој се средња дужина листа креће од 55 до 60 mm. У ову групу спадају провенијенције: 49, 47, 64, 56, 63, 67 и 38 (Немачка, Немачка, Румунија, Аустрија, Румунија, Србија - Борања и Србија - Копаоник);
- **друга група,** у којој се средња дужина листа креће од 60 до 65 mm. У овој групи се налазе провенијенције: 48, 66, 42 и 33 (Немачка, Србија - Авала, Мађарска и БиХ - Грмеч);
- **трећа група,** у којој се средња дужина листа креће од 65 до 70 mm. У ову групу спадају провенијенције: 25, 24, 69, 32, 30 и 36 (Хрватска, Хрватска, Србија - Цер, БиХ - Црни Врх, БиХ - Жепче, Србија - Фрушка гора).

Према *ширини листова* све провенијенције се могу поделити у две групе:

- **прва група,** у којој се средња ширина листа креће од 30 до 35 mm. У ову групу спадају провенијенције: 47, 49, 64, 67, 48, 66, 38, 63 и 56 (Немачка, Немачка, Румунија, Србија - Борања, Немачка, Србија - Авала, Србија - Копаоник, Румунија, Аустрија).
- **друга група,** у којој се средња ширина листа креће од 35 до 40 mm. У ову групу спадају провенијенције: 42, 33, 69, 30, 32, 25 и 24 (Мађарска, БиХ - Грмеч, Србија - Цер, БиХ - Жепче, БиХ - Црни Врх, Хрватска, Хрватска. Провенијенција 36, пореклом из Србије са Фрушке горе има средњу ширину листова преко 40 mm (41,14 mm).

**Анализирајући димензије листова (дужину и ширину), може се констатовати да постоји значајна варијабилност између анализираних провенијенција, при чему немачке, румунске и аустријске провенијенције показују мање средње вредности дужине и ширине листова од хрватских и провенијенција из Босне и Херцеговине. Српске провенијенције бележе и релативно мале средње вредности димензија листова, као што је то случај са провенијенцијом Борања (67) и Копаоник (38), као и релативно високе средње вредности димензија листова, провенијенција Фрушка гора (36) и Цер (69), што не указује на њихову јасну диференцираност по овим својствима, у односу на друге анализиране провенијенције.**

*Дужина петељке* је знатно мање варијабилно својство од дужине и ширине листова. Анализиране провенијенције могу се поделити у две групе:

- **прва група,** у којој се средња дужина петељке креће од 6 до 7 mm. У ову групу спадају провенијенције: 47 (5,65 mm), 66, 64, 42, 56, 49 и 32 (Немачка, Србија - Авала, Мађарска, Аустриа, Немачка, БиХ - Црни Врх);
- **друга група,** у којој се средње вредности дужине петељке крећу од 7 до 8 mm. У ову групу спадају провенијенције 69, 38, 63, 48, 36, 33, 25, 67, 24 и 30 (8,15 mm) (Србија - Цер, Србија - Копаоник, Румунија, Немачка, Србија - Фрушка гора, БиХ - Грмеч, Хрватска, Србија - Авала, Хрватска и БиХ).

**Табела 3.2.** Дескриптивна статистика за морфолошка својства листова провенијенција букве (2016.)

| Дескриптивни показатељи | No. | Дужина листа (mm) | Ширина листа (mm) | Дужина петељке (mm) | Број нерава лево | Број нерава десно | Размак између 3. и 4. нерва (mm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Xmin–Xmax | ***HR24*** | 30-99 | 20-64 | 2-15 | 5-9 | 5-9 | 4-9 |
| | ***HR25*** | 32-94 | 20-59 | 1-16 | 4-10 | 5-10 | 3-10 |
| | ***BiH30*** | 38-90 | 23-62 | 1-16 | 4-11 | 5-11 | 1-10 |
| | ***BIH32*** | 37-100 | 20-58 | 2-13 | 5-10 | 5-10 | 4-9 |
| | ***BiH33*** | 40-87 | 20-61 | 3-19 | 5-10 | 5-10 | 4-10 |
| | ***SR36*** | 30-100 | 15-65 | 1-12 | 4-10 | 5-110 | 3-8 |
| | ***SR38*** | 35-97 | 17-55 | 2-13 | 5-10 | 5-10 | 3-10 |
| | ***HU42*** | 30-92 | 6-64 | 2-13 | 4-10 | 3-10 | 3-10 |
| | ***DE47*** | 22-87 | 17-51 | 2-13 | 4-10 | 4-11 | 3-12 |
| | ***DE48*** | 28-87 | 14-50 | 2-13 | 5-9 | 4-9 | 3-8 |
| | ***DE49*** | 32-82 | 20-60 | 3-11 | 5-10 | 4-10 | 3-9 |
| | ***AT56*** | 39-78 | 23-53 | 3-11 | 4-9 | 4-9 | 3-9 |
| | ***RO63*** | 32-82 | 18-63 | 3-11 | 5-10 | 4-10 | 3-8 |
| | ***RO64*** | 38-75 | 20-52 | 2-11 | 5-10 | 5-10 | 3-7 |
| | ***SR66*** | 30-84 | 20-55 | 3-11 | 5-10 | 5-9 | 3-10 |
| | ***SR67*** | 31-85 | 16-55 | 2-14 | 5-10 | 5-10 | 3-7 |
| | ***SR69*** | 41-97 | 20-66 | 3-13 | 6-10 | 6-10 | 4-10 |
| $\bar{X}$ | ***HR24*** | 66,01 | 39,96 | 7,65 | 7,45 | 7,31 | 5,91 |
| | ***HR25*** | 65,37 | 39,65 | 7,50 | 7,34 | 7,41 | 5,85 |
| | ***BiH30*** | 68,63 | 38,98 | 8,15 | 8,18 | 8,24 | 6,99 |
| | ***BIH32*** | 68,62 | 39,49 | 6,92 | 7,9 | 7,81 | 5,61 |
| | ***BiH33*** | 62,43 | 37,26 | 7,44 | 7,51 | 7,47 | 6,67 |
| | ***SR36*** | 69,02 | 41,14 | 7,41 | 8,14 | 7,91 | 5,36 |
| | ***SR38*** | 59,94 | 34,71 | 7,09 | 7,52 | 7,59 | 5,46 |
| | ***HU42*** | 60,88 | 36,97 | 6,46 | 7,34 | 7,47 | 6,05 |
| | ***DE47*** | 56,17 | 32,41 | 5,65 | 7,19 | 7,33 | 6,81 |
| | ***DE48*** | 60,32 | 34,21 | 7,33 | 7,33 | 7,05 | 5,54 |
| | ***DE49*** | 55,04 | 33,58 | 6,82 | 7,27 | 7,00 | 4,80 |
| | ***AT56*** | 57,89 | 35,05 | 6,67 | 7,05 | 6,94 | 5,63 |
| | ***RO63*** | 58,82 | 34,92 | 7,11 | 7,78 | 7,47 | 5,03 |
| | ***RO64*** | 57,31 | 33,78 | 6,36 | 7,97 | 7,81 | 4,98 |
| | ***SR66*** | 60,34 | 34,26 | 6,10 | 7,54 | 7,57 | 6,44 |
| | ***SR67*** | 59,54 | 34,20 | 7,52 | 7,61 | 7,41 | 4,65 |
| | ***SR69*** | 66,37 | 38,90 | 7,01 | 7,94 | 7,84 | 6,63 |
| S | ***HR24*** | 10,55 | 8,37 | 2,50 | 0,81 | 0,81 | 1,02 |
| | ***HR25*** | 12,54 | 7,82 | 2,21 | 1,00 | 0,93 | 1,42 |
| | ***BiH30*** | 9,83 | 6,75 | 2,54 | 1,03 | 1,05 | 1,08 |
| | ***BIH32*** | 12,23 | 7,18 | 2,06 | 0,95 | 0,93 | 1,11 |
| | ***BiH33*** | 8,98 | 6,81 | 2,36 | 0,95 | 0,90 | 1,05 |
| | ***SR36*** | 8,75 | 7,47 | 1,63 | 0,89 | 0,76 | 0,93 |
| | ***SR38*** | 10,02 | 6,88 | 1,91 | 0,87 | 0,86 | 1,06 |
| | ***HU42*** | 10,24 | 8,50 | 1,78 | 0,98 | 1,01 | 1,29 |
| | ***DE47*** | 9,91 | 5,99 | 1,95 | 1,04 | 1,11 | 1,49 |
| | ***DE48*** | 9,47 | 5,72 | 2,08 | 0,87 | 0,88 | 0,92 |
| | ***DE49*** | 8,10 | 6,44 | 1,75 | 0,92 | 0,94 | 0,88 |
| | ***AT56*** | 7,53 | 6,25 | 1,74 | 0,97 | 0,86 | 1,13 |
| | ***RO63*** | 8,81 | 6,94 | 1,57 | 0,93 | 0,91 | 1,02 |
| | ***RO64*** | 7,02 | 5,82 | 167 | 0,97 | 0,95 | 0,92 |
| | ***SR66*** | 9,17 | 6,06 | 1,57 | 0,88 | 0,85 | 0,12 |
| | ***SR67*** | 10,02 | 6,95 | 2,44 | 0,83 | 0,85 | 0,86 |
| | ***SR69*** | 9,90 | 7,21 | 1,82 | 0,85 | 0,85 | 1,27 |

*Број нерава са леве и десне стране листа* су најмање варијабилна својства код анализираних провенијенција. Анализирајући број нерава са леве стране листа, може се констатовати да просечно 7 нерава имају провенијенције из Аустрије (56), Немачке (47,48 и 49), Мађарске (42) и Хрватске (24 и 25). Просечно 8 нерава имају провенијенције из Босне и Херцеговине (30,32 и 33), Србије (36,38,66,67 и 69) и Румуније (63 и 64).

Просечано 7 нерава са десне стране листа имају провенијенције из Аустрије (56), Немачке (47,48 и 49), Хрватске (24 и 25), Србије (66 и 67), Румуније (63), Мађарске (42) и Босне и Херцеговине (33). Просечно 8 нерава са десне стране листа имају српске (36,38 и 69), румунске (64) и провенијенције из Босне и Херцеговине (30 и 32).

**Просечан број нерава на листу код анализираних провенијенција креће се од 6, код Немачке провенијенције број 47, до 8, код српских провенијенција (Фрушка гора - број 36 и Борања - број 67), једне хрватске (број 24) и једне босанске (број 30) провенијенције. Највећи број анализираних провенијенција има просечан број нерава на листу 7. Ово својство не указује на јасну диференцијацију српских провенијенција у односу на друге анализиране провенијенције.**

*Размак између трећег и четвртог нерва* (mm) је варијабилније својство од броја нерава. Анализиране провенијенције могу се поделити у три групе:

- **прва група,** у којој се средња вредност размака између 3 и 4. нерва креће од 4,5 до 5mm. У ову групу спадају провенијенције: 67, 49 и 64 (Србија - Борања, Немачка и Румунија);
- **друга група,** у коју спадају провенијенције чије се средња вредност размака између 3 и 4. нерва креће између 5 и 6 mm. У ову групу спадају провенијенције: 63, 36, 48, 38, 32, 56, 25 и 24 (Румунија, Србија - Фрушка гора, Немачка, Србија - Копаоник, БиХ - Црни Врх, Аустрија и две провенијенције из Хрватске);
- **трећа група,** у коју спадају провенијенције чија се средња вредност размака између 3 и 4. нерва креће између 6 и 7 mm. У ову групу спадају провенијенције: 42, 66, 69, 33, 47 и 30 (Мађарска, Србија - Авала, Србија - Цер, БиХ - Грмеч, Немачка и БиХ - Тајан, Жепче).

**Табела 3.3.** Резултати анализе варијансе за морфолошка својства листова провенијенција букве (2016.)

| ИЗМЕЂУ ПРОВЕНИЈЕНЦИЈА | | | |
|---|---|---|---|
| Својство | Mean square | F-ratio | P-value |
| Дужина листа (mm) | 624,38 | 66,49 | 0,00 |
| Ширина листа (mm) | 226,84 | 47,13 | 0,00 |
| Дужина петељке (mm) | 11,70 | 29,19 | 0,00 |
| Број нерава –лево | 34,47 | 39,67 | 0,00 |
| Број нерава – десно | 35,34 | 41,85 | 0,00 |
| Размак између 3. и 4. (mm) | 15,83 | 125,59 | 0,00 |

Резултати анализе варијансе (табела 3.3), указују на постојање статистички значајних разлика између средњих вредности код свих анализираних морфолошких карактеристика листова.

**Табела 3.4.** LSD – тест за морфолошка својства листова различитих провенијенција (2016.)

| Провенијенција | Средња вредност | Хомогене групе | Провенијенција | Средња вредност | Хомогене групе | Провенијенција | Средња вредност | Хомогене групе |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Дужина листа (mm)** | | | **Ширина листа (mm)** | | | **Дужина петељке (mm)** | | |
| **DE49** | 55,04 | X | **DE47** | 32,41 | X | **DE47** | 5,65 | X |
| **DE47** | 56,17 | XX | **DE49** | 33,58 | X | **SRB66** | 6,10 | X |
| **RO64** | 57,31 | XX | **RO64** | 33,78 | XX | **RO64** | 6,36 | XX |
| **AT56** | 57,89 | X | **SRB67** | 34,20 | XXX | **HU42** | 6,46 | X |
| **RO63** | 58,82 | XX | **DE48** | 34,21 | XXX | **AT56** | 6,67 | XX |
| **SRB67** | 59,54 | XX | **SRB66** | 34,26 | XXX | **DE49** | 6,82 | XX |
| **SRB38** | 59,94 | XX | **SRB38** | 34,71 | XX | **BiH32** | 6,92 | XX |
| **DE48** | 60,33 | XX | **RO63** | 34,92 | X | **SRB69** | 7,01 | XX |
| **SRB66** | 60,34 | XX | **AT56** | 35,05 | X | **SRB38** | 7,09 | XX |
| **HU42** | 60,88 | XX | **HU42** | 36,97 | X | **RO63** | 7,11 | XXX |
| **BiH33** | 62,43 | X | **BiH33** | 37,26 | X | **DE48** | 7,33 | XXX |
| **HR25** | 65,37 | X | **SRB69** | 38,90 | X | **SRB36** | 7,41 | XX |
| **HR24** | 66,09 | X | **BiH30** | 38,98 | X | **BiH33** | 7,44 | X |
| **SRB69** | 66,37 | X | **BiH32** | 39,49 | X | **HR25** | 7,50 | X |
| **BiH32** | 68,62 | X | **HR25** | 39,65 | X | **SRB67** | 7,52 | X |
| **BiH30** | 68,63 | X | **HR24** | 39,96 | X | **HR24** | 7,65 | X |
| **SRB36** | 69,02 | X | **SRB36** | 41,14 | X | **BiH30** | 8,15 | X |
| **Број нерава –лево** | | | **Број нерава – десно** | | | **Размак између 3. и 4. нерва (mm)** | | |
| **AT56** | 7,05 | X | **AT56** | 6,94 | X | **SRB67** | 4,65 | X |
| **DE47** | 7,19 | XX | **DE49** | 7,00 | X | **DE49** | 4,80 | XX |
| **DE49** | 7,27 | XX | **DE48** | 7,05 | X | **RO64** | 4,98 | XX |
| **DE48** | 7,33 | XXX | **HR24** | 7,31 | X | **RO63** | 5,03 | X |
| **HU42** | 7,34 | XX | **DE47** | 7,33 | XX | **SR36** | 5,36 | X |
| **HR25** | 7,34 | XX | **HR25** | 7,41 | XX | **DE48** | 5,44 | XX |
| **HR24** | 7,45 | XX | **SRB67** | 7,41 | XX | **SR38** | 5,46 | XXX |
| **BiH33** | 7,51 | XX | **RO63** | 7,47 | XX | **BiH32** | 5,61 | XX |
| **SRB38** | 7,52 | XX | **HU42** | 7,47 | XX | **AT56** | 5,63 | X |
| **SRB66** | 7,54 | XX | **BiH33** | 7,47 | XX | **HR25** | 5,85 | X |
| **SRB67** | 7,61 | X | **SRB66** | 7,57 | X | **HR24** | 5,91 | XX |
| **RO63** | 7,78 | X | **SRB38** | 7,59 | X | **HU42** | 6,05 | X |
| **BiH32** | 7,9 | XX | **RO64** | 7,81 | X | **SR66** | 6,44 | X |
| **SRB69** | 7,94 | X | **BiH32** | 7,81 | X | **SRB69** | 6,63 | X |
| **RO64** | 7,97 | X | **SRB69** | 7,84 | X | **BiH33** | 6,67 | X |
| **SRB36** | 8,14 | X | **SRB36** | 7,91 | X | **DE47** | 6,81 | X |
| **BiH30** | 8,18 | X | **BiH30** | 8,24 | X | **BiH30** | 6,99 | X |

Резултати LSD теста указују на постојање више хомогених група за свако од анализираних морфолошких својстава листова (табела 3.4), при чему се не може утврдити јасна генетичка диференцираност провенијенција према њиховом пореклу.

## 3.3. Варијабилност морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција букве сакупљених у 2017. години

Резултати дескриптивне статистичке анализе морфолошких параметара листова различитих провенијенција букве, сакупљених у 2017-ој години, приказани су у табели 3.5.

**Табела 3.5.** Дескриптивна статистика за морфолошка својства листова провенијенција букве (2017.)

| Дескриптивни показатељи | No. | Дужина листа (mm) | Ширина листа (mm) | Дужина петељке (mm) | Број нерава - лево | Број нерава - десно | Размак између 3. и 4. нерва (mm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Xmin–Xmax** | **HR24** | 39 -119 | 24-75 | 3-25 | 5-10 | 5-10 | 5-12 |
| | **HR25** | 54 -109 | 31-69 | 5-18 | 6-10 | 6-10 | 5-9 |
| | **BiH32** | 32 -109 | 23-77 | 2-17 | 5-10 | 5-10 | 5-10 |
| | **BiH33** | 44 -113 | 25-66 | 5-16 | 5-11 | 5-10 | 4-8 |
| | **SR36** | 45-93 | 26-67 | 4-14 | 4-10 | 5-10 | 5-11 |
| | **SR38** | 39-95 | 25-65 | 1-15 | 5-10 | 5-10 | 3-10 |
| | **HU42** | 38-108 | 24-84 | 4-20 | 5-11 | 5-11 | 4-12 |
| | **DE47** | 47-99 | 28-69 | 4-21 | 6-11 | 6-11 | 4-11 |
| | **DE48** | 45-105 | 19-73 | 6-16 | 5-10 | 5-10 | 5-12 |
| | **DE49** | 39-93 | 26-64 | 3-15 | 5-11 | 5-11 | 4-10 |
| | **AT56** | 39 - 82 | 22-63 | 2-15 | 4-10 | 4-10 | 4-10 |
| | **RO60** | 47-108 | 25-71 | 1-22 | 5-10 | 5-10 | 5-11 |
| | **BiH61** | 43-92 | 27-64 | 3-13 | 6-10 | 6-10 | 4-10 |
| | **RO63** | 50-95 | 29-70 | 3-14 | 6-10 | 6-10 | 4-10 |
| | **RO64** | 37-94 | 22-68 | 4-14 | 5-10 | 5-10 | 3-10 |
| | **CH65** | 37-96 | 23-65 | 3-15 | 5-10 | 5-10 | 4-10 |
| $\bar{X}$ | **HR24** | 75,09 | 47,12 | 10,25 | 7,99 | 7,98 | 7,68 |
| | **HR25** | 74,77 | 45,65 | 10,29 | 8,29 | 8,30 | 6,87 |
| | **BiH32** | 71,59 | 42,38 | 7,65 | 7,64 | 7,75 | 7,20 |
| | **BiH33** | 71,03 | 40,88 | 9,29 | 8,16 | 8,13 | 6,40 |
| | **SR36** | 69,31 | 42,22 | 8,66 | 7,73 | 7,70 | 7,02 |
| | **SR38** | 66,92 | 41,53 | 8,41 | 7,96 | 7,96 | 6,46 |
| | **HU42** | 68,00 | 41,49 | 9,94 | 8,05 | 8,06 | 6,54 |
| | **DE47** | 68,66 | 42,49 | 9,67 | 8,10 | 8,10 | 6,62 |
| | **DE48** | 73,42 | 46,04 | 10,39 | 8,02 | 7,90 | 7,17 |
| | **DE49** | 64,24 | 42,59 | 8,18 | 7,60 | 7,67 | 6,92 |
| | **AT56** | 60,59 | 38,75 | 8,40 | 7,62 | 7,62 | 6,29 |
| | **RO60** | 70,87 | 42,68 | 8,84 | 7,77 | 7,85 | 6,79 |
| | **BiH61** | 68,25 | 41,97 | 8,24 | 7,98 | 7,96 | 6,58 |
| | **RO63** | 69,01 | 42,59 | 8,23 | 8,17 | 8,01 | 6,72 |
| | **RO64** | 68,24 | 42,96 | 8,59 | 8,11 | 8,03 | 6,51 |
| | **CH65** | 65,13 | 39,94 | 8,23 | 7,69 | 7,65 | 6,56 |
| **S** | **HR24** | 12,77 | 10,09 | 2,95 | 1,00 | 1,00 | 1,11 |
| | **HR25** | 10,67 | 6,35 | 2,02 | 0,87 | 0,88 | 0,73 |
| | **BiH32** | 15,20 | 8,51 | 2,93 | 1,21 | 1,20 | 0,87 |
| | **BiH33** | 12,40 | 7,44 | 2,18 | 1,00 | 0,96 | 0,97 |
| | **SR36** | 9,66 | 8,26 | 1,90 | 0,99 | 1,00 | 1,05 |
| | **SR38** | 10,33 | 7,92 | 2,18 | 1,13 | 1,14 | 1,33 |
| | **HU42** | 13,10 | 9,44 | 2,58 | 1,09 | 1,06 | 1,34 |
| | **DE47** | 10,46 | 8,81 | 2,71 | 0,92 | 0,92 | 1,24 |
| | **DE48** | 10,49 | 8,99 | 1,95 | 0,96 | 0,94 | 1,04 |
| | **DE49** | 10,19 | 7,78 | 2,33 | 1,02 | 1,04 | 1,24 |
| | **AT56** | 7,86 | 7,40 | 2,44 | 0,93 | 0,93 | 1,13 |
| | **RO60** | 10,56 | 7,47 | 2,35 | 1,01 | 1,04 | 1,09 |
| | **BiH61** | 9,09 | 7,25 | 2,13 | 0,97 | 0,92 | 1,21 |
| | **RO63** | 9,66 | 7,89 | 2,17 | 0,84 | 0,86 | 1,31 |
| | **RO64** | 8,62 | 7,67 | 2,03 | 0,93 | 0,92 | 1,16 |
| | **CH65** | 11,66 | 8,75 | 2,43 | 0,98 | 0,95 | 1,23 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Cv %** | **HR24** | 17,01 | 21,41 | 28,81 | 12,51 | 12,52 | 14,51 |
| | **HR25** | 14,27 | 13,91 | 19,59 | 10,48 | 10,64 | 10,62 |
| | **BiH32** | 21,23 | 20,09 | 38,34 | 15,80 | 15,43 | 12,06 |
| | **BiH33** | 17,47 | 18,20 | 23,51 | 12,31 | 11,81 | 15,18 |
| | **SR36** | 13,94 | 19,56 | 21,97 | 12,85 | 12,99 | 15,01 |
| | **SR38** | 15,43 | 19,08 | 25,92 | 14,18 | 14,32 | 20,67 |
| | **HU42** | 19,26 | 22,75 | 25,97 | 13,60 | 13,14 | 20,49 |
| | **DE47** | 15,24 | 20,72 | 27,99 | 11,36 | 11,32 | 18,65 |
| | **DE48** | 14,28 | 19,54 | 18,74 | 12,00 | 11,94 | 14,44 |
| | **DE49** | 15,86 | 18,28 | 28,52 | 13,36 | 13,57 | 17,89 |
| | **AT56** | 12,98 | 19,10 | 29,05 | 12,16 | 12,16 | 17,96 |
| | **RO60** | 14,90 | 17,50 | 26,61 | 13,04 | 13,29 | 15,99 |
| | **BiH61** | 13,31 | 17,28 | 25,85 | 12,17 | 11,59 | 18,42 |
| | **RO63** | 13,99 | 18,53 | 26,62 | 10,25 | 10,75 | 19,49 |
| | **RO64** | 12,63 | 17,85 | 23,67 | 11,53 | 11,48 | 17,84 |
| | **CH65** | 17,91 | 21,92 | 29,46 | 12,72 | 12,42 | 18,84 |

На основу приказаних резултата, може се констатовати да су дужина и ширина листова највише варијабилна својства, као и дужина петељке, док је број нерава својство са знатно мањом варијабилношћу, као и размак између 3. и 4. нерва. У односу на 2016. годину, може се констатаовати да су средње вредности анализираних параметера веће код свих анализираних провенијенција, што се може приписати климатским карактеристикама истраживаних година. Утврђена варијабилност последица је интеракције генофонда самих провенијенција и климатских карактеристика, које су се разликовале у ове две истраживане године.

**Табела 3.6.** Резултати анализе варијансе за морфолошка својства листова провенијенција букве (2017.)

| ИЗМЕЂУ ПРОВЕНИЈЕНЦИЈА | | | |
|---|---|---|---|
| Својство | Mean square | F-ratio | P-value |
| Дужина листа | 4383,51 | 36,60 | 0,00 |
| Ширина листа | 1391,70 | 20,81 | 0,00 |
| Дужина петељке | 238,39 | 43,09 | 0,00 |
| Број нерава –лево | 14,88 | 15,03 | 0,00 |
| Број нерава – десно | 11,40 | 11,65 | 0,00 |
| Размак између 3. и 4. нерва | 39,31 | 30,22 | 0,00 |

На основу резултата анализе варијансе (ANOVA) за морфолошка својства листова различитих провенијенција букве, сакупљених 2017. године, може се констатовати да су разлике између средњих вредности за сва анализирана својства, статистички значајне (табела 3.6).

Резултати LSD – теста за морфолошка својства листова, различитих провенијенција, сакупљених 2017. године (табела 3.7), показују груписање провенијенција у више хомогених група, у зависности од конкретног својства.

**Табела 3.7.** LSD – тест за морфолошка својства листова различитих провенијенција (2017.)

| Провенијенција | Средња вредност | Хомогене групе | Провенијенција | Средња вредност | Хомогене групе | Провенијенција | Средња вредност | Хомогене групе |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Дужина листа (mm)** | | | **Ширина листа (mm)** | | | **Дужина петељке (mm)** | | |
| **AT56** | 60,59 | X | **AT56** | 38,75 | X | **BiH32** | 7,65 | X |
| **DE49** | 64,24 | X | **CH65** | 39,94 | XX | **RO63** | 8,16 | X |
| **CH65** | 65,13 | X | **BiH33** | 40,88 | XX | **DE49** | 8,18 | X |
| **SRB38** | 66,92 | X | **HU42** | 41,49 | XX | **CH65** | 8,23 | XX |
| **HU42** | 68,00 | XX | **SRB38** | 41,53 | XX | **BiH61** | 8,24 | XX |
| **RO64** | 68,24 | XX | **BiH61** | 41,97 | XXX | **AT56** | 8,40 | XXX |
| **BiH61** | 68,25 | XX | **SRB36** | 42,22 | XX | **SRB38** | 8,41 | XXX |
| **DE47** | 68,66 | XX | **BiH32** | 42,38 | XX | **RO64** | 8,59 | XXX |
| **RO63** | 69,01 | X | **DE47** | 42,49 | XX | **SRB36** | 8,66 | XX |
| **SRB36** | 69,31 | XX | **DE49** | 42,59 | XX | **BiH60** | 8,84 | X |
| **BiH60** | 70,87 | XX | **RO63** | 42,59 | XX | **BiH33** | 9,29 | X |
| **BiH33** | 71,03 | XX | **BiH60** | 42,68 | XX | **DE47** | 9,67 | X |
| **BiH32** | 71,59 | X | **RO64** | 42,96 | X | **HU42** | 9,94 | XX |
| **DE48** | 73,42 | X | **HR25** | 45,65 | X | **HR24** | 10,25 | XX |
| **HR25** | 74,77 | X | **DE48** | 46,04 | XX | **HR25** | 10,29 | XX |
| **HR24** | 75,09 | X | **HR24** | 47,12 | X | **DE48** | 10,39 | X |
| **Број нерава –лево** | | | **Број нерава – десно** | | | **Размак између 3. и 4. нерва (mm)** | | |
| **DE49** | 7.60 | X | **AT56** | 7,62 | X | **AT56** | 6,29 | X |
| **AT56** | 7.62 | XX | **CH65** | 7,65 | X | **BiH33** | 6,40 | XX |
| **BiH32** | 7.64 | XX | **DE49** | 7,67 | X | **SRB38** | 6,46 | XXX |
| **CH65** | 7.69 | XX | **SRB36** | 7,70 | XX | **RO64** | 6,51 | XX |
| **SRB36** | 7.73 | XX | **BiH32** | 7,75 | XXX | **HU42** | 6,54 | XX |
| **BiH60** | 7.77 | X | **BiH60** | 7,85 | XXX | **CH65** | 6,56 | XX |
| **SRB38** | 7.96 | X | **DE48** | 7,90 | XXX | **BiH61** | 6,58 | XX |
| **BiH61** | 7.98 | X | **BiH61** | 7,96 | XXX | **DE47** | 6,62 | XXX |
| **HR24** | 7.99 | X | **SRB38** | 7,96 | XXX | **RO63** | 6,74 | XXX |
| **DE48** | 8.02 | XX | **HR24** | 7,97 | XXXX | **BiH60** | 6,79 | XX |
| **HU42** | 8.05 | XX | **RO63** | 8,01 | XXX | **HR25** | 6,87 | XX |
| **DE47** | 8.10 | XX | **RO64** | 8,03 | XXX | **DE49** | 6,92 | XX |
| **RO64** | 8.11 | XX | **HU42** | 8,06 | XX | **SRB36** | 7,02 | XX |
| **BiH33** | 8.16 | XX | **DE47** | 8,10 | XX | **DE48** | 7,17 | X |
| **RO63** | 8.17 | XX | **BiH33** | 8,13 | X | **BiH32** | 7,20 | X |
| **HR25** | 8.29 | X | **HR25** | 8,30 | X | **HR24** | 7,68 | X |

Дужина листова кретала се у дијапазону од 60,59 mm код аустријске провенијенције број 56 до 75,09 mm код хрватске провенијенције број 24. Најмање вредности дужине листова, од 60 до 65 mm имају аустријака (56), немачка (49) и швајцарска (65) провенијенција. Највећи број анализираних провенијенција има дужину листова у распону од 65 до 70 mm, док дужину листова од 70 до 75 mm имају босанске (60, 33 и 32), једна немачка (48) и хрватске (24 и 25) провенијенције.

Најмања ширина листова евидентирана је код провенијенције број 56, пореклом из Аустрије, и износи 38,75 mm, а највећа код хрватске провенијенције број 24 и износи 47,12 mm. Према ширини листа, провенијенције се могу поделити у три групе, прва са најмањим вредностима до 40 mm (аустријака 45 и швајцарска 65), друга у коју спада највећи број анализираних провенијенција, са распоном ширине од 40 до 45 mm и трећа са ширином листова преко 45 mm у коју спадају хрватске провенијенције (24 и 25) и немачка провенијенција 48.

Дужина петељке код анализираних провенијенција кретала се у распону д 7,65 mm (босанка провенијенција број 32) до 10,39 mm (немачка провенијенција број 48). Највећи број провенијенција има дужину петељке око 8 mm. Проесечан број нерава, са леве и десне стране листа, је 8 за све анализиране провенијенције. Размак између 3. и 4. нерва кретао се у распону од 6,29 mm, код аустријске провенијенције број 56 до 7,68 mm, код хрватске провенијенције број 24.

### 3.4. Варијабилност површина листова различитих провенијенција букве сакупљених у 2016. и 2017. години

Резултати дескриптивне статистичке анализе површине листова различитих провенијенција букве, сакупљених 2016. и 2017. године, приказани су у табели 3.8. На основу истих, може се констатовати да су листови имали веће површине 2017. него 2016. године. Распон површине листова 2016. године, код различитих провенијенција, био је од 12,70 до 22,29 $cm^2$, а 2017. године се кретао од 17,68 до 25,96 $cm^2$.

**Табела 3.8.** Дескриптивна статистика за површине листова различитих провенијенција букве (2016. и 2017.)

| Дескриптивни показатељи | Ознака | Површина листа 2016. ($cm^2$) | Површина листа 2017. ($cm^2$) |
|---|---|---|---|
| **Xmin–Xmax** | **HR24** | 5,45-45,12 | 6,57-59,25 |
| | **HR25** | 5,27-37,98 | 13,43-49,1 |
| | **BiH32** | 5,86-38,77 | 5,80-48,21 |
| | **BiH33** | 7,10-37,13 | 7,66-50,4 |
| | **SRB36** | 3,76-49,14 | 8,82-45,97 |
| | **SRB38** | 4,84-38,19 | 7,71-48,23 |
| | **HU42** | 4,30-43,29 | 7,14-65,97 |
| | **DE47** | 4,20-27,92 | 9,69-46,62 |
| | **DE48** | 3,46-33,36 | 5,59-58,53 |
| | **DE49** | 5,92-35,19 | 7,72-42,42 |
| | **AT56** | 7,96-31,47 | 7,31-38,80 |
| | **RO63** | 5,41-51,65 | 5,32-50,77 |
| | **RO64** | 6,27-27,26 | 6,64-48,16 |
| $\bar{x}$ | **HR24** | 20,01 | 25,99 |
| | **HR25** | 18,86 | 25,04 |
| | **BiH32** | 20,57 | 22,22 |
| | **BiH33** | 17,99 | 20,73 |
| | **SRB36** | 22,29 | 21,30 |
| | **SRB38** | 16,26 | 20,35 |
| | **HU42** | 16,86 | 20,90 |
| | **DE47** | 12,70 | 21,98 |
| | **DE48** | 15,31 | 24,63 |
| | **DE49** | 14,04 | 20,41 |
| | **AT56** | 15,96 | 17,68 |
| | **RO63** | 21,72 | 21,30 |
| | **RO64** | 14,35 | 21,01 |
| **S** | **HR24** | 7,04 | 9,83 |
| | **HR25** | 6,49 | 6,75 |
| | **BiH32** | 6,71 | 8,71 |
| | **BiH33** | 5,25 | 7,15 |
| | **SRB36** | 6,85 | 7,10 |
| | **SRB38** | 5,34 | 6,91 |
| | **HU42** | 6,11 | 9,12 |
| | **DE47** | 4,14 | 7,48 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | **DE48** | 4,77 | 8,48 |
| | **DE49** | 4,67 | 6,77 |
| | **AT56** | 4,77 | 5,68 |
| | **RO63** | 7,37 | 7,26 |
| | **RO64** | 3,88 | 6,28 |
| **Cv %** | **HR24** | 35,17 | 37,82 |
| | **HR25** | 34,42 | 26,94 |
| | **BiH32** | 32,60 | 39,21 |
| | **BiH33** | 29,18 | 34,50 |
| | **SRB36** | 30,75 | 33,34 |
| | **SRB38** | 32,82 | 33,98 |
| | **HU42** | 36,25 | 43,65 |
| | **DE47** | 32,62 | 33,99 |
| | **DE48** | 31,16 | 34,42 |
| | **DE49** | 33,26 | 33,18 |
| | **AT56** | 29,90 | 32,11 |
| | **RO63** | 33,91 | 34,08 |
| | **RO64** | 27,06 | 29,88 |

Резултати анализе варијансе (ANOVA) за површине листова различитих провенијенција букве сакупљених 2016. и 2017. године (табела 3.9), показују да су разлике између средњих вредности површине листова, у обе анализиране године статистички значајне.

**Табела 3.9.** Резултати анализе варијансе за површине листова провенијенција букве (2016. и 2017.)

| ИЗМЕЂУ ПРОВЕНИЈЕНЦИЈА | | | |
|---|---|---|---|
| Својство | Mean square | F-ratio | P-value |
| Површина листа 2016. ($cm^2$) | 2816,15 | 84,99 | 0,00 |
| Површина листа 2017. ($cm^2$) | 1509,89 | 26,22 | 0,00 |

**Табела 3.10.** LSD – тест за површине листова провенијенција букве (2016. и 2017.)

| **Провенијенција** | **Средња вредност** | **Хомогене групе** | **Провенијенција** | **Средња вредност** | **Хомогене групе** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Површина листа 2016. ($cm^2$)** | | | **Површина листа 2017. ($cm^2$)** | | |
| **DE47** | 12,70 | X | **AT56** | 17,68 | X |
| **DE49** | 14,04 | X | **SRB38** | 20,35 | X |
| **RO64** | 14,35 | X | **DE49** | 20,41 | X |
| **DE48** | 15,31 | X | **BiH33** | 20,73 | X |
| **AT56** | 15,96 | XX | **HU42** | 20,90 | XX |
| **SRB38** | 16,26 | X | **RO64** | 21,01 | XXX |
| **HU42** | 16,85 | X | **SRB36** | 21,30 | XXX |
| **BiH33** | 17,99 | X | **RO63** | 21,30 | XXX |
| **HR25** | 18,86 | X | **DE47** | 21,98 | XX |
| **HR24** | 20,01 | X | **BiH32** | 22,22 | X |
| **BiH32** | 20,57 | X | **DE48** | 24,63 | X |
| **RO63** | 21,72 | X | **HR25** | 25,04 | XX |
| **SRB36** | 22,29 | X | **HR24** | 25,99 | X |

На основу резултата LSD – теста за површине листова различитих провенијенција букве сакупљених 2016. и 2017. године (табела 3.10), може се констатовати да постоји више хомогених група. У 2016-ој години, најмање вредности површине листова, од 12 до 15 $cm^2$, евидентиране су код немачких провенијенција број 47 и 49 и румунске провенијенције број 64. Највећи број провенијенција имао је површине листова у распону од 15 до 20 $cm^2$, док су површине листова преко 20 $cm^2$ евидентиране код српске провенијенције број 36, румунске број 63, босанске број 32 и хрватске провенијенције број 24. У 2017-ој години, површине листова су биле знатно мање варијабилно својство. Највећи број провенијенција имао је површине листова у распону од 20 до 25 $cm^2$, мање вредности од 20 $cm^2$ евидентиране су само код аустријске провенијенције број 56, а веће од 25 $cm^2$ код хрватских провенијенција број 24 и 25.

## 3.5. Компаративна анализа морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција, сакупљених 2016. и 2017. године

У циљу процене диференцијације између анализираних провенијенција, приступило се компаративној анализи морфолошких карактеристика листова сакупљених 2016. и 2017. године. На основу средњих вредности дужине листова, различитих провенијенција букве (табела 3.11), може се закључити да су најмање вредности, у обе године истраживања, констатоване код немачке провенијенције број 49 и аустријске провенијенције број 56, док су највеће средње вредности овог својства констатоване код хрватских и босанских провенијенција. Средње вредности овог својства 2016. године биле су мање од средњих вредности 2017. године и кретале су се у распону од 55 до 70 mm, док су листови 2017. године имали средње вредности у распону од 60 до 75 mm.

**Табела 3.11.** Средње вредности дужине листова (mm), различитих провенијенција букве (2016. и 2017.)

| Распон варирања | Средње вредности дужине листова | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2016 | | 2017 | |
| 55-60 mm | **DE49** | 55,04 | | |
| | **DE47** | 56,17 | | |
| | **RO64** | 57,31 | | |
| | **AT56** | 57,89 | | |
| | **RO63** | 58,82 | | |
| | **SRB67** | 59,54 | | |
| | **SRB38** | 59,94 | | |
| 60-65 mm | **DE48** | 60,33 | **AT56** | 60,59 |
| | **SRB66** | 60,34 | **DE49** | 64,24 |
| | **HU42** | 60,88 | **CH65** | 65,13 |
| | **BiH33** | 62,43 | | |
| 65-70 mm | **HR25** | 65,37 | **SRB38** | 66,92 |
| | **HR24** | 66,09 | **HU42** | 68,00 |
| | **SRB69** | 66,37 | **RO64** | 68,24 |
| | **BiH32** | 68,62 | **BiH61** | 68,25 |
| | **BiH30** | 68,63 | **DE47** | 68,66 |
| | **SRB36** | 69,02 | **RO63** | 69,01 |
| 70-75 mm | | | **SRB36** | 69,31 |
| | | | **BiH60** | 70,87 |
| | | | **BiH33** | 71,03 |
| | | | **BiH32** | 71,59 |
| | | | **DE48** | 73,42 |
| | | | **HR25** | 74,77 |
| | | | **HR24** | 75,09 |

**У односу на литературне податке које износи Јовановић (1991), а према којима се дужина листа код европске букве креће у распону од 40-100 mm, а код источне у распону од 70 до 140 mm, може се закључити да све анализиране провенијенције имају дужину листа карактеристичну за европску букву, при чему се провенијенције са подручја Србије јесно не диференцирају у односу на остале анализиране провенијенције.**

Средње вредности ширине листова, различитих провенијенција букве (mm), табела 3.12, показују да је највећи број провенијенција 2016. године имао средњу ширину листа у распону од 30 до 40 mm, однсоно 2017. године у распону од 35 до 50 mm.

Највеће средње вредности ширине листа, у обе посматране године, евидентиране су код хрватских провенијенција (24 и 25), док је немачка провенијенција број 48, 2017. године, била у групи провенијенција са највећим димензијама листова (дужином и ширином).

**Провенијенције из Србије се нису јасно диференцирале, према ширини листова, у односу на провенијенције из осталог дела ареала.**

**Табела 3.12.** Средње вредности ширине листова (mm), различитих провенијенција букве (2016. и 2017.)

| Распон варирања | Средње вредности ширине листова | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2016 | | 2017 | |
| 30-35 mm | DE47 | 32,41 | | |
| | DE49 | 33,58 | | |
| | RO64 | 33,78 | | |
| | SRB67 | 34,20 | | |
| | DE48 | 34,21 | | |
| | SRB66 | 34,26 | | |
| | SRB38 | 34,71 | | |
| | RO63 | 34,92 | | |
| 35-40 mm | AT56 | 35,05 | AT56 | 38,75 |
| | HU42 | 36,97 | CH65 | 39,94 |
| | BiH33 | 37,26 | BiH33 | 40,88 |
| | SRB69 | 38,90 | | |
| | BiH30 | 38,98 | | |
| | BiH32 | 39,49 | | |
| | HR25 | 39,65 | | |
| | HR24 | 39,96 | | |
| 40-45 mm | SRB36 | 41,14 | HU42 | 41,49 |
| | | | SRB38 | 41,53 |
| | | | BiH61 | 41,97 |
| | | | SRB36 | 42,22 |
| | | | BiH32 | 42,38 |
| | | | DE47 | 42,49 |
| | | | DE49 | 42,59 |
| | | | RO63 | 42,59 |
| | | | BiH60 | 42,68 |
| | | | RO64 | 42,96 |
| 45-50 mm | | | HR25 | 45,65 |
| | | | DE48 | 46,04 |
| | | | HR24 | 47,12 |

Према Јовановићу (1991), просечан број нерава на листу код европске букве креће се од 5 до 9, најчешће 8; код источне букве 7 до 14, најчешће 10-12, а код мезијске 5 до 12.

Према спроведеним истраживањима може се констатовати да се 2016. године просечан број нерава кретао од 6 до 8, при чему је код највећег броја провенијенција забележено просечно 7 нерава по листу (табела 3.13). У 2017-ој години, просечан број нерава код највећег броја провенијенција је био 7, док је један број провенијенција имао просечно 8 нерава по листу (табела 3.13).

**Може се закључити да све анализиране провенијенције имају просечан број нерава на листу који одговара литератутним подацима за европску букву, просечно 7, при чему се српске провенијенције јасно не диференцирају у односу на провенијенције из осталог дела ареала.**

**Табела 3.13.** Просечан број нерава на листовима различитих провенијенција букве (2016. и 2017.)

| Број нерава | Просечан број нерава | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2016 | | 2017 | |
| 6 | **DE47** | 6,42 | | |
| | **SR66** | 6,82 | | |
| | **AT56** | 6,86 | | |
| | **HU42** | 6,9 | | |
| 7 | **DE49** | 7,045 | **AT56** | 7,62 |
| | **RO64** | 7,165 | **DE49** | 7,635 |
| | **SR38** | 7,305 | **CH65** | 7,67 |
| | **DE48** | 7,33 | **BiH32** | 7,695 |
| | **BIH32** | 7,41 | **SR36** | 7,715 |
| | **HR25** | 7,42 | **RO60** | 7,81 |
| | **RO63** | 7,445 | **DE48** | 7,96 |
| | **SR69** | 7,475 | **SR38** | 7,96 |
| | **BiH33** | 7,475 | **BiH61** | 7,97 |
| | **HR24** | 7,55 | **HR24** | 7,985 |
| | **SR67** | 7,565 | | |
| | **SR36** | 7,775 | | |
| 8 | **BiH30** | 8,165 | **HU42** | 8,055 |
| | | | **RO64** | 8,07 |
| | | | **RO63** | 8,09 |
| | | | **DE47** | 8,1 |
| | | | **BiH33** | 8,145 |
| | | | **HR25** | 8,295 |

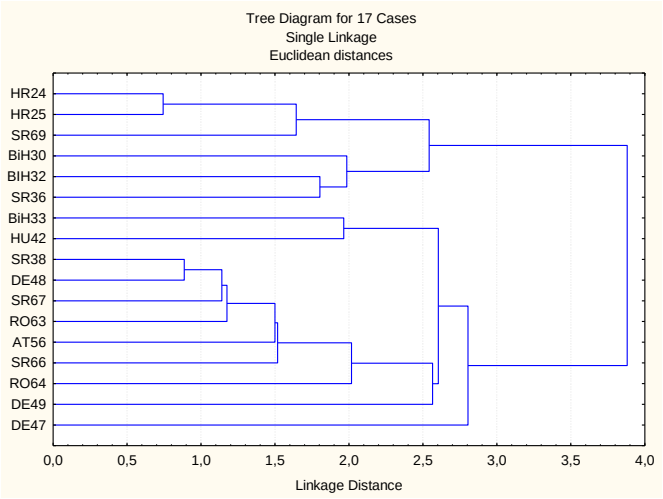
Приказани резултати јасно показују да су вредности димензија листова (дужине, и ширине), дужине петељке и просечног броја нерава по листу биле веће у 2017-ој години него у 2016-ој години. Ово се може објаснити различитим климатским условима, који су владали на подручју провенијеничног теста, у истраживаним годинама, при чему је 2017. година имала више сунчаних дана, а мање падавина, него 2016. година, која је била изразито влажна година. Стојнић (2011), наводи да су резултати добијени у његовој докторксој дисертацији потврдили најновија мишљења, да се код букве, у условима оптималне обезбеђености водом, лисна површина примарно повећава под утицајем повишене температуре ваздуха, што потврђују и резултати ових истраживања.

**На основу напред изнетог, намеће се закључак да је варијабилност морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција букве, на нивоу две истраживане године (2016. и 2017.), резултат интеракције генофонда самих провенијенција и климатских карактеристика које су владале у истраживаним годинама.**

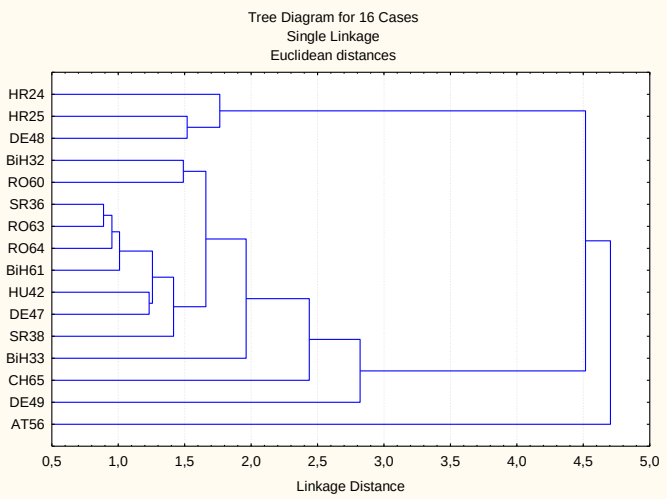
**Добијене вредности морфолошких карактеристика листова, на нивоу анализираних провенијенција, одговарају литературним подацима који се наводе за европску букву, док јасна диференцијација српских провенијенција, по било ком анализираном својству, у односу на провенијенције из осталог дела ареала није уочена.**

### 3.6. Генетичка диференцијација провенијенција букве

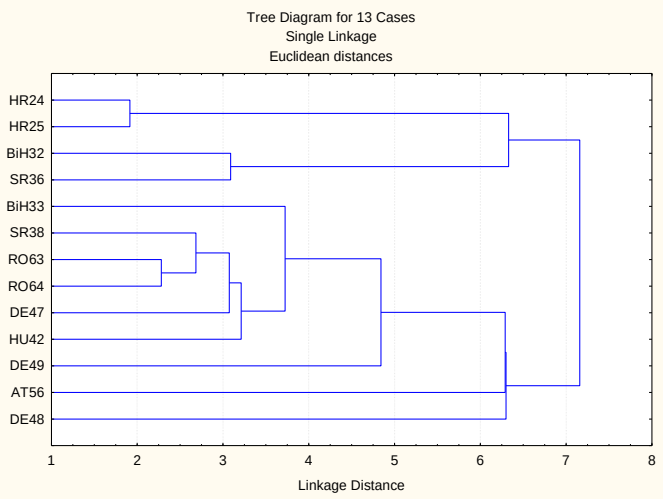
У циљу процене гентичке диференцијације између анализираних провенијенција, урађена је кластер анализа, на основу: морфолошких параметара листова, сакупљених 2016. године (графикон 3.1); морфолошких параметара листова, сакупљених 2017. године (графикон 3.2); морфолошких параметара листова, сакупљених 2016. и 2017. године (графикон 3.3) и на основу површина листова, сакупљених 2016. и 2017. године (графикон 3.4).



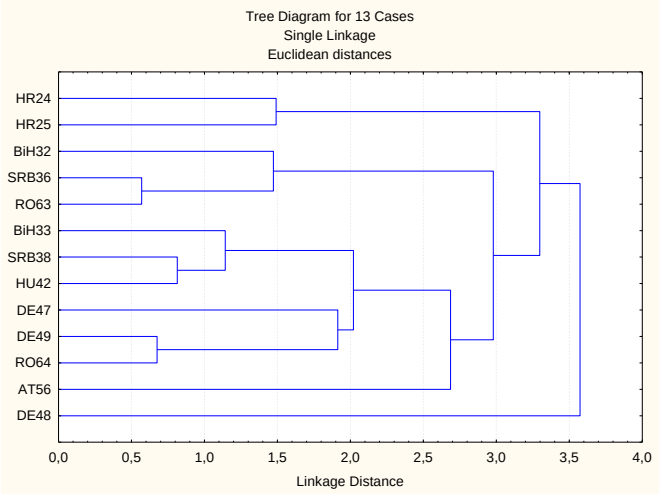

**Графикон 3.1.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу морфолошких параметара листова (2016.)




**Графикон 3.2.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу морфолошких параметара листова (2017)




**Графикон 3.3.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу морфолошких параметара листова (2016. и 2017.)




**Графикон 3.4.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу површина листова (2016. и 2017.)

Дендрограм Кластер анализе урађен на основу морфолошких параметара листова, сакупљених 2016. године показује да се анализиране провенијенције групишу на релативно малој дистанци (*Linkage Distance* до 4). Прву хомогену групу чине провенијенције из Хрватске (24 и 25), Србије (36 и 69) и Босне и Херцегоцине (30 и 32) групишући се на *Linkage Distance* 2,6. Другу хомогену групу чине следеће провенијенције: српска - Копаоник и немачка (48) које се групишу на најмањој генетичкој дистанци и чине једну подгрупу заједно са српским провенијенцијама (66 и 67), румунским (63 и 64), немачком (49) и аустијском (56). Овој подгрупи придружују се и босанска провенијенција 33, мађарска 42 и немачка 47.

**На основу резултата кластер анализе, може се констатовати да није дошло до груписања провенијенција из географски блиских подручја,** што је у складу са резултатима до којих су дошли Ballian i Zukić (2011) и Šijačić-Nikolić *et al.*, (2012), проучавајући морфолошке карактеристике у провенијеничним тестовима букве основаним 2007. године.

Иветић (2009), наводи да се на основу кластеровања природних популација букве, применом UPGMA анализе, не може уочити груписање популација по јасном географском обрзцу.

У досадашњим истраживањима адаптивних својстава букве, аутори су утврдили: **клинални образац генетичке варијабилности** букве у смеру северозапад-југоисток (von Wuehlisch *et al.*, 1995, Nielsen, Jorgensen, 2003, Gömöry *et al.*, 2007), или **екотипски карактер генетичке варијабилности** букве (Comps *et al.*,1991, Paule , 1995, Gömöry *et al.*, 1998, Chmura, Rozkowski, 2002, Jazbec *et al.*, 2007), као и присуство **просторне аутокорелације** (Ivetić, 2009).

У раду Шијачић-Николић *et al.* (2012), у коме су истраживаеа спровенеда на нивоу провенијеничног теста букве основаном на територији Наставне базе „Мајданпечка домена“ изнето је да добијени резултати говоре у прилог екотипској карактеризацији генетичке варијабилности провенијенција са територије југоисточне Европе. До сличних закључака дошли су и Ivanković *et al.* (2008/а, 2008/б, 2011), на основу истраживања висинског раста и фенологије листања истих провенијенција букве у јувенилној етапи развића, у провенијеничном тесту који је основан у Хрватској. Повезаност адаптивних својстава букве различитих провенијенција и еколошке карактеризације њихових материнских састојина, преко *Ellenberg*овог коефицијента, указује на генетску диференцијацију букве, као последице адаптације саме провенијенције на локалне услове средине.

Након истраживања фенолошке варијабилности 22 провенијенције обичне букве у међународном провенијеничном тесту код Какња (БиХ), која су спровели Ballian *et al.* (2015), закључује се да је обична буква генетички издиференцирана према еколошким и вегетацијским подручјима, те да показује различите морфолошке и физиолошке карактеристике из различитих провенијеничних подручја.

У прилог изнетом, говоре и резултати истраживања морфолошких карактеристика листова различитих провенијенција букве, сакупљених у две сукцесивне године 2016. и 2017., а спроведени у оквиру овог пројекта.

**На основу резултата ових истраживања, може се закључити да је присутан екотипски образац генетичечке варијабилности букве, који Ivanković** *et al***. (2011) дефинишу као „*образац генетичке варијабилности који није повезан са географским параметрима, већ макроклиматским специфичностима*“. Како се буква јавља на широком простору, који се карактерише различитим климатским и станишним условима, са правом се може говорити о великој пластичности врсте. У таквим условима, може се сматрати да је генетичка варијабилност обликована под утицајем различитих селекционих притисака, што је водило ка диференцијацији различитих екотипова букве (Стојнић, 2013). Може се претпоставити да је варијабилност између провенијенција повезана са климатским специфичностима станишта материнских популација и може се тумачити као резултат адаптаје провенијенције на разлике у температури ваздуха, влажности земљишта и друге услове животне средине.**

# 4. МОЛЕКУЛАРНО-ГЕНЕТИЧКЕ АНАЛИЗЕ РАЗЛИЧИТИХ ПРОВЕНИЈЕНЦИЈА БУКВЕ

У другој фази истраживања, молекуларно-генетичке анализе спроведене су на нивоу различитих провенијенција букве, које се налазе у оквиру провенијеничног теста који је основан у Наставној бази „Мајданпечка домена“ Шумарског факултета, Универзитета у Београду, на локалитету „Припор-фељешана“. Чињеница да се на једном локалитету, у оквиру провенијеничног теста, налази већи број различитих европских провенијенција, међу којима су и провенијенције из балканског дела ареала, искоришћена је за сакупљање полазног материјала за тестирање генетичке варијабилности букве.

У циљу дефинисања таксономског статуса букве у Србији, резултати молекуларно-генетичких анализа добијених на нивоу природних популација (фаза I) обједињени су и компарирани са резултатима молекуларно-генетичких анализа спроведених на нивоу различитих провенијенција букве (фаза II), што је послужило као основа за процену генетичке диференцијације анализираних популација/провенијенција.

За молекуларно-генетичке анализе коришћени су једарни микросателити који су коришћени и у првој фази истраживања за анализе индивдуа из природних популација са подручја Србије. Поред тога, у циљу повећања резолуције за извођење закључака о таксономском статусу букве у Србији, коришћени су и додатни молекуларни маркери и то додатни једарни микросателити, као и хлоропластни микросателити. Ови молекуларни маркери су тестирани, како код индивидуа са подручја Србије, тако и код индивидуа из европских провенијенција.

Анализом варијабилности нуклеарних и хлоропластних микросателита у испитиваним популацијама/провенијенцијама утврђени су параметри генетичког диверзитета и генетичке диференцијације, на основу којих су изведени закључци о таксономском статусу букве у Србији.

## 4.1. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Молекуларно-генетичка истраживања су спроведена у више фаза, које су обухватиле:

1. Одабир европских провенијенција букве за другу фазу молекуларно-генетичких анализа;
2. Сакупљање и припрема биљног материјала (листова);
3. Хомогенизација биљног материјала;
4. Екстракција тоталне геномске ДНК;
5. Провера приноса и квалитета ДНК изолата;
6. Одабир додатних нуклеарних и хлоропластних микросателита;
7. Паралелно умножавање једарних и хлоропластних микросателита ланчаном реакцијом полимеразе (*PCR - Polymerase Chain Reaction*);
8. Провера успешности PCR амплификације на агарозном гелу;
9. Утврђивање дужине продуката PCR амплификације (*scoring*);
10. Утврђивање нивоа генетичког диверзитета и генетичке диференцијације испитиваних популација букве.

Све наведене фазе су детаљно представљене у даљем тексту, а на основу добијених резултата је изведен закључак о таксономском статусу букве у Србији.

### 4.1.1. Одабир европских провенијенција букве за другу фазу молекуларно-генетичких анализа

Поред 13 природних популација букве из Србије, одабраних на: Фрушкој гори, Кукавици, Старој планини, Мирочу, Копаонику, Гочу, Сењском Руднику, Жагубици, Тари, Голији, Руднику, Јавору и Борањи. Поред наведених природних популација, за другу фазу молекуларно-генетичких анализа одабране су провенијенције букве, које се налазе у оквиру провенијеничног теста основаног у Наставној бази Шумарског факултета „Мајданпечка домена“. Одабрано је укупно 14 провенијенција из Хрватске (2), Босне и Херцеговине (4), Мађарске (1), Немачке (3), Аустрије (1), Румуније (2) и Швајцарске (1).

Истраживањима (у обе фазе истраживања) је обухваћено 328 индивидуа букве, од којих 192 индивидуе из 13 природних популација са подручја Србије и 136 индивидуа из 14 различитих провенијенција.

У табели 4.1 дат је преглед локалитета, броја узоркованих стабала по локалитету и типа сакупљеног материјала за изолацију ДНК (пупољци или листови).

**Табела 4.1.** Преглед локалитета, броја узоркованих индивидуа по локалитету и типа сакупљеног материјала за изолацију ДНК (пупољци или листови)

| Бр. | Земља порекла | Локалитет | Ознака провен. | Ознака попул. | Број индивидуа | Тип материјала | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Пупољци | Листови |
| 1 | Србија | Фрушка гора | | FG | 20 | | + |
| 2 | Србија | Кукавица | | KU | 20 | + | |
| 3 | Србија | Стара планина | | SP | 17 | | + |
| 4 | Србија | Мироч | | MC | 20 | | + |
| 5 | Србија | Копаоник | | KO | 20 | | + |
| 6 | Србија | Гоч | | GO | 18 | | + |
| 7 | Србија | Сењски Рудник | | SR | 20 | + | |
| 8 | Србија | Жагубица | | ZG | 20 | + | |
| 9 | Србија | Тара | | TR | 20 | + | |
| 10 | Србија | Голија | | GL | 20 | + | |
| 11 | Србија | Јавор | | JV | 20 | + | |
| 12 | Србија | Борања | | BR | 17 | + | |
| 13 | Србија | Рудник | | RU | 20 | + | |
| 14 | Босна и Херцеговина | Црни врх | 9632 | BCV | 10 | | + |
| 15 | Босна и Херцеговина | Грмеч | 9633 | BGR | 10 | | + |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16 | Хрватска | Диљ Цаглински | 9624 | HDI | 10 | | + |
| 17 | Хрватска | Варани камен | 9625 | HVA | 10 | | + |
| 18 | Мађарска | Valkonya | 9642 | MVK | 10 | | + |
| 19 | Немачка | Hoellbach | 9648 | NHL | 10 | | + |
| 20 | Немачка | Scwäbische Alb | 9647 | NSA | 10 | | + |
| 21 | Немачка | Hasburch | 9649 | NHA | 10 | | + |
| 22 | Аустрија | Scharnstein | 9656 | ASC | 10 | | + |
| 23 | Босна и Херцеговина | Тешањ | 9660 | BTE | 10 | | + |
| 24 | Босна и Херцеговина | Босанска Крупа | 9661 | BKU | 10 | | + |
| 25 | Румунија | Alesd | 9663 | RAL | 10 | | + |
| 26 | Румунија | Alka-Iulia | 9664 | RIU | 10 | | + |
| 27 | Швајцарска | Sihlwald | 9665 | SSI | 10 | | + |

### 4.1.2. Сакупљање и припрема биљног материјала

У циљу компаративне анализе природних популација из Србије и европских провенијенција, применом генетичких маркера, у јуну 2017. године обављено је сакупљање узорака - листова, одабраних провенијенција у оквиру провенијеничног теста. У оквиру одабраних провенијенција, селекционисано је по 10 тест стабала, репрезената провенијенције. Селекција је извршена на основу фенотипских карактеристика и општег здравственог стања. Са сваког стабла је сакупљено по 10 потпуно формираних здравих листова, који су хербаризовани.

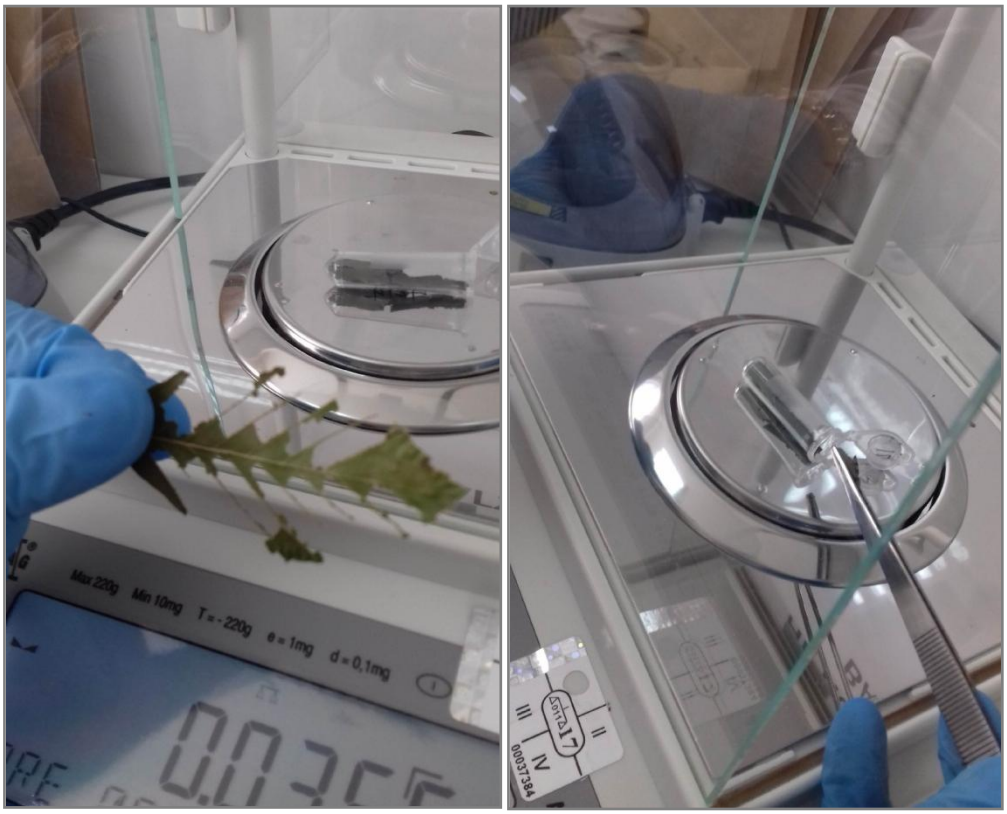
### 4.1.3. Хомогенизација биљног материјала

Око 30 mg биљног материјала (осушени делови лиске, слика 4.1) је уситњено (хомогенизовано) и коришћено за екстракцију тоталне геномске ДНК.

Уситњавање биљног материјала је обављено коришћењем апарата *TissueLyser* II (QIAGEN). Поступак је обухватао неколико корака:

1. Исушен биљни материјал је стављан помоћу стерилне пинцете у стерилне пластичне епендорф микроепрувете (*Eppendorf tubes*) са затварачем запремине 0,2 ml. У сваку епендорф микроепрувету стављено је 20-30 mg лисног ткива; биљни материјал је одмераван на анлитичкој ваги (RADWAG Wagl Elektroniczne, Poland), (слика 4.1);
2. У сваку епендорф микроепрувету је пинцетом убачена по једна стерилна метална куглица пречника 4 mm;
3. Затворене епендорф микроепрувете су смештене у адаптере са отворима за тубе (2 × 24 узорка) и стављене у замрзивач на хлађење до 30 min;
4. Адаптери са епендорф микроепруветама и биљним материјалом су постављени у металне носаче који су смештени у држаче апарата *TissueLyser* II.

Хомогенизација је вршена на 25 Hz у трајању од 2 min. Овај корак је поновљен два пута, уз окретање адаптера.




**Слика 4.1.** Припрема биљног материјала за хомогенизацију

Овим поступком добијен је уситњен (хомогенизован) биљни материјал који је стављен у замрзивач до момента екстракције тоталне геномске ДНК.

### 4.1.4. Екстракција тоталне геномске ДНК

Тотална геномска ДНК је из биљног материјала екстрахована коришћењем комерцијалног кита за ектракцију биљне ДНК- *peqGOLD Plant DNA Mini Kit* (PEQLAB) према протоколу произвођача.

Пре почетка екстракције извршена је припрема пуфера за испирање и то тако што је у пуфер *Wash Buffer* (40 ml) додато 60 ml чистог етанола.

Протокол за екстракцију ДНК је обухватао следеће кораке:

1. У сваку епендорф микроепрувету са уситњеним биљним материјалом је додато по 600 µl екстракционог пуфера *Lysis Buffer PL1* и 15 µl *RNase* A; епендорф микроепрувете су кратко промућкане на апарату *vortex* (10 секунди) и постављене у термоблок који је претходно загрејан на 65$^{o}$ C; биљни материјал је мешан инверзијом на сваких 10 min, а инкубација на 65$^{o}$ C је трајала 30 min;
2. Након инкубације је у сваки узорак додато по 150 µl пуфра *Lysis Buffer PL2*; епендорф микроепрувете су кратко промућкане на апарату *vortex* (5 секунди) и стављене у замрзивач у трајању од 5 min; епендорф микроепрувете са биљним

материјалом и пуфером су центрифугиране 5 min на 13200 обртаја у минути (*rpm*);

3. Након центрифугирања, 400-650 µl супернатанта је пребачено у тубе за сакупљање које имају префилтере; тубе са супернатантом су центрифугиране 1 min на 8000 *rpm*;
4. Након центрифугирања су одбачени префилтери а у колекционе тубе са течном фазом је додато по 0,5 волумена (325 µl) пуфера за везивање (*Binding Buffer*);
5. Око 600 µl добијеног раствора је пренесено у колекционе тубе са филером за везивање;
6. Тубе су центрифугиране 1 min на 8000 *rpm*;
7. Филтери са везаном ДНК су извађени из колекционих тубица и пребачени у нове колекционе тубе, а течни остатак је одбачен;
8. Кораци 5,6 и 7 су поновљени са остатком раствора ДНК који је пребачен у филтере са везаном ДНК;
9. Филтери са везаном ДНК су постављени у нове колекционе тубе, и у сваку тубу је додато по 700 µl пуфера за испирање (*Wash Buffer*); тубе су центрифугиране 1 min на 8000 *rpm*;
10. Корак 9 је поновљен;
11. Филтери са везаном ДНК су пребачени у нове колекционе тубе а течни садржај је одбачен; тубе су центрифугиране 2 min на 8000 *rpm*;
12. Филтери са везаном ДНК су пребачени у тубе од 1,5 ml;
13. У сваку тубу је додато по 100 µl елуиционог пуфера (*Elution Buffer*) и тубе су остављене отворене на собној температури у трајању од 2 min; тубе су центрифугиране 1 min на 6000 *rpm*;
14. Корак 13 је поновљен.

Раствори ДНК су пребачени у микроепрувете од 1,5 ml са силиконским затварачем и стављени у фрижидер ($4^{o}$ C).

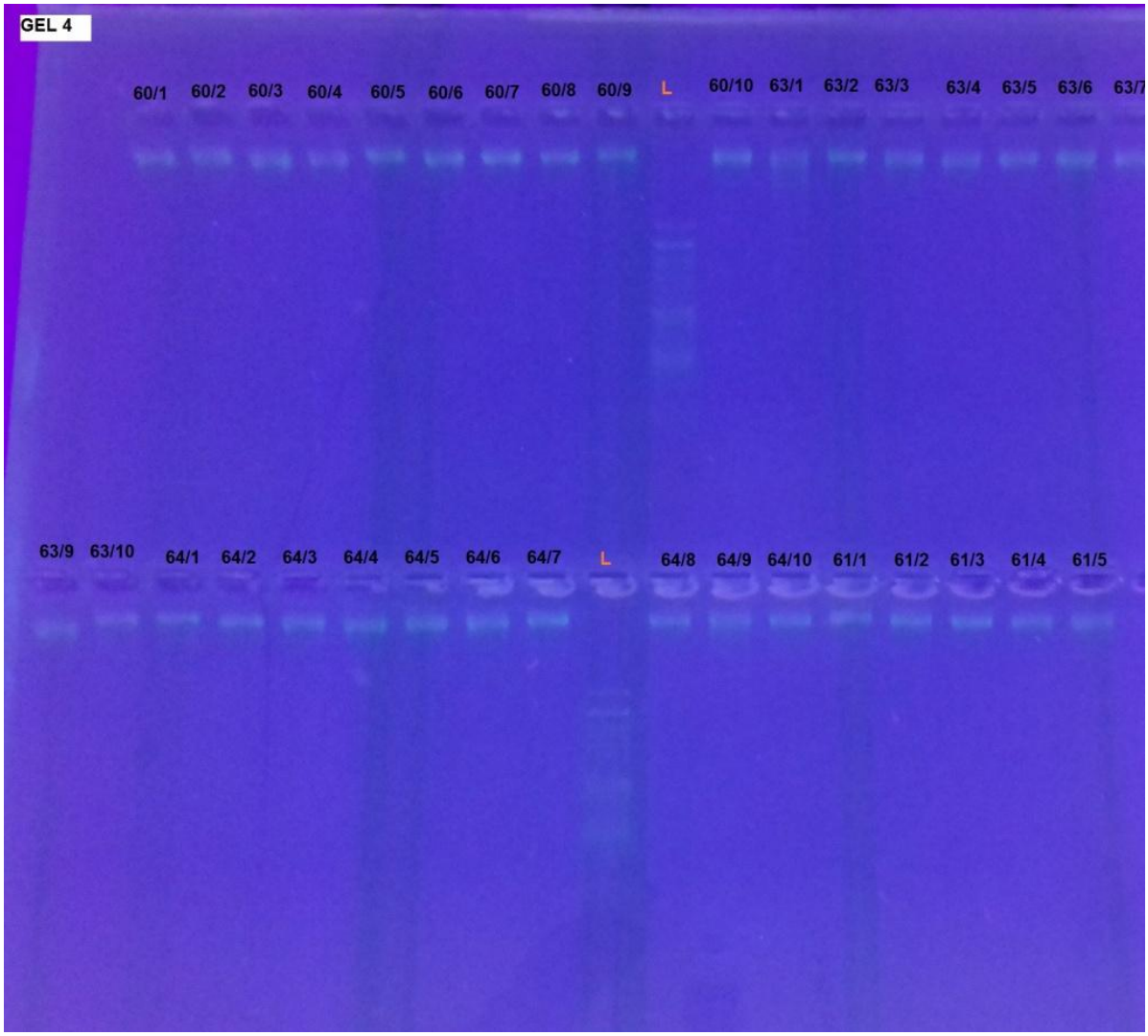
### 4.1.5. Провера приноса и квалитета ДНК изолата

Принос и квалитет ДНК изолата (тоталне геномске ДНК) је проверен електрофорезом на 1% агарозном гелу.

Агарозни гел је припремљен загревањем до кључања 1 gr агарозе растворене у 100 ml 1 × TBE (*Tris-Borate-EDTA*) пуфера. Бистри раствор је изливен у калуп за електрофорезу у који су постављени чешљеви, и остављен да се охлади и стврдне. Након тога је гел у калупу постављен у кадицу за електрофорезу напуњену 1 × TBE пуфером и извађени су чешљеви који су послужили за прављење бунарића у гелу.

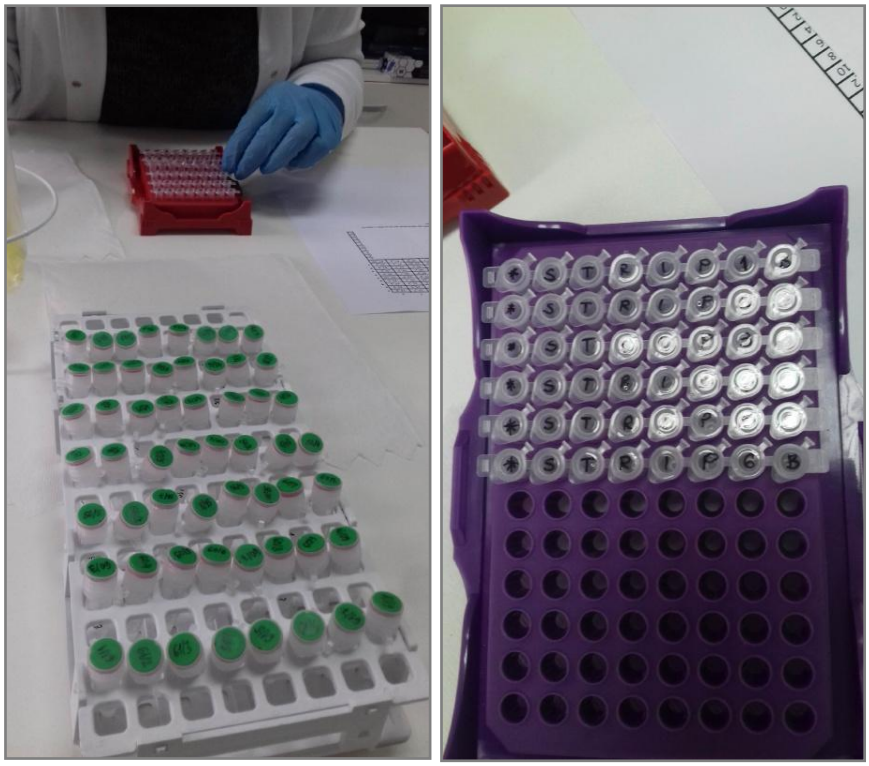
По 5 µl тоталне геномске ДНК је помешано са по 5 µl боје *Midory green* (Nippon Genetics Europe GmbH) која интеркалира са молекулом ДНК и омогућава његову визуелизацију под ултраљубичастим (УВ) светлом. ДНК помешана са бојом је нанесена у бунариће на гелу, након чега је кроз гел пропуштена струја јачине 10 mA. Током електрофорезе у трајању од 1-2 сата долази до миграције негативно наелектрисане ДНК у гелу, која се креће се ка позитивној електроди.

ДНК је визуализована под УВ светлом. Присуство јасних трака (*bend*-ова) на гелу (слика 4.2) је указало на то да је принос и квалитет ДНК добар код свих изолата, и да ДНК може бити коришћена за даљи рад.




**Слика 4.2.** ДНК изолати на агарозном гелу под ултраљубичастим осветљењем

С обзиром да је свих 140 ДНК изолата имало задовољавајући принос и квалитет, аликвотирано је по 20 µl тоталне геномске ДНК у стрипове који се састоје од 8 повезаних тубица са капицама запремине 0,2 ml, и на тај начин су припремљени радни изолати ДНК (слика 4.3). Шема ДНК изолата у стриповима је дата у табели 4.2.



**Слика 4.3.** Преношење ДНК изолата у стрипове

**Табела 4.2.** Шема ДНК изолата у стриповима

| Стрип бр. | Ознаке одабраних ДНК изолата | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | HDI_1 | HDI_2 | HDI_3 | HDI_4 | HDI_5 | HDI_6 | HDI_7 | HDI_8 |
| 2 | HDI_9 | HDI_10 | HVA_1 | HVA_2 | HVA_3 | HVA_4 | HVA_5 | HVA_6 |
| 3 | HVA_7 | HVA_8 | HVA_9 | HVA_10 | BCV_1 | BCV_2 | BCV_3 | BCV_4 |
| 4 | BCV_5 | BCV_6 | BCV_7 | BCV_8 | BCV_9 | BCV_10 | BGR_1 | BGR_2 |
| 5 | BGR_3 | BGR_4 | BGR_5 | BGR_6 | BGR_7 | BGR_8 | BGR_9 | BGR_10 |
| 8 | MVK_1 | MVK_2 | MVK_3 | MVK_4 | MVK_1 | MVK_2 | MVK_3 | MVK_4 |
| 9 | MVK_5 | MVK_6 | MVK_7 | MVK_8 | MVK_9 | MVK_10 | NSA_1 | NSA_2 |
| 10 | NSA_3 | NSA_4 | NSA_5 | NSA_6 | NSA_7 | NSA_8 | NSA_9 | NSA_10 |
| 11 | NHL_1 | NHL_2 | NHL_3 | NHL_4 | NHL_5 | NHL_6 | NHL_7 | NHL_8 |
| 12 | NHL_9 | NHL_10 | NHA_1 | NHA_2 | NHA_3 | NHA_4 | NHA_5 | NHA_6 |
| 13 | NHA_7 | NHA_8 | NHA_9 | NHA_10 | ASC_1 | ASC_2 | ASC_3 | ASC_4 |
| 14 | ASC_5 | ASC_6 | ASC_7 | ASC_8 | ASC_9 | ASC_10 | BTE_1 | BTE_2 |
| 15 | BTE_3 | BTE_4 | BTE_5 | BTE_6 | BTE_7 | BTE_8 | BTE_9 | BTE_10 |
| 16 | BKU_1 | BKU_2 | BKU_3 | BKU_4 | BKU_5 | BKU_6 | BKU_7 | BKU_8 |
| 17 | BKU_9 | BKU_10 | RAL_1 | RAL_2 | RAL_3 | RAL_4 | RAL_5 | RAL_6 |
| 18 | RAL_7 | RAL_8 | RAL_9 | RAL_10 | RIU_1 | RIU_2 | RIU_3 | RIU_4 |
| 19 | RIU_5 | RIU_6 | RIU_7 | RIU_8 | RIU_9 | RIU_10 | SSI_1 | SSI_2 |
| 20 | SSI_3 | SSI_4 | SSI_5 | SSI_6 | SSI_7 | SSI_8 | SSI_9 | SSI_10 |

### 4.1.6. Одабир додатних нуклеарних и хлоропластних микросателита

С обзиром да је током молекуларно-генетичких анализа фазе 1 показано да 11 од 12 коришћених нуклеарних микросателита аутора Tanaka *et al*. (1999), Pastorelli *et al*. (2003), Asuka *et al*. (2004), Lefèvre *et al*. (2012) и Pluess и Määttänen (2013) представља веома поуздане и информативне молекуларне маркере, свих 11 локуса је коришћено и у другој фази истраживања, односно, за умножавање код индивидуа букве из европских провенијенција (табела 4.3). Поред тога, у циљу повећања резолуције и поузданости података за извођење закључака о таксономском статусу букве у Србији, коришћени су и додатни молекуларни маркери, и то 4 једарна микросателита споменутих аутора и 6 хлоропласних микросателита аутора Sebastiani *et al*. (2004) и Weising и Gardner (1999) (табела 4.4) који су се показали као информативни у ранијим студијама (нпр., Gailing и Wuehlisch, 2004; Magri *et al*., 2006; Salehi Shanjani *et al*., 2010; Wortemann *et al*., 2011).

Као критеријуми за одабир додатних нуклеарних микросателита су коришћени: број алела по локусу публикован у различитим студијама, структура мотива (ди-нуклеотидни и три-нуклеотидни мотиви са савршеним поновцима), одсуство нултих алела и мултиплих продуката амплификације. Као критеријум за одабир хлоропластних микросателита, који углавном имају моно-нуклеотидне мотиве, коришћени су подаци о варијабилности локуса у ранијим студијама (нпр. Gailing и Wuehlisch, 2004; Magri *et al*., 2006; Salehi Shanjani *et al*., 2010; Wortemann *et al*., 2011).

**Табела 4.3.** Карактеристике раније коришћених једарних микросателита

| Редни број | Назив локуса | Секвенце прајмера (5'-3') (Forward/Reverse Primers) | Мотив поновка | Бр. алела | Дужина фр. (bp) | Референца | Боја |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | csolfagus_31 | F: TCTATTGACACAAGAATAAGAACACC<br>R: CTTGGCAAGAAAAGGGGATT | $(AG)_{12}$ | 9 | 104-126 | Lefèvre *et al*. (2012) | PET |
| 2. | Fagsyl_003994 | F: ACAAAGGAATCGTGGAGCTG<br>R: ACACATTCTGCCTCAAAGTACC | (GA) | 10 | 110-136 | Pluess and Määttänen (2013) | 6-FAM |
| 3. | Fagsyl_000905 | F: GATCATAGCGCCGGAATTGG<br>R: GGTCCTCCTCCTGGTACAAC | (TGT) | 5 | 146-168 | Pluess and Määttänen (2013) | VIC |
| 4. | csolfagus_19 | F: TGCCCATGAGGTTTGTATCA<br>R: GCCGAATAACCCAGAAAACA | $(TC)_{13}$ | 10 | 154-182 | Lefèvre *et al*. (2012) | NED |
| 5. | Fagsyl_003273 | F: GGATCCACCTGGCACTTTTG<br>R: TGCAATATTACCCTGGGCTG | (GT) | 6 | 185-191 | Pluess and Määttänen (2013) | PET |
| 6. | FS 4-46 | F: GCAGTCCTCCACCATTACTA<br>R: TACAACAGCAGGCTATCCAT | $(TGA)_{23}$ | 10 | 209-371 | Pastorelli *et al*. (2003) | 6-FAM |
| 7. | FS 1-03 | F: CACAGCTTGACACATTCCAAC<br>R: TGGTAAAGCACTTTTTCCCACT | $(GA)_{18}$ | 21 | 90-132 | Pastorelli *et al*. (2003) | VIC |
| 8. | FS 1-15 | F: TCAAACCCAGTAAATTTCTCA<br>R: GCCTCAATGAACTCAAAAAC | $(GA)_{26}$ | 11 | 105-149 | Pastorelli *et al*. (2003) | NED |
| 9. | sfc1063 | F: TTTCCAACTACAACTTCATTG<br>R: AGTGCTCGCATCGTATG | $(CT)_{13}$ | 15 | 188–222 | Asuka *et al*. (2004) | PET |
| 10. | DE576_A_0 | F: TCTCCTTAGATCCACAATCACA<br>R: AGCTCTTCATTGCTCAGAACG | $(CAA)_{10}$ | 7 | 211-232 | Lefèvre *et al*. (2012) | VIC |
| 11. | mfc5 | F: ACTGGGACAAAAAAACAAAA<br>R: GAAGGACCAAGGCACATAAA | $(AG)_{10}$ | 21 | 277-329 | Tanaka *et al*. (1999) | NED |

Листа једраних микросателитних локуса који су коришћени у фази 1 за умножавање код индивидуа букве са подручја Србије, њихове карактеристике као и секвенце прајмера за њихову амплификацију и аутори локуса су дати у табели 4.3. Сви наведени локуси су у фази 2 умножени и код индивидуа букве из европских провенијенција. Листа додатних нуклеарних микросателита као и хлоропластних микросателита који су коришћени у фази 2 за умножавање како код индивидуа букве са подручја Србије, тако и код индивидуа букве из европских провенијенција су дати у табели 4.4.

**Табела 4.4.** Карактеристике додатних једарних и хлоропластних микросателита

| Редни број | Назив локуса | Секвенце прајмера (5'-3') (Forward/Reverse Primers) | Мотив поновка | Бр. алела | Дужина фр. (bp) | Референца | Боја |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | sfc1143 | F - TGGCATCCTACTGTAATTTGAC<br>R - ATTCCACCCACCATCTGTC | $(AG)_{21}$ | 17 | 96–136 | Asuka *et al.* (2004) | PET |
| 2. | sfc0161 | F - AAGCTCCACGATTCATTC<br>R - GCTGGAGTTGCTCTAAGTC | $(AG)_{22}$ | 40 | 77–165 | Asuka *et al.* (2004) | NED |
| 3. | sfc0018 | F - GAAGCAGAGCATTGTATTGG<br>R - CATCTGTTTCAGTTCTGTAAAGG | $(AG)_{17}$ | 11 | 161–191 | Asuka *et al.* (2004) | PET |
| 4. | csolfagus_06 | F - GTTGTTGCTCACAGCAGTCG<br>R - ACGCTTGGTCTTCTTGCACT | $(AG)_{13}$ | 9 | 203-221 | Lefèvre *et al.* (2012) | 6-FAM |
| 5. | ccmp6 | F - CGATGCATATGTAGAAAGCC<br>R - CATTACGTGCGACTATCTCC | $(T)_5C(T)_{17}$ | - | 103 | Weising and Gardner (1999) | 6-FAM |
| 6. | ccmp10 | F - TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA<br>R - TTCGTCGDCGTAGTAAATAG | $(T)_{14}$ | - | 110-115 | Weising and Gardner (1999) | VIC |
| 7. | ccmp7 | F - CAACATATACCACTGTCAAG<br>R - ACATCATTATTGTATACTCTTTC | $(A)_{13}$ | - | 145-156 | Weising and Gardner (1999) | 6-FAM |
| 8. | cmcs3 | F - AGAGTAAGGTTTTATTAGTATAGA<br>R - CTCGATAGTATTTGTCGAT | $(AT)_7$ | 2 | 189 | Sebastiani et al. (2004) | NED |
| 9. | cmcs10 | F - CTTGCTCTTTGATTTTGAA<br>R - GACCGCGAGAGTTATTTATT | $(A)_9$ | 2 | 170 | Sebastiani et al. (2004) | VIC |
| 10. | cmcs12 | F - ATATTGGTAAAACGGCAACT<br>R - TTTATGGCATGAAACAACTC | $(A)_9$ | 2 | 226 | Sebastiani et al. (2004) | VIC |

### 4.1.7. Паралелно умножавање једарних и хлоропластних микросателита ланчаном реакцијом полимеразе (*PCR - Polymerase Chain Reaction*)

Умножавање одабраних микросателитских маркера код индивидуа букве је било обављено ланчаном реакцијом полимеразе (*Polymerase Chain Reaction – PCR*). У циљу што ефикаснијег умножавања, коришћен је комерцијални кит за паралелно умножавање више микросателитских локуса у једној реакцији - *Type-it Microsatellite PCR Kit* (QIAGEN). На тај начин је било могуће умножити до 6 микросателитских локуса у само једној реакцији, чиме је остварена вишеструка уштеда не само времена, већ и хемикалија за умножавање, као и уштеда за комерцијану детекцију продуката умножавања.

Иницијално је у фази 1 коришћено 12 једарних микросателита. Међутим, показано је да код локуса Fagsyl_007038 постоји неспецифична амплификација не једног већ више локуса тако да је овај локус избачен из даљих анализа. Са друге стране, иако је локус sfc1063 такође избачен анализа фазе 1 услед присуства нултих алела, он је укључен у анализе фазе 2. Стога је у фази 2 коришћено 11 локуса који су умножени код индивидуа букве из европских провенијенција на исти начин као и приликом умножавања код

индивидуа из популација са подручја Србије, односно, у фази 1. Локуси су за потребе паралелне генотипизације груписани у 2 микса (М), М1 и М2, и то тако да се у сваком миксу налазе локуси чији продукти умножавања имају очекиване дужине које се не преклапају или се преклапају у малој мери. Тако су у М1 ушли локуси: csolfagus_31, Fagsyl_003994, Fagsyl_000905, csolfagus_19, Fagsyl_003273 и FS 4-46, а у М2 локуси: FS 1-03, FS 1-15, sfc1063, DE576_A_0 и mfc5. Поред тога, директни (F) прајмери микросателитских локуса су обележени једном од 4 флуоресцентне боје из комерцијалног сета боја *Dye-set DS33* (Applied Biosystems) које обухватају боје: *6-FAM* (плава), *VIC* (зелена), *NED* (жута) и *PET* (црвена). У оквиру једног микса, иста боја је коришћена за обележавање прајмера који амплификују локусе чије се очекиване дужине продуката не преклапају. Флуоресцентне боје које су коришћене за обележавање одређених прајмера су дате у табелама 4.3 и 4.4. Свих 11 једарних микросателита из М1 и М2 су умножени код 160 индивидуа букве пореклом из европских провенијенција.

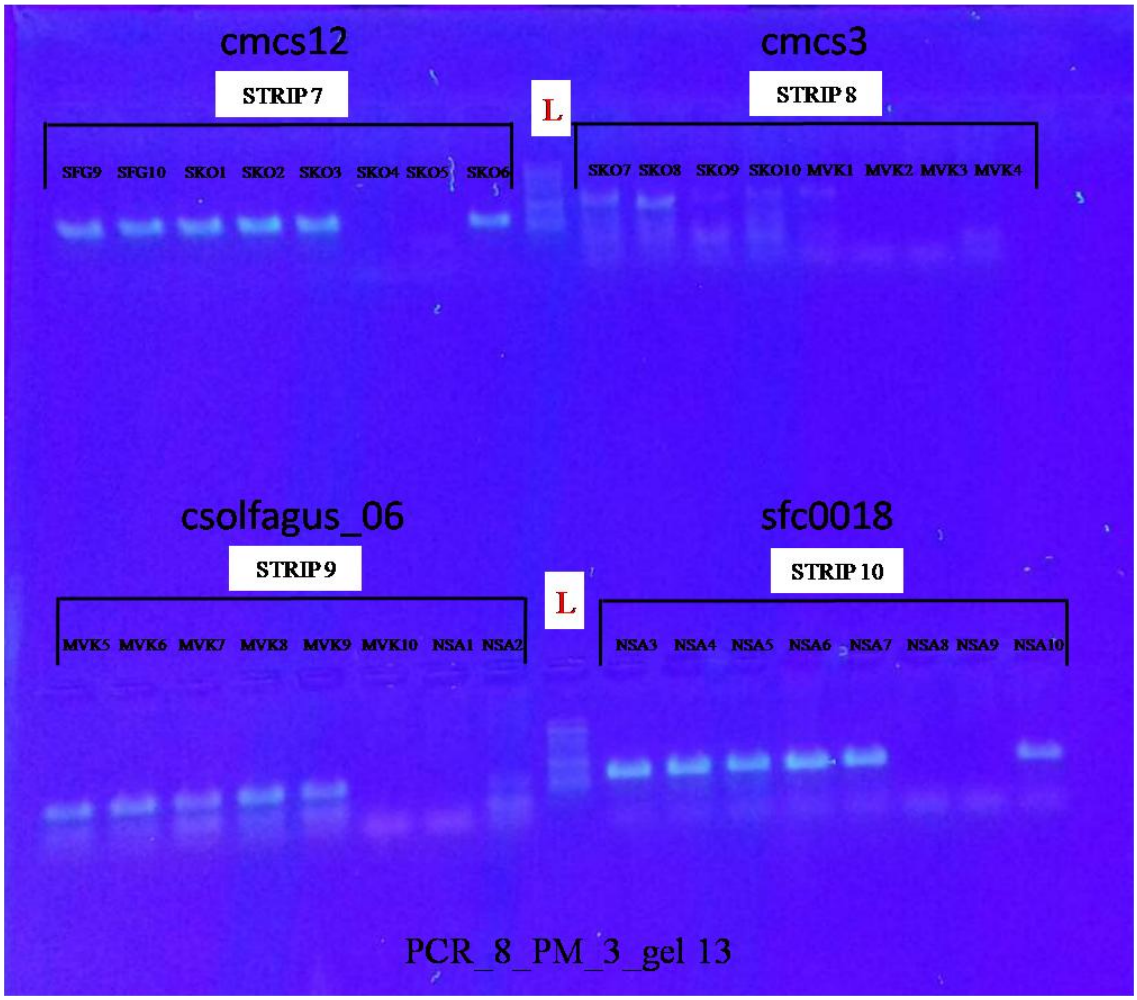
Одабрано је 4 додатна једарна микросателитна локуса који су ушли у микс 3: sfc1143, sfc0161, sfc0018 и csolfagus_06. И у случају М3, F прајмери микросателитских локуса су обележени једном од 4 флуоресцентне боје из комерцијалног сета боја *Dye-set DS33* (Applied Biosystems).

Одабрано је 6 хлоропластних микросателита за паралелно умножавање који су ушли у микс 4: ccmp6, ccmp10, ccmp7, cmcs10, cmcs3 и cmcs12 (табела 4.4). На основу очекиваних дужина продуката умножавања хлоропластних локуса, а у зависности од флуоресцентних боја које су коришћене за обележавање F прајмера додатних једарних микросателита, флуоресцентним бојама су обележени и F прајмери за умножавање хлоропластних микросателита, при чему је вођено рачуна о томе да се иста боја користи за обележавање прајмера који служе за умножавање локуса који имају различите дужине продуката умножавања.

Умножавање додатних јерадних микросателита и хлоропластних микросателита је најпре тестирано на панелу од 8 индивидуа (слика 4.4). Показано је да је успешност умножавања у случају јерадних локуса задовољавајућа на температури везивања прајмера од 60°C док је у случају хлоропластних микросателита оптимална температура везивања прајмера 57°C. Стога су додатни једарни хлоропластни микросателити даље умножавани у засебним реакцијама, односно, по различитим протоколима, а затим су продукти ампфикације за сваку индивидуу спојени и послати на капиларну електрофорезу. Поред тога, показано је да се неспецифични продукти амплификације јављају код 2 хлоропластна локуса, cmcs3 и cmcs10, тако да су ови локуси изостављени из даљих анализа.

Паралелно умножавање микросателитских локуса је обављено по протоколу који препоручује произвођач комерцијалног кита за амплификацију, а који се састоји од следећих корака:

1. Иницијална денатурација матрице, током које долази до раскидања водоничних веза два комплементарна ланца у ДНК молекулу при температури од 95°C у трајању од 5 min;
2. Умножавање локуса кроз 28 циклуса, при чему сваки циклу обухвата денатурацију при температури од 95°C у трајању од 30s, везивање прајмера за матрицу при температури од 60°C (једарни микросателити) или 57°C (хлоропластни микросателити) у трајању од 90s, и елонгацију на 72°C у трајању од 30s током које ДНК полимераза (*Taq* полимераза) додаје нуклеотиде на 3' крајеве прајмера;
3. Завршна елонгација на 60°C у трајању од 30 min.




**Слика 4.4.** Визуелизација продуката паралелног PCR умножавања додатних једарних и хлоропластних микросателита (L представља лествицу)

PCR реакције су обављане у стриповима у које је аликвотиран по 1 µl радних ДНК изолата, и у које је додато по 10 µl PCR смеше која је садржавала:

1. 6 µl *Type-it* кита
2. 2.8 µl воде
3. 1.2 µl прајмер-микса (ПМ), ПМ1 или ПМ2

ПМ1 је направљен тако што је по 1 µl F и R прајмера који умножавају сваки од 6 микросателитских локуса који улазе у састав овог микса помешан, и раствор је затим допуњен водом до запремине од 50 µl. ПМ2 и ПМ3 су направљени на исти начин као и ПМ1, али са прајмерима који умножавају локусе из микса 2, односно из микса 3, при чему је у случају локуса DE576_A_0 и mfc5 из ПМ2 повећана концентрација прајмера приликом прављења овог ПМ са 1 µl на 1,5 µl. На исти начин је направљен и ПМ4 у којем су прајмери који умножавају хлоропластне микросателите, а коришћено је по 1 µl F и R прајмера који умножавају локус ccmp6, по 1,5 µl F и R прајмера који умножавају локус ccmp10, по 2 µl F и R прајмера који умножавају локус ccmp7, и по 2,5 µl F и R прајмера који умножавају локус cmcs12.

PCR реакције су обављене коришћењем апарата *Multigene Opti Max* (Labnet International, Inc.).

### 4.1.8. Провера успешности PCR амплификације на агарозном гелу

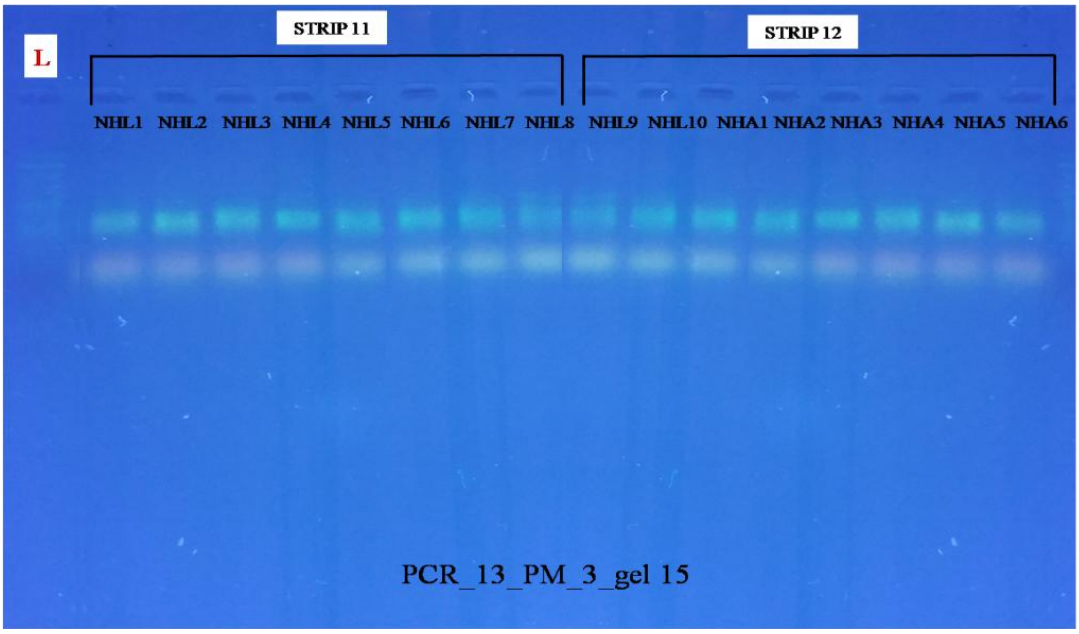
Успешност PCR реакција је утврђена сепарацијом продуката амплификације електрофорезом на 2% агарозном гелу. Приликом кретања продуката PCR амплификације кроз агарозни гел под дејтвом струје, краћи ДНК фрагменти се крећу много брже од дужих фрагмената. За утврђивање дужине PCR продуката је коришћена комерцијална лествица *O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific™), која садржи фрагменте тачно дефинисаних дужина са којима се пореде дужине продуката амплификације и утврђује њихова дужина.

Припрема агарозног гела је обављена на исти начин као што је описано у поглављу 4.5, с том разликом што је сада растворено 2 gr. агарозе у 100 ml 1 × TBE пуфера.

Након мешања по 5 µl PCR продуката са бојом *Midory green*, смеша је наношена у бунариће на агарозном гелу. У бунарић у средини гела је унета лествица.

Продукти амплификације су визуелизовани под УВ светлом (слика 4.5). У оквиру сваке траке је уочено више мањих трака, што је указивало на то да су сви или већина локуса успешно амплификовани у свакој PCR реакцији.

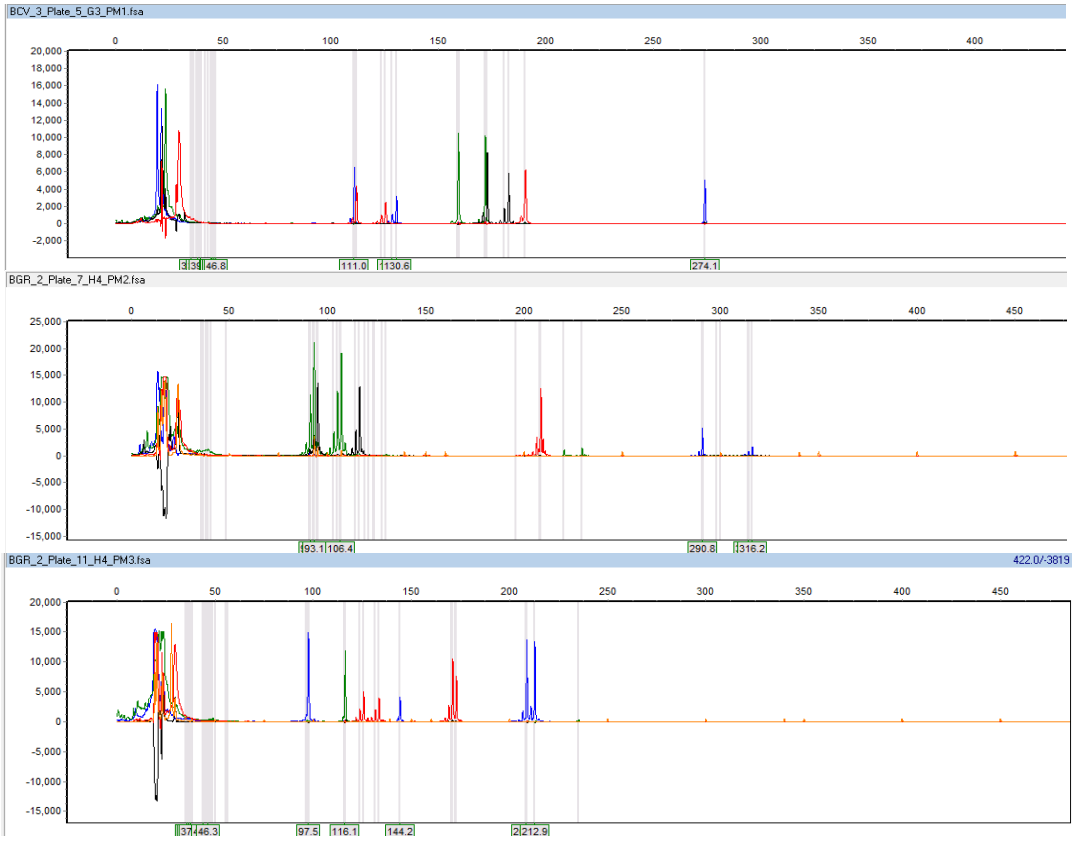
Стога су продукти амплификације послати у компанију Macrogen Korea (*Geumchen-gu, Seoul, Korea*, https://dna.macrogen.com/eng/member/login.jsp) која је комерцијално, применом методе капиларне електрофорезе, утврдила тачне дужине продуката PCR амплификације. Капиларна електрофореза је обављена коришћењем 96-капиларног 3730xl ДНК аутоматског секвенцера, а као лествица је коришћена флуоресцентна боја LIZ 500 (*Applied Biosystems*).




**Слика 4.5.** Визуелизација продуката паралелног PCR умножавања локуса из микса 3 на агарозном гелу (L представља лествицу)

### 4.1.9. Утврђивање дужине продуката PCR амплификације (*scoring*)

Компанија *Macrogen Korea* је доставила електроферограме (слика 4.6), и сваки електроферограм је садржао информације о дужини продуката PCR амплификације микросателитских локуса, чије дужине су очитане коришћењем програмског пакета *GeneMapper* (*Applied Biosystems*).

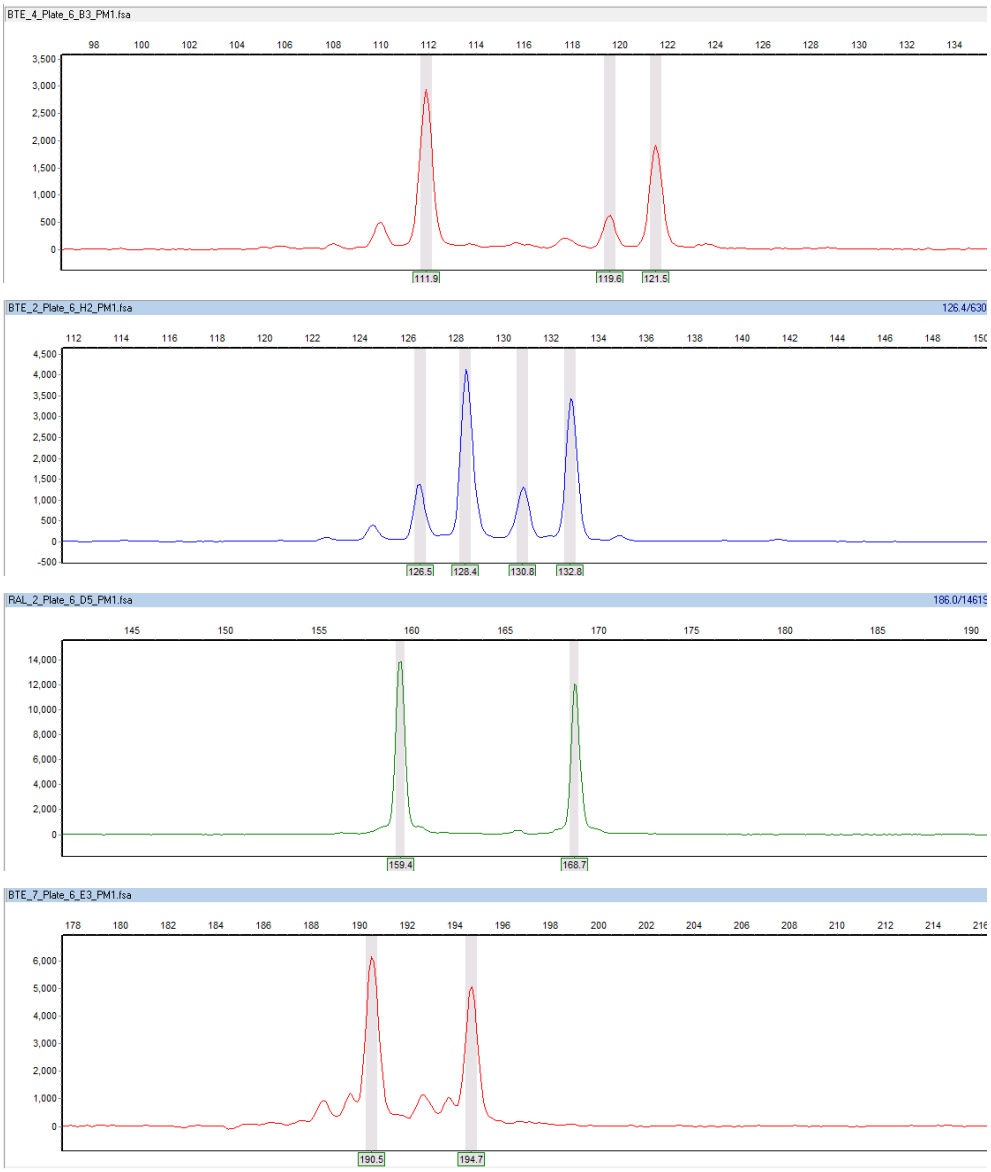


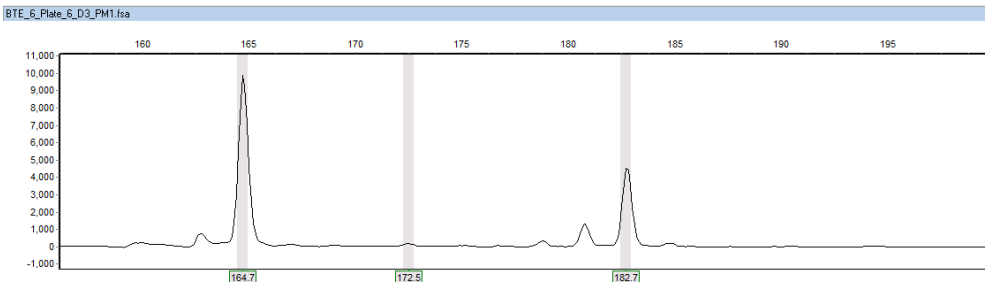

**Слика 4.6.** Електроферограми на којима се виде дужине продуката PCR амплификације микросателитских локуса из микса 1 (први електроферограм), микса 2 (други електроферограм) и миксева 3 и 4 који су спојени (трећи електроферограм)

Након прегледа свих електроферограма, утврђено је да је 14 од 15 једарних локуса успешно амплификовано код скоро свих индивидуа, код којих је детектован 1 алел по локусу код хомозиготних индивидуа или 2 алела по локусу код хетерозиготних индивидуа, што је очекивано код диплоидних организама, као што је буква. Међутим, амплификација локуса sfc0161 је била неуспешна код свих индивидуа док је у случају локуса и FS 4-46, који је коришћен у фази 1, уочено да се код већег броја индивидуа из европских провенијенција јавља неспецифична амплификација. Стога су локуси sfc0161 и FS 4-46 искључени из даљих анализа. Као што је већ напоменуто, хлоропластни локуси cmcs3 и cmcs10 су избачени из анализа већ у фази тестирања успешности амплификације, док су преостала 4 хлоропластна локуса успешно амплификована код 60% индивидуа. Поред тога, није било могуће очитати комплетне електроферограме код 4 индивидуе, свака из по једне европске провенијенције, тако да су индивидуе MVK5, NHL7, NSA1 и BTE9 изостављене из анализа.

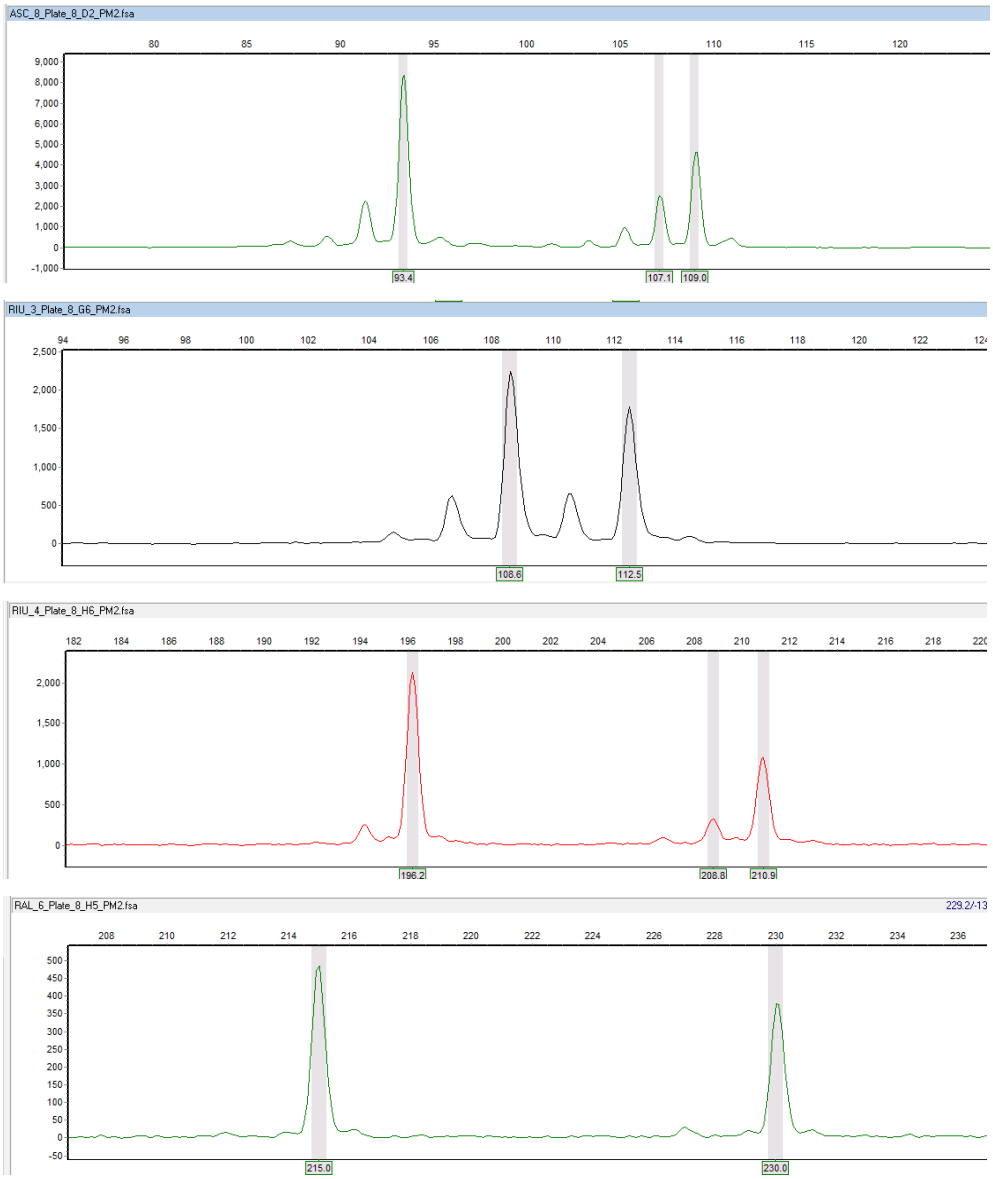
Стога је укупан број аналзираних индивидуа букве износио 328, при чему је број индивидуа из популација са подручја Србије 192, а број индивидуа из европских провенијенција 136. Укупан број једарних микросателита који су коришћени за даље анализе је био 13, а укупан број хлоропластних микросателита 4.

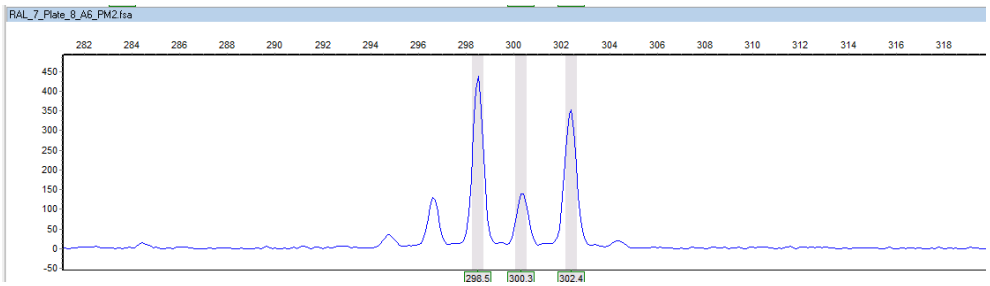
На сликама 4.7, 4.8 и 4.9 су приказане дужине продуката PCR амплификације 5 једарних микросателитских локуса из микса 1 (слика 4.7), 5 једарних микросателитских локуса из микса 2 (слика 4.8), 3 једарна микросателитска локуса из микса 3 (слика 4.9) и 4 хлоропластна микросателитска локуса из микса 4 (слика 4.9). На сликама су приказане дужине продуката PCR амплификације датих локуса код код одабраних индивидуа букве из европских провенијенција.



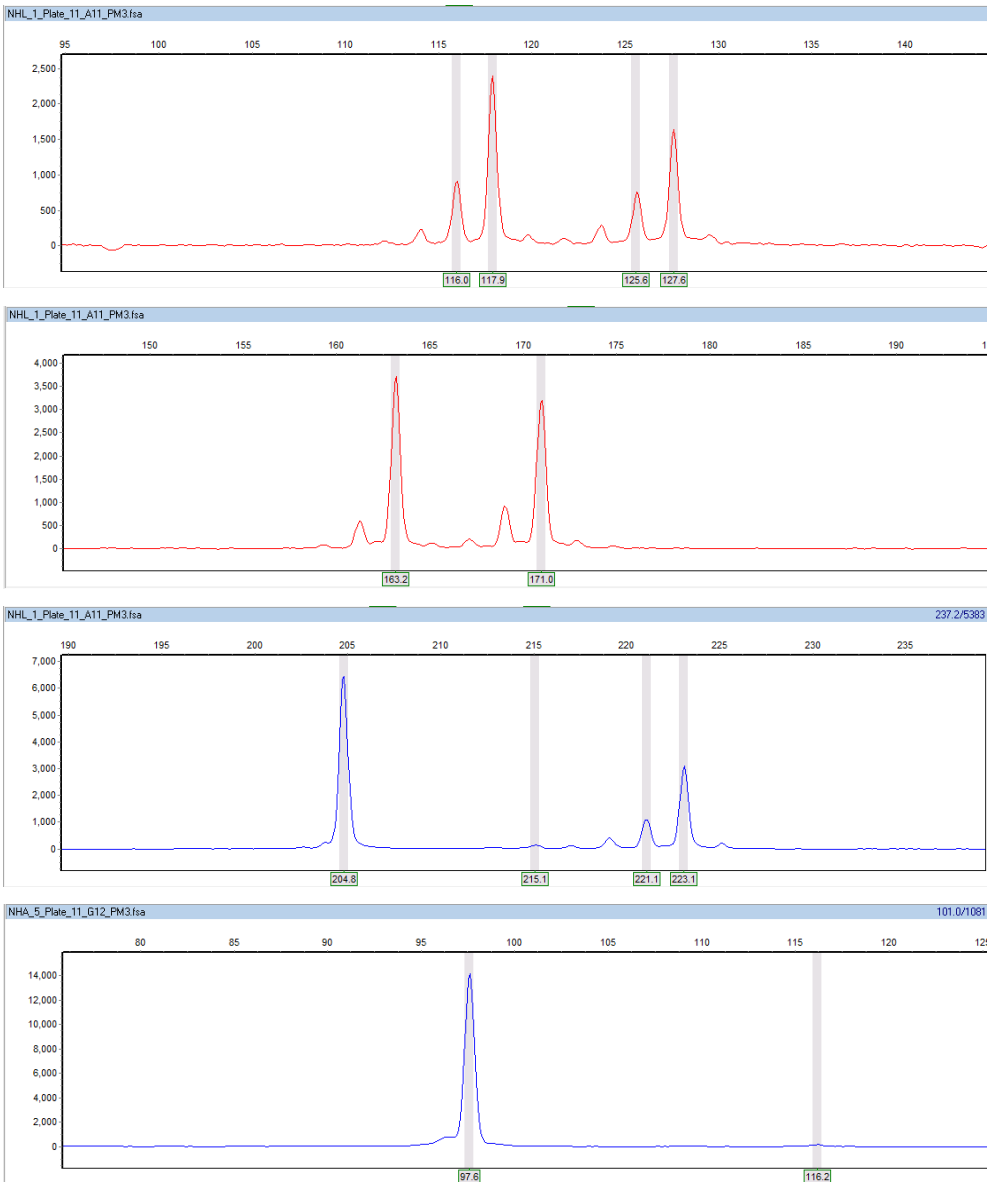


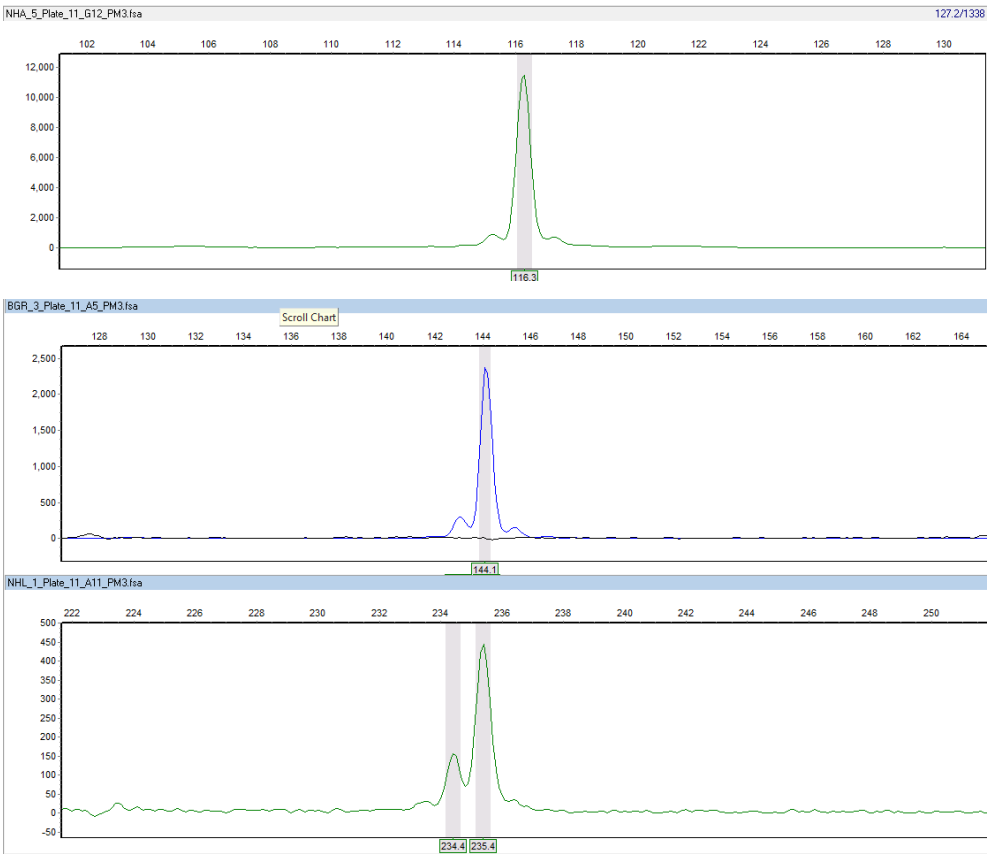

**Слика 4.7.** Дужине продуката PCR амплификације 5 микросателитских локуса из микса 1 код одабраних индивидуа букве из европских провенијенција (локуси: csolfagus_31, Fagsyl_003994, Fagsyl_000905, csolfagus_19 и Fagsyl_003273, респективно)






**Слика 4.8.** Дужине продуката PCR амплификације 5 микросателитских локуса из микса 2 код одабраних индивидуа букве (локуси: FS 1-03, FS 1-15, sfc1063, DE576_A_0 и mfc5, респективно)






**Слика 4.9.** Дужине продуката PCR амплификације 3 једарна микросателитских локуса из микса 3 код одабраних индивидуа букве (локуси: sfc1143, sfc0018 и csolfagus_06, респективно) и 4 хлоропластна микросателитска локуса из микса 4 код одабраних индивидуа букве (локуси: ccmp6, ccmp10, ccmp7 и cmcs12, респективно)

## 4.2. Резултати - утврђивање нивоа генетичког диверзитета и генетичке диференцијације провенијенција букве

Генерисани подаци су обрађени коришћењем бесплатних програмских пакета који се обично користе у популационо-генетичким студијама.

### 4.2.1. Карактеристике микросателитских локуса коришћених и истраживању

Коришћењен програмског пакета MicroChecker (Van Oosterhout et al. 2004) испитано је присуство нултих алела, грешака које се могу јавити током генотипизације услед присуства *stutter* бендова као и доминације кратких алела (*large allele dropout*) за једарне микросателите. Грешке током генотипизације услед присуства *stutter* бендова и доминације кратких алела нису детектоване ни код једног локуса, док је присуство нултих алела детектовано код локуса sfc1063 у 22 од 27 анализираних популација/провенијенција. Стога је локус sfc1063 искључен из даљих анализа. Присуство нултих алела је такође детектовано код локуса csolfagus_31, FS 1-15, Fagsyl_000905 и DE576_A_0 у по једној популацији, и локуса mfc5 у 8 популација. Међутим, ови локуси су коришћени за даље анализе.

Након умножавања 4 хлоропластна микросателита код 328 индивидуа букве утврђено је да су локуси ccmp6, ccmp7 и ccmp10 мономорфни, док је код локуса cmcs12 уочен један доминантан алел и један мало фреквентан алел који је детектован само у популацији Рудник. Имајући у виду да реакције умножавања хлоропластних микросателита нису биле успешене код свих индивидуа, за извођење закључака о генетичкој диференцијацији популација букве на нивоу хлоропластног генома потребно је урадити додатне анализе. У овом моменту је једино могуће констатовати да се популација Рудник највероватније одликује другачијим генетичким профилом на нивоу хлоропластног генома, у односу на све остале испитиване популације.

### 4.2.2. Процена одступања дистрибуције фреквенци генотипова од очекивања према Харди-Вајнберговој равнотежи и неравнотежа везаности између парова једарних микросателитских локуса

Коришћењем програмских пакета Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005) и GenAlEx 6.5 (Peakall и Smouse, 2006) утврђено одступање дистрибуције фреквенци генотипова од очекивања према Харди-Вајнберговој-овој равнотежи (*Hardy-Weinberg equilibrium* - HWE) које је изражено путем параметра F, као и неравнотежа везаности (*linkage disequilibrium*) између свих парова једарних микросателитских локуса по популацијама.

Статистички значајно одступање дистрибуције фреквенци генотипова од очекивања према Харди-Вајнберговој - овој равнотежи, односно, статистички значајно одступање очекиване хетерозиготности ($H_E$) од добијене хетерозиготности ($H_O$) је уочено код 3 од 13 природних популација при чему је у популацијама Јавор и Жагубица присутан статистички значајан вишак хомозигота а у популацији Борања статистички значајан вишак хетерозигота (табеле 4.5 и 4.6).

**Табела 4.5.** Параметри генетичког диверзитета и индекси фиксације код популација букве са подручја Србије

| | Pop | FG | KU | SP | MC | KO | GO | SR | ZG | TR | GL | JV | BR | RU |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | 15 | 9 | 16 | 15 | 15 | 15 | 16 | 13 | 16 | 16 | 16 | 14 | 16 |
| csolfagus_06 | A | 7 | 5 | 9 | 9 | 7 | 9 | 8 | 8 | 7 | 9 | 7 | 8 | 7 |
| | Ae | 5.056 | 3.375 | 6.024 | 6.429 | 5.114 | 5.172 | 4.327 | 4.630 | 6.400 | 6.818 | 5.233 | 5.541 | 5.069 |
| | $H_O$ | 0.867 | 0.778 | 1.000 | 0.800 | 0.800 | 0.867 | 0.800 | 0.846 | 0.938 | 0.933 | 0.867 | 0.923 | 0.688 |
| | $H_E$ | 0.802 | 0.704 | 0.834 | 0.844 | 0.804 | 0.807 | 0.769 | 0.784 | 0.844 | 0.853 | 0.809 | 0.820 | 0.803 |
| | F | -0.080 | -0.105 | -0.199 | 0.053 | 0.006 | -0.074 | -0.040 | -0.079 | -0.111 | -0.094 | -0.071 | -0.126 | 0.144 |
| csolfagus_19 | A | 8 | 7 | 7 | 8 | 7 | 9 | 9 | 9 | 8 | 7 | 9 | 9 | 8 |
| | Ae | 5.921 | 2.893 | 2.586 | 5.357 | 3.689 | 3.061 | 6.169 | 5.121 | 3.103 | 4.923 | 6.919 | 5.026 | 4.303 |
| | $H_O$ | 0.733 | 0.556 | 0.688 | 0.800 | 0.733 | 0.667 | 0.750 | 0.615 | 0.688 | 0.875 | 0.750 | 0.929 | 0.688 |
| | $H_E$ | 0.831 | 0.654 | 0.613 | 0.813 | 0.729 | 0.673 | 0.838 | 0.805 | 0.678 | 0.797 | 0.855 | 0.801 | 0.768 |
| | F | 0.118 | 0.151 | -0.121 | 0.016 | -0.006 | 0.010 | 0.105 | 0.235 | -0.014 | -0.098 | 0.123 | -0.159 | 0.104 |
| csolfagus_31 | A | 7 | 7 | 10 | 9 | 9 | 9 | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 10 | 9 |
| | Ae | 5.921 | 4.500 | 6.481 | 5.488 | 6.522 | 5.233 | 5.278 | 4.630 | 6.827 | 7.314 | 5.565 | 6.222 | 5.505 |
| | $H_O$ | 0.867 | 0.778 | 0.750 | 0.800 | 0.800 | 0.867 | 0.750 | 0.846 | 1.000 | 0.938 | 0.750 | 0.929 | 0.688 |
| | $H_E$ | 0.831 | 0.778 | 0.846 | 0.818 | 0.847 | 0.809 | 0.811 | 0.784 | 0.854 | 0.863 | 0.820 | 0.839 | 0.818 |
| | F | -0.043 | 0.000 | 0.113 | 0.022 | 0.055 | -0.071 | 0.075 | -0.079 | -0.172 | -0.086 | 0.086 | -0.106 | 0.160 |
| Fagsyl_003273 | A | 2 | 2 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 |
| | Ae | 1.965 | 2.000 | 2.160 | 1.515 | 2.153 | 2.174 | 2.522 | 1.943 | 1.910 | 2.960 | 2.381 | 2.253 | 2.547 |
| | $H_O$ | 0.600 | 0.556 | 0.688 | 0.400 | 0.600 | 0.667 | 0.813 | 0.308 | 0.500 | 0.688 | 0.438 | 0.643 | 0.688 |
| | $H_E$ | 0.491 | 0.500 | 0.537 | 0.340 | 0.536 | 0.540 | 0.604 | 0.485 | 0.477 | 0.662 | 0.580 | 0.556 | 0.607 |
| | F | -0.222 | -0.111 | -0.280 | -0.176 | -0.120 | -0.235 | -0.346 | 0.366 | -0.049 | -0.038 | 0.246 | -0.156 | -0.132 |
| Fagsyl_003994 | A | 5 | 7 | 9 | 14 | 8 | 8 | 8 | 7 | 7 | 9 | 9 | 8 | 8 |
| | Ae | 3.814 | 5.400 | 5.278 | 10.465 | 5.556 | 3.383 | 4.571 | 4.971 | 4.923 | 4.697 | 5.069 | 5.765 | 4.655 |
| | $H_O$ | 0.800 | 1.000 | 0.688 | 1.000 | 0.867 | 0.667 | 0.688 | 0.692 | 0.813 | 0.750 | 0.750 | 0.786 | 0.750 |
| | $H_E$ | 0.738 | 0.815 | 0.811 | 0.904 | 0.820 | 0.704 | 0.781 | 0.799 | 0.797 | 0.787 | 0.803 | 0.827 | 0.785 |
| | F | -0.084 | -0.227 | 0.152 | -0.106 | -0.057 | 0.054 | 0.120 | 0.133 | -0.020 | 0.047 | 0.066 | 0.049 | 0.045 |
| FS1-03 | A | 10 | 6 | 9 | 10 | 9 | 6 | 14 | 10 | 10 | 13 | 10 | 9 | 9 |
| | Ae | 3.516 | 3.115 | 3.580 | 5.114 | 3.285 | 1.940 | 9.309 | 6.500 | 3.346 | 5.333 | 5.626 | 3.111 | 3.103 |
| | $H_O$ | 0.867 | 0.556 | 0.688 | 0.800 | 0.733 | 0.400 | 1.000 | 0.846 | 0.688 | 0.813 | 0.938 | 0.714 | 0.688 |
| | $H_E$ | 0.716 | 0.679 | 0.721 | 0.804 | 0.696 | 0.484 | 0.893 | 0.846 | 0.701 | 0.813 | 0.822 | 0.679 | 0.678 |
| | F | -0.211 | 0.182 | 0.046 | 0.006 | -0.054 | 0.174 | -0.120 | 0.000 | 0.019 | 0.000 | -0.140 | -0.053 | -0.014 |
| FS1-15 | A | 8 | 7 | 9 | 13 | 8 | 12 | 10 | 8 | 9 | 10 | 10 | 8 | 8 |
| | Ae | 5.357 | 3.951 | 5.626 | 10.227 | 3.333 | 5.357 | 8.127 | 6.500 | 4.376 | 7.627 | 7.529 | 5.370 | 6.169 |
| | $H_O$ | 0.667 | 0.667 | 0.750 | 1.000 | 0.600 | 0.733 | 0.875 | 0.692 | 0.688 | 0.933 | 0.750 | 0.857 | 0.875 |
| | $H_E$ | 0.813 | 0.747 | 0.822 | 0.902 | 0.700 | 0.813 | 0.877 | 0.846 | 0.771 | 0.869 | 0.867 | 0.814 | 0.838 |
| | F | 0.180 | 0.107 | 0.088 | -0.108 | 0.143 | 0.098 | 0.002 | 0.182 | 0.109 | -0.074 | 0.135 | -0.053 | -0.044 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| sfc0018 | A | 7 | 8 | 9 | 9 | 8 | 9 | 8 | 9 | 9 | 6 | 8 | 8 | 7 |
| | Ae | 4.592 | 3.951 | 2.653 | 5.357 | 4.639 | 3.414 | 3.368 | 2.793 | 5.565 | 3.012 | 3.629 | 2.024 | 2.500 |
| | $H_O$ | 0.400 | 0.667 | 0.563 | 0.733 | 0.667 | 0.385 | 0.688 | 0.692 | 0.813 | 0.625 | 0.667 | 0.538 | 0.533 |
| | $H_E$ | 0.782 | 0.747 | 0.623 | 0.813 | 0.784 | 0.707 | 0.703 | 0.642 | 0.820 | 0.668 | 0.724 | 0.506 | 0.600 |
| | F | 0.489 | 0.107 | 0.097 | 0.098 | 0.150 | 0.456 | 0.022 | -0.078 | 0.010 | 0.064 | 0.080 | -0.064 | 0.111 |
| sfc1143 | A | 8 | 7 | 9 | 9 | 9 | 8 | 9 | 8 | 6 | 11 | 10 | 8 | 9 |
| | Ae | 5.921 | 4.500 | 5.447 | 5.422 | 5.696 | 6.759 | 5.696 | 5.930 | 3.507 | 7.758 | 5.626 | 3.380 | 6.338 |
| | $H_O$ | 0.800 | 1.000 | 0.750 | 0.800 | 0.867 | 0.929 | 0.867 | 0.846 | 0.625 | 0.875 | 0.750 | 0.846 | 0.933 |
| | $H_E$ | 0.831 | 0.778 | 0.816 | 0.816 | 0.824 | 0.852 | 0.824 | 0.831 | 0.715 | 0.871 | 0.822 | 0.704 | 0.842 |
| | F | 0.037 | -0.286 | 0.081 | 0.019 | -0.051 | -0.090 | -0.051 | -0.018 | 0.126 | -0.004 | 0.088 | -0.202 | -0.108 |
| mfc5 | A | 10 | 10 | 11 | 10 | 13 | 13 | 15 | 12 | 11 | 14 | 13 | 10 | 9 |
| | Ae | 5.921 | 7.364 | 6.244 | 7.258 | 10.595 | 9.375 | 8.127 | 7.511 | 5.953 | 9.481 | 7.314 | 5.765 | 6.737 |
| | $H_O$ | 0.667 | 0.889 | 0.938 | 0.733 | 0.714 | 0.533 | 0.875 | 0.692 | 0.750 | 0.813 | 0.563 | 0.714 | 0.438 |
| | $H_E$ | 0.831 | 0.864 | 0.840 | 0.862 | 0.906 | 0.893 | 0.877 | 0.867 | 0.832 | 0.895 | 0.863 | 0.827 | 0.852 |
| | F | 0.198 | -0.029 | -0.116 | 0.149 | 0.211 | 0.403 | 0.002 | 0.201 | 0.099 | 0.092 | 0.348 | 0.136 | 0.486 |
| Fagsyl_000905 | A | 4 | 5 | 4 | 5 | 6 | 5 | 5 | 5 | 3 | 5 | 4 | 4 | 4 |
| | Ae | 1.724 | 2.104 | 1.712 | 3.020 | 2.296 | 3.061 | 3.141 | 3.073 | 1.575 | 3.160 | 1.822 | 2.010 | 2.960 |
| | $H_O$ | 0.533 | 0.556 | 0.375 | 0.667 | 0.667 | 0.800 | 0.750 | 0.769 | 0.438 | 0.563 | 0.438 | 0.357 | 0.813 |
| | $H_E$ | 0.420 | 0.525 | 0.416 | 0.669 | 0.564 | 0.673 | 0.682 | 0.675 | 0.365 | 0.684 | 0.451 | 0.503 | 0.662 |
| | F | -0.270 | -0.059 | 0.099 | 0.003 | -0.181 | -0.188 | -0.100 | -0.140 | -0.198 | 0.177 | 0.030 | 0.289 | -0.227 |
| DE576_A_0 | A | 3 | 4 | 5 | 5 | 7 | 6 | 5 | 4 | 6 | 5 | 6 | 6 | 5 |
| | Ae | 2.571 | 3.447 | 2.626 | 4.245 | 4.639 | 3.488 | 2.462 | 3.634 | 4.491 | 3.220 | 4.531 | 2.970 | 4.571 |
| | $H_O$ | 0.533 | 0.778 | 0.688 | 0.533 | 0.667 | 0.733 | 0.625 | 0.615 | 0.813 | 0.750 | 0.625 | 0.857 | 0.813 |
| | $H_E$ | 0.611 | 0.710 | 0.619 | 0.764 | 0.784 | 0.713 | 0.594 | 0.725 | 0.777 | 0.689 | 0.779 | 0.663 | 0.781 |
| | F | 0.127 | -0.096 | -0.110 | 0.302 | 0.150 | -0.028 | -0.053 | 0.151 | -0.045 | -0.088 | 0.198 | -0.292 | -0.040 |
| TOTAL | A | 79 | 75 | 95 | 104 | 95 | 97 | 103 | 92 | 90 | 103 | 100 | 92 | 87 |
| | PA | 1 | 2 | 2 | 8 | | 1 | 6 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | |
| | $H_O$ | 0.694 | 0.731 | 0.714 | 0.756 | 0.726 | 0.687 | 0.790 | 0.705 | 0.729 | 0.796 | 0.690 | 0.758 | 0.716 |
| | $H_E$ | 0.725 | 0.708 | 0.708 | 0.779 | 0.750 | 0.723 | 0.771 | 0.757 | 0.719 | 0.788 | 0.766 | 0.711 | 0.753 |
| | F | 0.020 | -0.030 | -0.013 | 0.023 | 0.020 | 0.042 | -0.032 | 0.073 | -0.021 | -0.009 | 0.099 | -0.061 | 0.040 |
| | S.D. | 0.063 | 0.042 | 0.042 | 0.036 | 0.035 | 0.062 | 0.036 | 0.046 | 0.030 | 0.025 | 0.038 | 0.045 | 0.053 |

**Табела 4.6.** Параметри генетичког диверзитета и индекси фиксације код провенијенција букве из провенијеничног огледа

| | Pop | BCV | BGR | HDI | HVA | MVK | NHL | NSA | NHA | ASC | BKU | BTE | RAL | RIU | SSI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 9 | 9 | 10 | 10 | 10 | 9 | 10 | 10 | 10 |
| csolfagus_06 | A | 5 | 6 | 5 | 5 | 9 | 7 | 8 | 6 | 8 | 9 | 4 | 7 | 7 | 8 |
| | Ae | 3.333 | 4.348 | 3.922 | 4.444 | 6.737 | 5.333 | 5.120 | 3.556 | 3.846 | 7.364 | 2.842 | 5.882 | 5.263 | 7.143 |
| | $H_O$ | 0.800 | 0.800 | 0.500 | 0.600 | 0.875 | 1.000 | 0.875 | 0.750 | 0.800 | 0.889 | 0.889 | 0.700 | 0.900 | 1.000 |
| | $H_E$ | 0.700 | 0.770 | 0.745 | 0.775 | 0.852 | 0.813 | 0.805 | 0.719 | 0.740 | 0.864 | 0.648 | 0.830 | 0.810 | 0.860 |
| | F | -0.143 | -0.039 | 0.329 | 0.226 | -0.028 | -0.231 | -0.087 | -0.043 | -0.081 | -0.029 | -0.371 | 0.157 | -0.111 | -0.163 |
| csolfagus_19 | A | 7 | 8 | 5 | 6 | 5 | 7 | 9 | 10 | 6 | 7 | 7 | 6 | 8 | 5 |
| | Ae | 5.000 | 5.714 | 3.333 | 4.000 | 3.447 | 5.586 | 6.480 | 6.667 | 4.255 | 2.532 | 4.154 | 3.636 | 4.878 | 2.740 |
| | $H_O$ | 1.000 | 1.000 | 0.900 | 0.800 | 1.000 | 0.889 | 0.889 | 0.900 | 0.700 | 0.800 | 0.778 | 0.900 | 1.000 | 0.700 |
| | $H_E$ | 0.800 | 0.825 | 0.700 | 0.750 | 0.710 | 0.821 | 0.846 | 0.850 | 0.765 | 0.605 | 0.759 | 0.725 | 0.795 | 0.635 |
| | F | -0.250 | -0.212 | -0.286 | -0.067 | -0.409 | -0.083 | -0.051 | -0.059 | 0.085 | -0.322 | -0.024 | -0.241 | -0.258 | -0.102 |
| csolfagus_31 | A | 7 | 7 | 9 | 6 | 7 | 7 | 6 | 8 | 9 | 9 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| | Ae | 3.333 | 5.000 | 7.143 | 3.125 | 5.786 | 6.000 | 5.226 | 5.882 | 4.651 | 6.667 | 5.586 | 4.167 | 7.143 | 7.143 |
| | $H_O$ | 0.800 | 0.800 | 0.900 | 0.900 | 0.778 | 1.000 | 0.889 | 0.600 | 0.800 | 1.000 | 0.667 | 1.000 | 1.000 | 0.900 |
| | $H_E$ | 0.700 | 0.800 | 0.860 | 0.680 | 0.827 | 0.833 | 0.809 | 0.830 | 0.785 | 0.850 | 0.821 | 0.760 | 0.860 | 0.860 |
| | F | -0.143 | 0.000 | -0.047 | -0.324 | 0.060 | -0.200 | -0.099 | 0.277 | -0.019 | -0.176 | 0.188 | -0.316 | -0.163 | -0.047 |
| Fagsyl_003273 | A | 2 | 4 | 4 | 4 | 5 | 2 | 3 | 4 | 4 | 3 | 2 | 3 | 4 | 3 |
| | Ae | 1.342 | 2.597 | 2.597 | 2.469 | 2.418 | 1.906 | 2.418 | 2.740 | 4.000 | 2.174 | 1.800 | 2.410 | 2.564 | 2.381 |
| | $H_O$ | 0.300 | 0.800 | 0.700 | 0.700 | 0.667 | 0.556 | 0.556 | 0.500 | 0.600 | 0.500 | 0.667 | 0.900 | 0.700 | 0.700 |
| | $H_E$ | 0.255 | 0.615 | 0.615 | 0.595 | 0.586 | 0.475 | 0.586 | 0.635 | 0.750 | 0.540 | 0.444 | 0.585 | 0.610 | 0.580 |
| | F | -0.176 | -0.301 | -0.138 | -0.176 | -0.137 | -0.169 | 0.053 | 0.213 | 0.200 | 0.074 | -0.500 | -0.538 | -0.148 | -0.207 |
| Fagsyl_003994 | A | 6 | 5 | 8 | 2 | 7 | 6 | 4 | 6 | 6 | 5 | 5 | 6 | 10 | 5 |
| | Ae | 3.704 | 2.410 | 5.882 | 1.724 | 5.063 | 4.050 | 3.306 | 5.128 | 5.128 | 3.333 | 2.893 | 3.333 | 6.061 | 3.571 |
| | $H_O$ | 0.800 | 0.500 | 1.000 | 0.400 | 1.000 | 0.778 | 0.778 | 0.800 | 0.800 | 0.600 | 0.667 | 1.000 | 0.900 | 0.500 |
| | $H_E$ | 0.730 | 0.585 | 0.830 | 0.420 | 0.802 | 0.753 | 0.698 | 0.805 | 0.805 | 0.700 | 0.654 | 0.700 | 0.835 | 0.720 |
| | F | -0.096 | 0.145 | -0.205 | 0.048 | -0.246 | -0.033 | -0.115 | 0.006 | 0.006 | 0.143 | -0.019 | -0.429 | -0.078 | 0.306 |
| FS1-03 | A | 4 | 5 | 5 | 5 | 6 | 8 | 5 | 7 | 6 | 7 | 6 | 4 | 7 | 5 |
| | Ae | 3.030 | 2.778 | 2.410 | 1.942 | 2.418 | 4.378 | 2.656 | 3.077 | 2.985 | 3.774 | 2.418 | 2.041 | 4.255 | 2.632 |
| | $H_O$ | 0.800 | 0.700 | 0.600 | 0.400 | 0.667 | 0.889 | 0.889 | 0.800 | 0.700 | 0.700 | 0.667 | 0.400 | 0.700 | 0.800 |
| | $H_E$ | 0.670 | 0.640 | 0.585 | 0.485 | 0.586 | 0.772 | 0.623 | 0.675 | 0.665 | 0.735 | 0.586 | 0.510 | 0.765 | 0.620 |
| | F | -0.194 | -0.094 | -0.026 | 0.175 | -0.137 | -0.152 | -0.426 | -0.185 | -0.053 | 0.048 | -0.137 | 0.216 | 0.085 | -0.290 |
| FS1-15 | A | 6 | 7 | 5 | 9 | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | 4 | 7 | 8 | 4 |
| | Ae | 4.878 | 4.762 | 3.922 | 6.667 | 4.263 | 5.063 | 5.786 | 4.545 | 4.878 | 5.556 | 3.306 | 3.333 | 4.878 | 2.667 |
| | $H_O$ | 0.900 | 0.900 | 0.600 | 0.800 | 1.000 | 0.778 | 0.778 | 0.500 | 0.800 | 1.000 | 0.556 | 0.900 | 0.700 | 0.800 |
| | $H_E$ | 0.795 | 0.790 | 0.745 | 0.850 | 0.765 | 0.802 | 0.827 | 0.780 | 0.795 | 0.820 | 0.698 | 0.700 | 0.795 | 0.625 |
| | F | -0.132 | -0.139 | 0.195 | 0.059 | -0.306 | 0.031 | 0.060 | 0.359 | -0.006 | -0.220 | 0.204 | -0.286 | 0.119 | -0.280 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| sfc0018 | A | 4 | 6 | 7 | 6 | 8 | 6 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 7 | 5 |
| | Ae | 1.695 | 4.000 | 3.704 | 4.545 | 3.459 | 4.571 | 2.286 | 2.560 | 2.985 | 2.656 | 2.571 | 2.410 | 2.247 | 2.410 |
| | $H_O$ | 0.400 | 0.700 | 0.500 | 0.900 | 0.750 | 1.000 | 0.375 | 0.750 | 0.600 | 0.667 | 0.889 | 0.500 | 0.700 | 0.400 |
| | $H_E$ | 0.410 | 0.750 | 0.730 | 0.780 | 0.711 | 0.781 | 0.563 | 0.609 | 0.665 | 0.623 | 0.611 | 0.585 | 0.555 | 0.585 |
| | F | 0.024 | 0.067 | 0.315 | -0.154 | -0.055 | -0.280 | 0.333 | -0.231 | 0.098 | -0.069 | -0.455 | 0.145 | -0.261 | 0.316 |
| sfc1143 | A | 8 | 8 | 7 | 8 | 7 | 6 | 7 | 8 | 9 | 7 | 4 | 6 | 9 | 7 |
| | Ae | 3.922 | 5.714 | 5.000 | 3.390 | 4.414 | 4.000 | 3.879 | 4.923 | 4.762 | 5.786 | 1.800 | 3.390 | 6.897 | 3.226 |
| | $H_O$ | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.800 | 0.625 | 0.750 | 0.875 | 0.875 | 0.800 | 0.778 | 0.444 | 0.700 | 0.800 | 0.900 |
| | $H_E$ | 0.745 | 0.825 | 0.800 | 0.705 | 0.773 | 0.750 | 0.742 | 0.797 | 0.790 | 0.827 | 0.444 | 0.705 | 0.855 | 0.690 |
| | F | -0.342 | -0.212 | -0.250 | -0.135 | 0.192 | 0.000 | -0.179 | -0.098 | -0.013 | 0.060 | 0.000 | 0.007 | 0.064 | -0.304 |
| mfc5 | A | 6 | 10 | 8 | 9 | 12 | 8 | 8 | 9 | 8 | 10 | 9 | 6 | 8 | 11 |
| | Ae | 3.846 | 7.407 | 6.250 | 5.000 | 10.125 | 6.231 | 7.364 | 7.407 | 3.846 | 5.556 | 6.480 | 3.125 | 6.061 | 7.692 |
| | $H_O$ | 0.800 | 0.800 | 0.400 | 0.800 | 0.667 | 0.778 | 0.667 | 0.400 | 0.600 | 0.700 | 0.889 | 0.800 | 0.700 | 0.700 |
| | $H_E$ | 0.740 | 0.865 | 0.840 | 0.800 | 0.901 | 0.840 | 0.864 | 0.865 | 0.740 | 0.820 | 0.846 | 0.680 | 0.835 | 0.870 |
| | F | -0.081 | 0.075 | 0.524 | 0.000 | 0.260 | 0.074 | 0.229 | 0.538 | 0.189 | 0.146 | -0.051 | -0.176 | 0.162 | 0.195 |
| Fagsyl_000905 | A | 4 | 4 | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| | Ae | 1.709 | 2.105 | 2.899 | 2.381 | 3.767 | 2.455 | 2.282 | 1.852 | 2.128 | 3.077 | 2.219 | 2.597 | 2.353 | 2.299 |
| | $H_O$ | 0.500 | 0.700 | 0.100 | 0.700 | 0.667 | 0.444 | 0.667 | 0.500 | 0.500 | 0.700 | 0.778 | 0.600 | 0.600 | 0.700 |
| | $H_E$ | 0.415 | 0.525 | 0.655 | 0.580 | 0.735 | 0.593 | 0.562 | 0.460 | 0.530 | 0.675 | 0.549 | 0.615 | 0.575 | 0.565 |
| | F | -0.205 | -0.333 | 0.847 | -0.207 | 0.092 | 0.250 | -0.187 | -0.087 | 0.057 | -0.037 | -0.416 | 0.024 | -0.043 | -0.239 |
| DE576_A_0 | A | 3 | 5 | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 4 | 6 | 3 |
| | Ae | 2.410 | 3.448 | 2.353 | 2.667 | 2.492 | 3.057 | 3.000 | 4.082 | 2.597 | 2.941 | 2.945 | 3.077 | 3.571 | 2.632 |
| | $H_O$ | 0.300 | 0.500 | 0.700 | 0.600 | 0.667 | 0.556 | 0.889 | 0.800 | 0.900 | 0.600 | 0.889 | 0.900 | 0.700 | 0.800 |
| | $H_E$ | 0.585 | 0.710 | 0.575 | 0.625 | 0.599 | 0.673 | 0.667 | 0.755 | 0.615 | 0.660 | 0.660 | 0.675 | 0.720 | 0.620 |
| | F | 0.487 | 0.296 | -0.217 | 0.040 | -0.113 | 0.174 | -0.333 | -0.060 | -0.463 | 0.091 | -0.346 | -0.333 | 0.028 | -0.290 |
| MEAN | A | 62 | 75 | 70 | 68 | 82 | 72 | 69 | 79 | 77 | 79 | 58 | 64 | 86 | 69 |
| | PA | | | 1 | | 1 | | | 1 | | | | | 1 | |
| | $H_O$ | 0.700 | 0.767 | 0.658 | 0.700 | 0.780 | 0.785 | 0.760 | 0.681 | 0.717 | 0.744 | 0.731 | 0.775 | 0.783 | 0.742 |
| | $H_E$ | 0.629 | 0.725 | 0.723 | 0.670 | 0.737 | 0.742 | 0.716 | 0.732 | 0.720 | 0.727 | 0.644 | 0.673 | 0.751 | 0.686 |
| | F | -0.104 | -0.062 | 0.087 | -0.043 | -0.069 | -0.052 | -0.067 | 0.052 | 0.000 | -0.024 | -0.161 | -0.148 | -0.050 | -0.092 |
| | S.D. | 0.060 | 0.055 | 0.103 | 0.047 | 0.057 | 0.048 | 0.062 | 0.069 | 0.049 | 0.043 | 0.072 | 0.072 | 0.041 | 0.068 |

Неравнотежа везаности гена је је утврђена кроз 1782 теста између парова локуса по популацијама, од којих је 207 тестова било статистички значајно ($P < 0,05$). Број статистички значајних тестова између парова локуса по популацијама је био мањи у природним популацијама (50) од којих је највећи број статистички значајаних тестова уочен у популацији Жагубица (6). У свим популацијама из провенијеничног огледа детектована је неравнотежа везаности гена чак и између гена који нису у неравнотежи везаности код природних популација. Поред тога, од 66 тестова по популацији, број статистички значајних тестова је износио до 31 (47%) у популацији Диљ Цаглински из Хрватске. Овај налаз је очекиван с обзиром да популације из провенијеничног теста не представљају природне популације. Са друге стране, у 9 од 14 популација из провенијеничног теста утврђен је статистички значаја вишак хетерозигота.

На основу горе наведених анализа, закључено је да је свих 12 једарних микросателитских локуса поуздано, и да се могу користити за даље анализе, односно, за израчунавање параметара генетичког диверзитета и генетичке диференцијације популација. Такође, у популацијама из провенијеничног огледа утврђено је значајно одступање дистрибуције фреквенци генотипова од очекивања према Харди-Вајнберговој - овој равнотежи као и незанемарљива неравнотежа везаности гена који нису у неравнотежи код природних популација, тако да се резултати добијени поређењен природних популација и популација из провенијеничног огледа морају узети са резервом.

### 4.2.3 Параметри генетичког диверзитета

Умножавањем 12 једарних микросателита код 328 индивидуа букве детектовано је укупно 192 алела. Варијабилност једарних микросателита је коришћена за израчунавање параметара генетичког диверзитета: број алела (A), ефективни број алела (Ae), број приватних алела по популацији (PA), добијена хетерозиготност ($H_O$) и очекивана хетерозиготност ($H_E$) који су утврђени за сваки локус у свакој популацији, за сваку популацију, и у укупном узорку коришћењем програмских пакета Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005) и GenAlEx 6.5 (Peakall и Smouse 2006). Параметри генетичког диверзитета у природним популацијама са подручја Србије су представљени у табели 5, а европских провенијенција у табели 6.

Број алела по локусу се кретао од 7 (Fagsyl_003273) до 29 (FS1-03), а укупан број алела у популацијама на свим локусима од 62 (Босна и Херцеговина - Црни врх) до 104 (Србија - Мироч). Према очекивањима, већи број алела по локусу и у популацијама детектован је у природним популацијама. У укупном узорку је детектовано 31 приватни алел (PA), који су уочени у свим природним популацијама осим у популацијама Копаоник и Рудник, док су у европским популацијама PA уочени само у 4 популације (табеле 4.5 и 4.6). Највећи број PA је уочен у популацији Мироч (8).

У природним популацијама букве са подручја Србије најнижа вредност параметра $H_O$ је уочена у популацији Гоч (0,687) а највиша у популацији Сењски рудник (0,790), док је најнижа вредност параметра $H_E$ уочена у популацијама Кукавица и Стара планина (0,708) а највиша у популацији Голија (0,788). У случају европских провенијенција, најнижа вредност параметра $H_O$ је уочена у популацији Хрватска - Диљ Цаглински (0,658) а највиша у популацији Немачка - Hoellbach (0,785), док је најнижа вредност параметра $H_E$ уочена у популацији Босна и Херцеговина - Црни врх (0,629) а највиша у популацији Румунија - Alka-Iulia (0,751).

На основу вредности параметара генетичког диверзитета у испитиваним природним популацијама букве са подручја Србије може се закључити да се све популације одликују веома високим нивоом генетичког диверзитета. Популације нису угрожене инбридингом осим популација Јавор и Жагубица, у којима је уочен статистички значајан вишак хомозигота. Међутим, вишак хомозигота може бити и последица субструктуре ових популација (на овај феномен указује и неравнотежа везаности гена који нису у неравнотежи у другим популацијама, а која је детектована у релативно великом броју тестова) као и неких других генетичких процеса.

### 4.2.4. Генетичка диференцијација провенијенција

За процену генетичке диференцијације популација је коришћена Рајтова (*Wright* - ова) F статистика (Fst). Fst вредности између парова популација, утврђење коришћењем програмског пакета Arlequin, су представљенене у табелама 7 (све испитиване популације) и 8 (српске популације). Статистичка значајност тестова је утврђена на основу 110 пермутација, а као генетичка дистанца је коришћен број различитих алела.

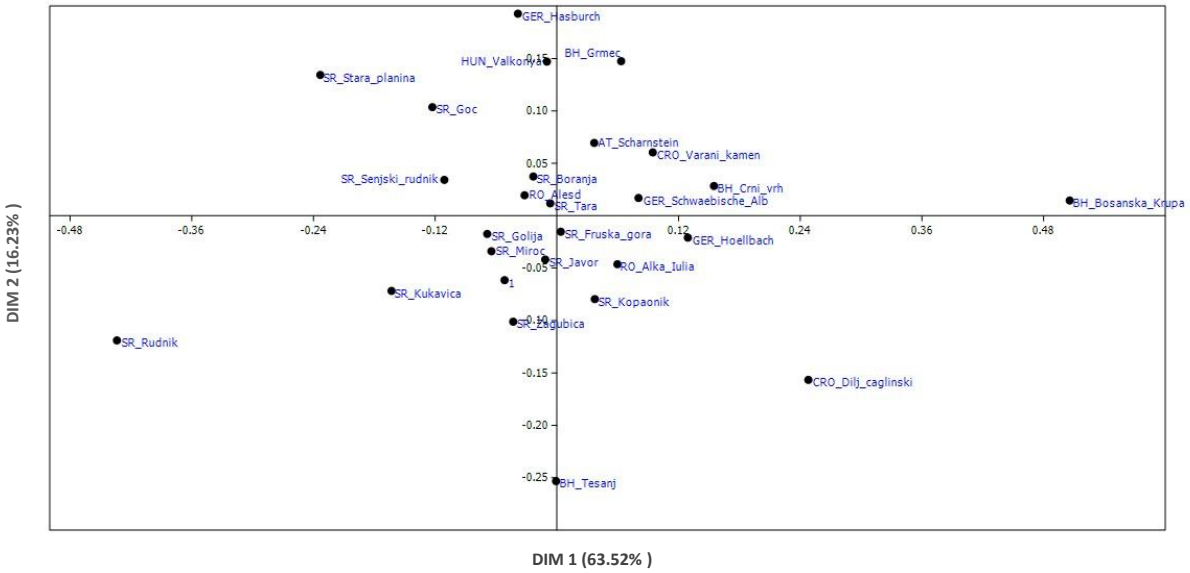
**Табела 4.7**. Fst вредности између парова свих испитиваних популација су представљене испод дијагонале, а изнад дијагонале су представљене P вредности за ниво статистичке значајности од 95% (статистички значајне вредности су подебљане)

| | FG | KU | SP | MC | KO | GO | SR | ZG | TR | GL | JV | BR | RU | BCV | BGR | HDI | HVA | MvK | NHL | NSA | NHA | ASC | BKU | BTE | RAL | RIU | SSI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **FG** | 0 | 0.11712+-0.0305 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.05405+-0.0278 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.03604+-0.0148 | 0.05405+-0.0201 | 0.07207+-0.0182 | 0.09009+-0.0359 | 0.15315+-0.0360 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.03604+-0.0201 | 0.01802+-0.0121 | 0.00000+-0.0000 | 0.02703+-0.0139 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.09009+-0.0303 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.37838+-0.0424 | 0.00000+-0.0000 |
| **KU** | 0.015 | 0 | 0.09910+-0.0252 | 0.00000+-0.0000 | 0.79279+-0.0403 | 0.17117+-0.0417 | 0.00000+-0.0000 | 0.27928+-0.0394 | 0.50450+-0.0433 | 0.36937+-0.0370 | 0.16216+-0.0297 | 0.91892+-0.0266 | 0.05405+-0.0201 | 0.02703+-0.0139 | 0.16216+-0.0182 | 0.19820+-0.0402 | 0.00000+-0.0000 | 0.14414+-0.0364 | 0.10811+-0.0227 | 0.01802+-0.0121 | 0.43243+-0.0572 | 0.04505+-0.0152 | 0.04505+-0.0152 | 0.00901+-0.0091 | 0.00901+-0.0091 | 0.44144+-0.0417 | 0.60360+-0.0334 |
| **SP** | **0.031** | 0.013 | 0 | 0.00000+-0.0000 | 0.02703+-0.0139 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.06306+-0.0237 | 0.00000+-0.0000 | 0.08108+-0.0163 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.06306+-0.0237 | 0.00000+-0.0000 |
| **MC** | **0.037** | **0.044** | **0.051** | 0 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.07207+-0.0264 | 0.12613+-0.0309 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.01802+-0.0121 | 0.00000+-0.0000 |
| **KO** | 0.012 | -0.005 | **0.014** | **0.029** | 0 | 0.07207+-0.0182 | 0.00000+-0.0000 | 0.10811+-0.0353 | 0.86486+-0.0203 | 0.45946+-0.0370 | 0.18018+-0.0303 | 0.20721+-0.0273 | 0.08108+-0.0212 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.02703+-0.0139 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.16216+-0.0326 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.31532+-0.0434 | 0.00000+-0.0000 |
| **GO** | **0.022** | 0.013 | **0.025** | **0.037** | 0.012 | 0 | 0.00000+-0.0000 | 0.01802+-0.0121 | 0.00000+-0.0000 | 0.18018+-0.0271 | 0.00901+-0.0091 | 0.02703+-0.0139 | 0.05405+-0.0242 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.16216+-0.0353 | 0.00000+-0.0000 | 0.02703+-0.0139 | 0.00000+-0.0000 | 0.03604+-0.0148 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.06306+-0.0194 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.34234+-0.0603 | 0.29730+-0.0543 |
| **SR** | **0.025** | **0.025** | **0.034** | 0.010 | **0.024** | **0.029** | 0 | 0.60360+-0.0430 | 0.00000+-0.0000 | 0.34234+-0.0402 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.05405+-0.0201 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.08108+-0.0163 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.27027+-0.0489 | 0.00000+-0.0000 |
| **ZG** | **0.019** | 0.010 | 0.013 | 0.011 | 0.010 | **0.022** | 0.001 | 0 | 0.04505+-0.0203 | 0.38739+-0.0408 | 0.22523+-0.0434 | 0.04505+-0.0152 | 0.13514+-0.0434 | 0.00000+-0.0000 | 0.01802+-0.0182 | 0.06306+-0.0273 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.01802+-0.0182 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.01802+-0.0121 | 0.03604+-0.0201 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.79279+-0.0354 | 0.00000+-0.0000 |
| **TR** | 0.012 | 0.000 | **0.021** | **0.048** | -0.005 | **0.017** | **0.040** | **0.014** | 0 | 0.03604+-0.0148 | 0.12613+-0.0309 | 0.50450+-0.0562 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.19820+-0.0326 | 0.03604+-0.0201 |
| **GL** | 0.011 | 0.003 | 0.014 | **0.026** | 0.001 | 0.007 | 0.003 | 0.003 | **0.013** | 0 | 0.92793+-0.0306 | 0.40541+-0.0493 | 0.72072+-0.0407 | 0.00000+-0.0000 | 0.12613+-0.0242 | 0.08108+-0.0286 | 0.00000+-0.0000 | 0.27027+-0.0470 | 0.17117+-0.0252 | 0.24324+-0.0408 | 0.37838+-0.0485 | 0.00000+-0.0000 | 0.21622+-0.0243 | 0.00000+-0.0000 | 0.01802+-0.0182 | 0.84685+-0.0365 | 0.10811+-0.0264 |
| **JV** | 0.011 | 0.013 | **0.019** | **0.035** | 0.009 | **0.024** | **0.021** | 0.009 | 0.010 | -0.006 | 0 | 0.15315+-0.0385 | 0.09910+-0.0286 | 0.00000+-0.0000 | 0.05405+-0.0148 | 0.01802+-0.0121 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.10811+-0.0297 | 0.06306+-0.0194 | 0.04505+-0.0152 | 0.00901+-0.0091 | 0.02703+-0.0139 | 0.00000+-0.0000 | 0.01802+-0.0121 | 0.36937+-0.0566 | 0.00901+-0.0091 |
| **BR** | 0.007 | -0.009 | **0.018** | **0.046** | 0.007 | **0.016** | **0.027** | **0.012** | -0.001 | 0.000 | 0.009 | 0 | 0.09009+-0.0303 | 0.00901+-0.0091 | 0.04505+-0.0152 | 0.03604+-0.0148 | 0.00000+-0.0000 | 0.07207+-0.0297 | 0.00901+-0.0091 | 0.06306+-0.0194 | 0.03604+-0.0148 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.89189+-0.0253 | 0.18919+-0.0212 |
| **RU** | **0.023** | 0.017 | **0.034** | **0.036** | 0.012 | 0.018 | **0.023** | 0.012 | **0.023** | -0.003 | 0.012 | 0.010 | 0 | 0.00000+-0.0000 | 0.03604+-0.0201 | 0.01802+-0.0121 | 0.00901+-0.0091 | 0.01802+-0.0121 | 0.00000+-0.0000 | 0.04505+-0.0203 | 0.18018+-0.0235 | 0.01802+-0.0121 | 0.14414+-0.0309 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.27928+-0.0370 | 0.00000+-0.0000 |
| **BCV** | **0.060** | **0.037** | **0.061** | **0.068** | **0.041** | **0.061** | **0.062** | **0.042** | **0.054** | **0.049** | **0.053** | **0.028** | **0.057** | 0 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.01802+-0.0121 | 0.00000+-0.0000 |
| **BGR** | **0.031** | 0.017 | **0.052** | **0.058** | **0.033** | **0.033** | **0.042** | **0.040** | **0.031** | 0.012 | 0.017 | **0.019** | **0.022** | **0.070** | 0 | 0.02703+-0.0194 | 0.02703+-0.0194 | 0.24324+-0.0408 | 0.01802+-0.0121 | 0.21622+-0.0454 | 0.27027+-0.0450 | 0.00901+-0.0091 | 0.15315+-0.0273 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.02703+-0.0139 | 0.00000+-0.0000 |
| **HDI** | **0.033** | 0.022 | **0.040** | **0.038** | **0.029** | 0.021 | 0.021 | 0.029 | **0.041** | 0.013 | **0.041** | **0.035** | **0.029** | **0.077** | **0.033** | 0 | 0.00000+-0.0000 | 0.28829+-0.0588 | 0.27027+-0.0470 | 0.13514+-0.0365 | 0.20721+-0.0408 | 0.21622+-0.0338 | 0.27928+-0.0252 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.32432+-0.0562 | 0.09910+-0.0316 |
| **HVA** | **0.042** | **0.040** | **0.072** | **0.064** | **0.053** | **0.026** | **0.062** | **0.053** | **0.036** | **0.034** | **0.042** | **0.029** | **0.044** | **0.097** | **0.029** | **0.048** | 0 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.01802+-0.0121 | 0.00901+-0.0091 | 0.00901+-0.0091 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 |
| **MvK** | **0.025** | 0.011 | **0.050** | **0.052** | **0.025** | **0.018** | **0.026** | **0.037** | **0.035** | 0.005 | **0.031** | 0.014 | **0.019** | **0.071** | 0.009 | 0.010 | **0.049** | 0 | 0.00901+-0.0091 | 0.00901+-0.0091 | 0.20721+-0.0385 | 0.03604+-0.0148 | 0.71171+-0.0345 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 | 0.11712+-0.0194 | 0.16216+-0.0445 |
| **NHL** | **0.022** | 0.019 | **0.040** | **0.041** | **0.025** | **0.042** | **0.028** | **0.021** | **0.034** | 0.008 | 0.018 | **0.033** | **0.035** | **0.071** | **0.036** | 0.015 | **0.065** | **0.038** | 0 | 0.07207+-0.0182 | 0.16216+-0.0326 | 0.07207+-0.0227 | 0.01802+-0.0121 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.06306+-0.0237 | 0.09009+-0.0303 |
| **NSA** | **0.029** | **0.022** | **0.053** | **0.048** | **0.032** | **0.024** | **0.039** | **0.036** | **0.033** | 0.004 | 0.017 | 0.011 | **0.026** | **0.062** | 0.013 | 0.024 | **0.023** | **0.023** | 0.017 | 0 | 0.54955+-0.0417 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.06306+-0.0194 | 0.03604+-0.0148 |
| **NHA** | 0.018 | 0.003 | **0.039** | **0.048** | 0.012 | **0.032** | **0.041** | **0.032** | **0.025** | 0.005 | **0.018** | **0.013** | 0.011 | **0.065** | 0.010 | 0.022 | **0.036** | 0.013 | 0.018 | -0.002 | 0 | 0.03604+-0.0201 | 0.11712+-0.0237 | 0.00000+-0.0000 | 0.03604+-0.0148 | 0.20721+-0.0543 | 0.17117+-0.0497 |
| **ASC** | **0.037** | **0.021** | **0.031** | **0.052** | **0.036** | **0.043** | **0.027** | **0.024** | **0.037** | **0.026** | **0.028** | **0.026** | **0.036** | **0.077** | **0.036** | 0.025 | **0.055** | **0.031** | 0.023 | **0.041** | **0.025** | 0 | 0.05405+-0.0278 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.30631+-0.0653 | 0.03604+-0.0148 |
| **BKU** | **0.020** | **0.013** | **0.032** | **0.051** | **0.024** | 0.017 | 0.013 | **0.021** | **0.027** | 0.005 | **0.028** | **0.018** | 0.009 | **0.067** | 0.016 | 0.013 | **0.049** | -0.008 | **0.030** | **0.032** | 0.019 | 0.028 | 0 | 0.00000+-0.0000 | 0.01802+-0.0121 | 0.23423+-0.0388 | 0.07207+-0.0353 |
| **BTE** | **0.061** | **0.046** | **0.080** | **0.079** | **0.066** | **0.057** | **0.073** | **0.073** | **0.061** | **0.060** | **0.064** | **0.055** | **0.059** | **0.132** | **0.059** | **0.074** | **0.055** | **0.053** | **0.087** | **0.054** | **0.050** | **0.083** | **0.059** | 0 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.00901+-0.0091 |
| **RAL** | **0.037** | **0.034** | **0.050** | **0.069** | **0.030** | **0.054** | **0.053** | **0.051** | **0.023** | **0.016** | **0.027** | **0.029** | **0.037** | **0.094** | **0.034** | **0.062** | **0.059** | **0.038** | **0.047** | **0.047** | **0.036** | **0.055** | **0.040** | 0.084 | 0 | 0.00901+-0.0091 | 0.01802+-0.0121 |
| **RIU** | 0.005 | 0.000 | 0.012 | **0.021** | 0.006 | 0.005 | 0.003 | -0.003 | 0.006 | -0.007 | 0.006 | -0.008 | 0.007 | **0.029** | **0.026** | 0.008 | **0.037** | 0.010 | 0.016 | 0.014 | 0.010 | 0.006 | 0.009 | 0.054 | **0.034** | 0 | 0.28829+-0.0445 |
| **SSI** | **0.026** | -0.003 | **0.025** | **0.058** | **0.020** | 0.005 | **0.041** | **0.024** | **0.019** | 0.012 | **0.029** | **0.008** | **0.030** | **0.073** | **0.043** | 0.027 | **0.047** | 0.009 | 0.019 | **0.016** | 0.014 | **0.022** | 0.019 | 0.039 | **0.033** | 0.004 | 0 |

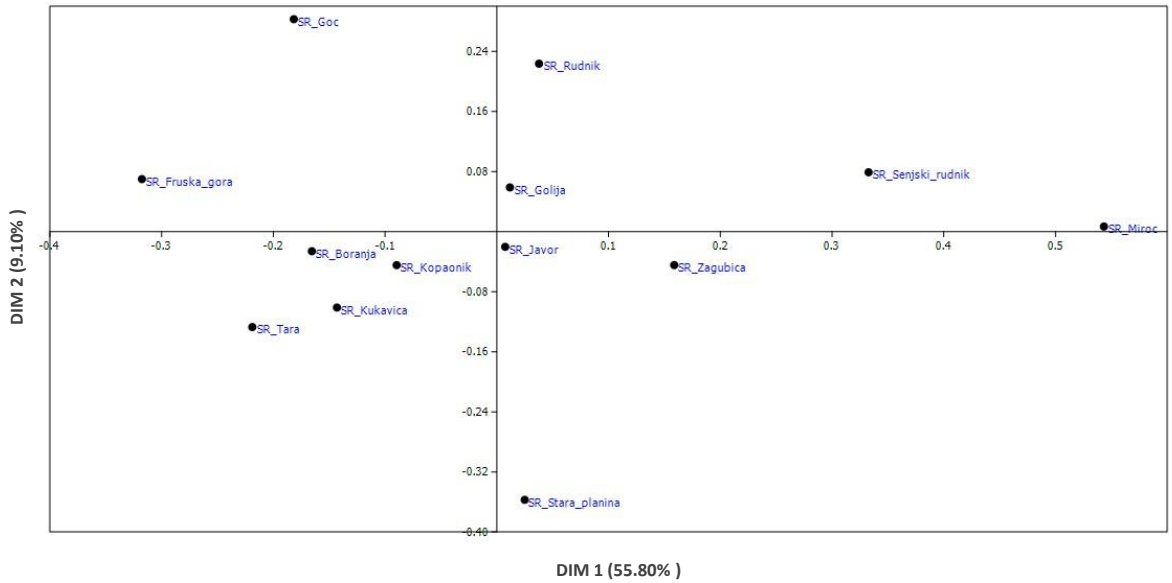
**Табела 4.8.** Fst вредности између парова природних популацијаса подручја Србије су представљене испод дијагонале, а изнад дијагонале су представљене P вредности за ниво статистичке значајности од 95% (статистички значајне вредности су подебљане)

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fruska gora | 0 | 0.06306+ -0.0194 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 | 0.07207+ -0.0264 | 0.01802+ -0.0121 | 0.01802+ -0.0121 | 0.03604+ -0.0201 | 0.04505+ -0.0203 | 0.06306+ -0.0333 | 0.10811+ -0.0326 | 0.19820+ -0.0353 | 0.00000+ -0.0000 |
| Kukavica | 0.015 | 0 | 0.09910+ -0.0286 | 0.00000+ -0.0000 | 0.79279+ -0.0298 | 0.06306+ -0.0194 | 0.00000+ -0.0000 | 0.20721+ -0.0360 | 0.58559+ -0.0434 | 0.40541+ -0.0493 | 0.18919+ -0.0417 | 0.81982+ -0.0459 | 0.09910+ -0.0286 |
| Stara planina | **0.031** | 0.013 | 0 | 0.00000+ -0.0000 | 0.03604+ -0.0148 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 | 0.09009+ -0.0359 | 0.00000+ -0.0000 | 0.01802+ -0.0182 | 0.02703+ -0.0139 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 |
| Miroc | **0.037** | **0.044** | **0.051** | 0 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 | 0.04505+ -0.0244 | 0.09910+ -0.0286 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 |
| Kopaonik | 0.012 | -0.005 | **0.014** | **0.029** | 0 | 0.09910+ -0.0252 | 0.00000+ -0.0000 | 0.12613+ -0.0309 | 0.88288+ -0.0266 | 0.43243+ -0.0402 | 0.18919+ -0.0438 | 0.18018+ -0.0407 | 0.03604+ -0.0201 |
| Goc | **0.022** | 0.013 | **0.025** | **0.037** | 0.012 | 0 | 0.00000+ -0.0000 | 0.02703+ -0.0139 | 0.02703+ -0.0139 | 0.11712+ -0.0360 | 0.00000+ -0.0000 | 0.02703+ -0.0139 | 0.00901+ -0.0091 |
| Senjski Rudnik | **0.025** | **0.025** | **0.034** | **0.010** | **0.024** | **0.029** | 0 | 0.62162+ -0.0317 | 0.00000+ -0.0000 | 0.27928+ -0.0344 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 | 0.00000+ -0.0000 |
| Zagubica | **0.019** | 0.010 | 0.013 | 0.011 | 0.010 | **0.022** | 0.001 | 0 | 0.07207+ -0.0297 | 0.42342+ -0.0490 | 0.18018+ -0.0332 | 0.08108+ -0.0212 | 0.06306+ -0.0273 |
| Tara | **0.012** | 0.000 | **0.021** | **0.048** | -0.005 | **0.017** | **0.040** | 0.014 | 0 | 0.03604+ -0.0201 | 0.15315+ -0.0333 | 0.48649+ -0.0667 | 0.00901+ -0.0091 |
| Golija | 0.011 | 0.003 | **0.014** | **0.026** | 0.001 | 0.007 | 0.003 | 0.003 | **0.013** | 0 | 0.90090+ -0.0236 | 0.42342+ -0.0430 | 0.74775+ -0.0430 |
| Javor | 0.011 | 0.013 | **0.019** | **0.035** | 0.009 | **0.024** | **0.021** | 0.009 | 0.010 | -0.006 | 0 | 0.19820+ -0.0445 | 0.07207+ -0.0297 |
| Boranja | 0.007 | -0.009 | **0.018** | **0.046** | 0.007 | **0.016** | **0.027** | 0.012 | -0.001 | 0.000 | 0.009 | 0 | 0.10811+ -0.0378 |
| Rudnik | **0.023** | 0.017 | **0.034** | **0.036** | **0.012** | **0.018** | **0.023** | 0.012 | **0.023** | -0.003 | 0.012 | 0.010 | 0 |

Добијене матрице генетичких дистанци између парова популација су визуализоване методом неметричког вишедимензионог скалирања (*non-metric MultiDimensional Scaling*, MDS) и представљене на сликама 4.10 (све испитиване популације) и 4.11 (популације са подручја Србије). За конструкцију MDS графика је коришћен програм PAST3 (Hammer *et al*., 2001). MDS график је представљен на слици 4.10.




**Слика 4.10.** MDS график на којем су визуелизоване Fst вредности између парова свих испитиваних популација путем представљања у дводимензионалном простору (*stress* вредност 0.2359)

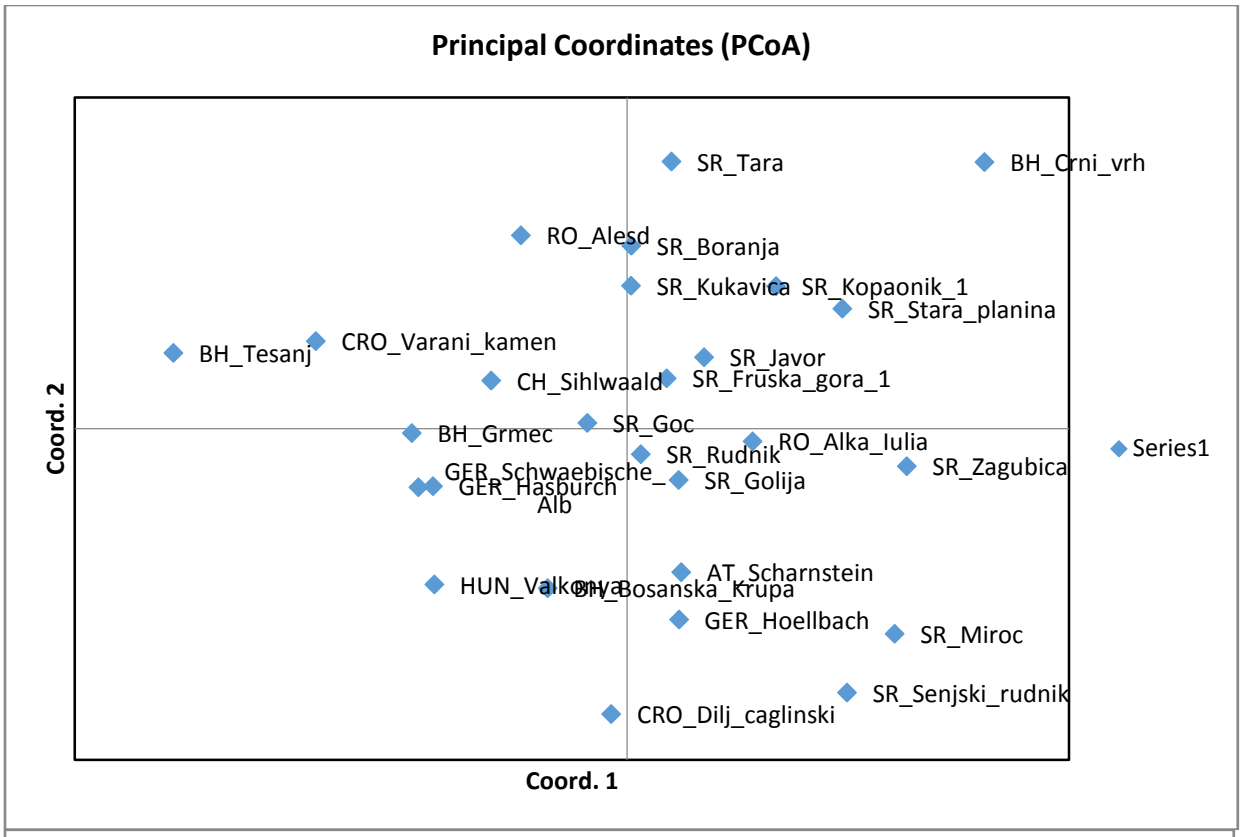


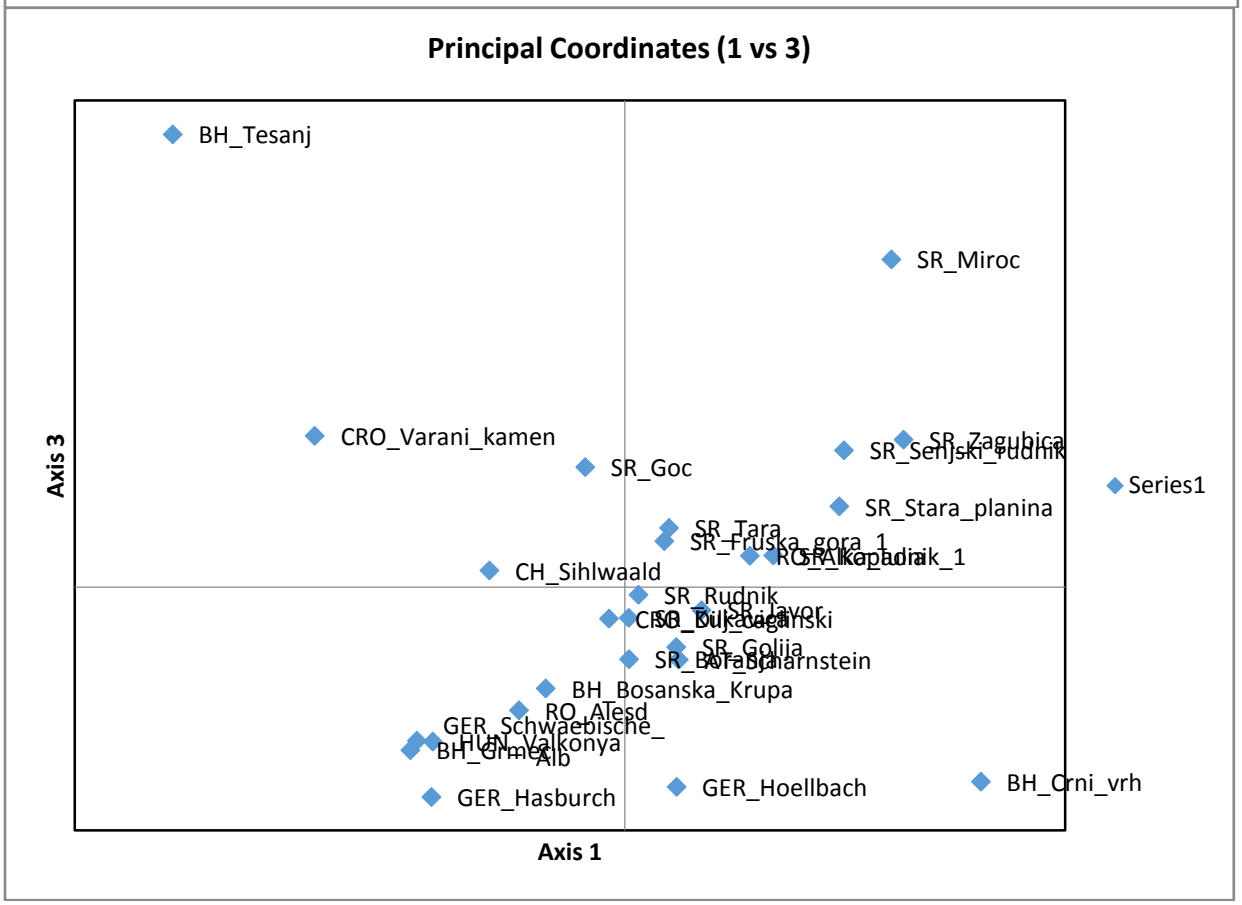

**Слика 4.11.** MDS график на којем су визуелизоване Fst вредности између парова популација са подручја Србије путем представљања у дводимензионалном простору (*stress* вредност 0.2272)

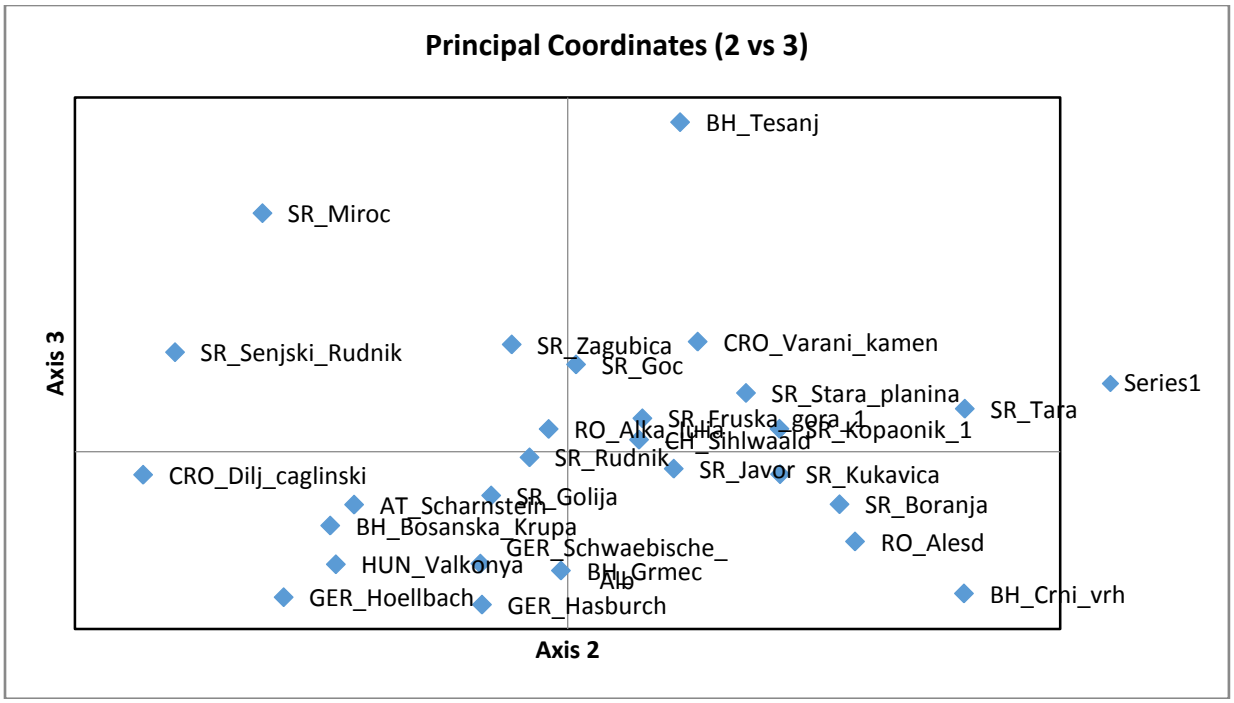
На првом MDS графику (слика 4.10), који је дефинисан осама које објашњавају 63,52% (DIM 1) и 16,23% варијабилности (DIM 2), не уочава се јасно раздвајање популација које би представљале мезијску букву (популације са подручја Србије) од популација које би представљале обичну букву (преостале испитиване провенијенције), иако се уочава да су скорови српских популација углавном позиционирани у горњем и доњем левом квадранту, односно, посматрано у односу на DIM 1, која објашњава већи део укупне варијабилности, расути су, углавном, дуж негативних вредности ове осе. Међутим, са популацијама из Србије груписана је провенијенција из Румуније - Alesd. Важно је напоменути да се међу српским популацијама издваја Рудник, код којег су детектовани и специфични хлоропластни хаплотипови.

На другом MDS графику (слика 4.11), који је дефинисан осама које објашњавају 55,80% (DIM 1) и 9,10% варијабилности (DIM 2), уочава се да су популације са подручја Србије расуте по целом дводимензиналном простору, као и да се по оси 1, која објашњава највећи део генетичке варијабилности, одвјавају популације Жагубица, Сењски Рудник и Мироч (ова група је уочена и у анализама из фазе 1), као и популације Рудник, Голија, Јавор (и ова група је уочена у анализама из фазе 1). Међутим, овој групи би се могла прикључити и популација Стара планина, која се од осталих споменутих популација раздваја по другој оси. Трећу групу чине популације расуте по MDS графику дуж негативних вредности осе 1: Борања, Копаоник, Кукавица, Тара, Гоч и Фрушка гора, при чему се последње две популације могу сматрати *outlier*-има у овој групи. Добијени резултати указују на то да постоји генетичка диференцијација међу популацијама са подручја Србије.

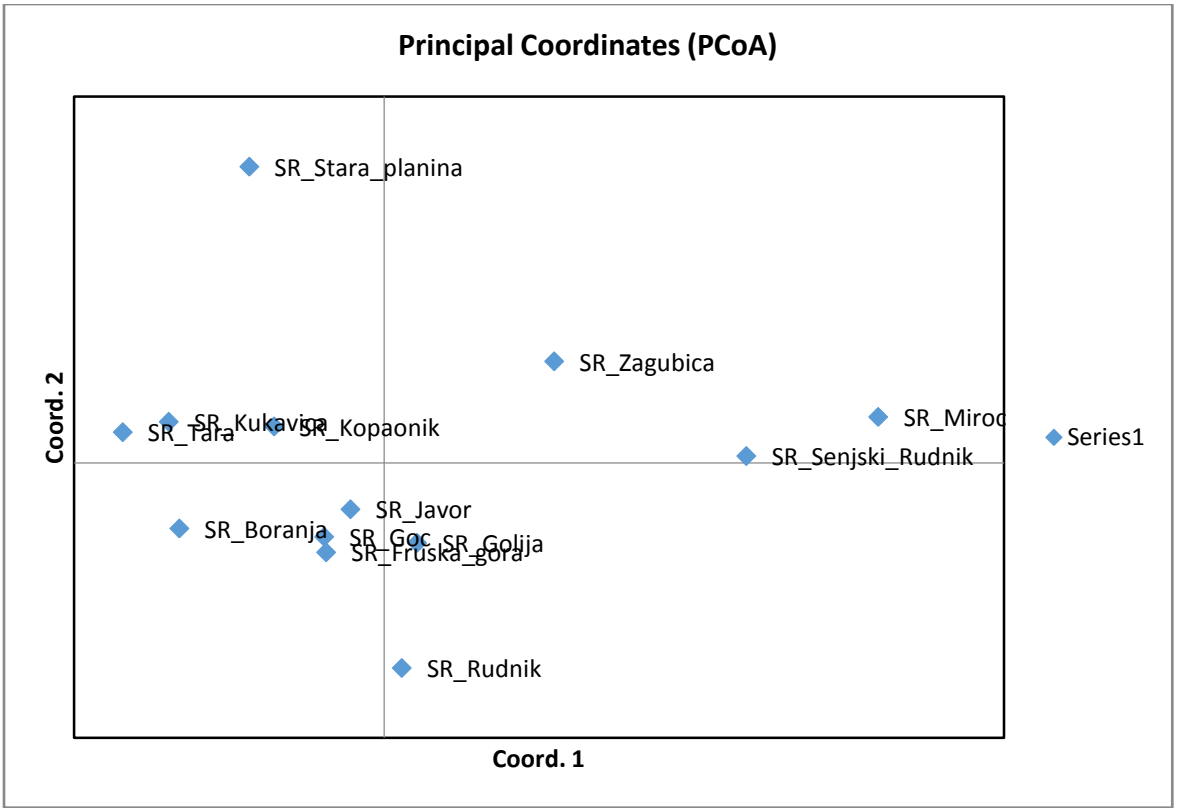
На основу матрикса коваријанси уз стандардизацију података урађене су анализе главних координата (*Principal Coordinates Analysis* - PCoA) у програму GenAlEx. У првој анализи су коришћене све испитиване популације, а у другој само популације са подручја Србије. Подаци добијени у првој анализи су представљени у дводимензионалним графицима дефинисаним са две од три осе, које објашњавају 21,84% укупне варијабилности (оса 1), 14,13% варијабилности (оса 2) и 12,38% варијабилности (оса 3), односно, кумулативно 48,25% укупне варијабилности (слика 4.12). Подаци добијени у другој анализи су такође представљени у дводимензионалним графицима дефинисаним са две од три осе, које објашњавају 44,88% укупне варијабилности (оса 1), 16,37% варијабилности (оса 2) и 13,65% варијабилности (оса 3), односно, кумулативно 74,90% укупне варијабилности (слика 4.13).

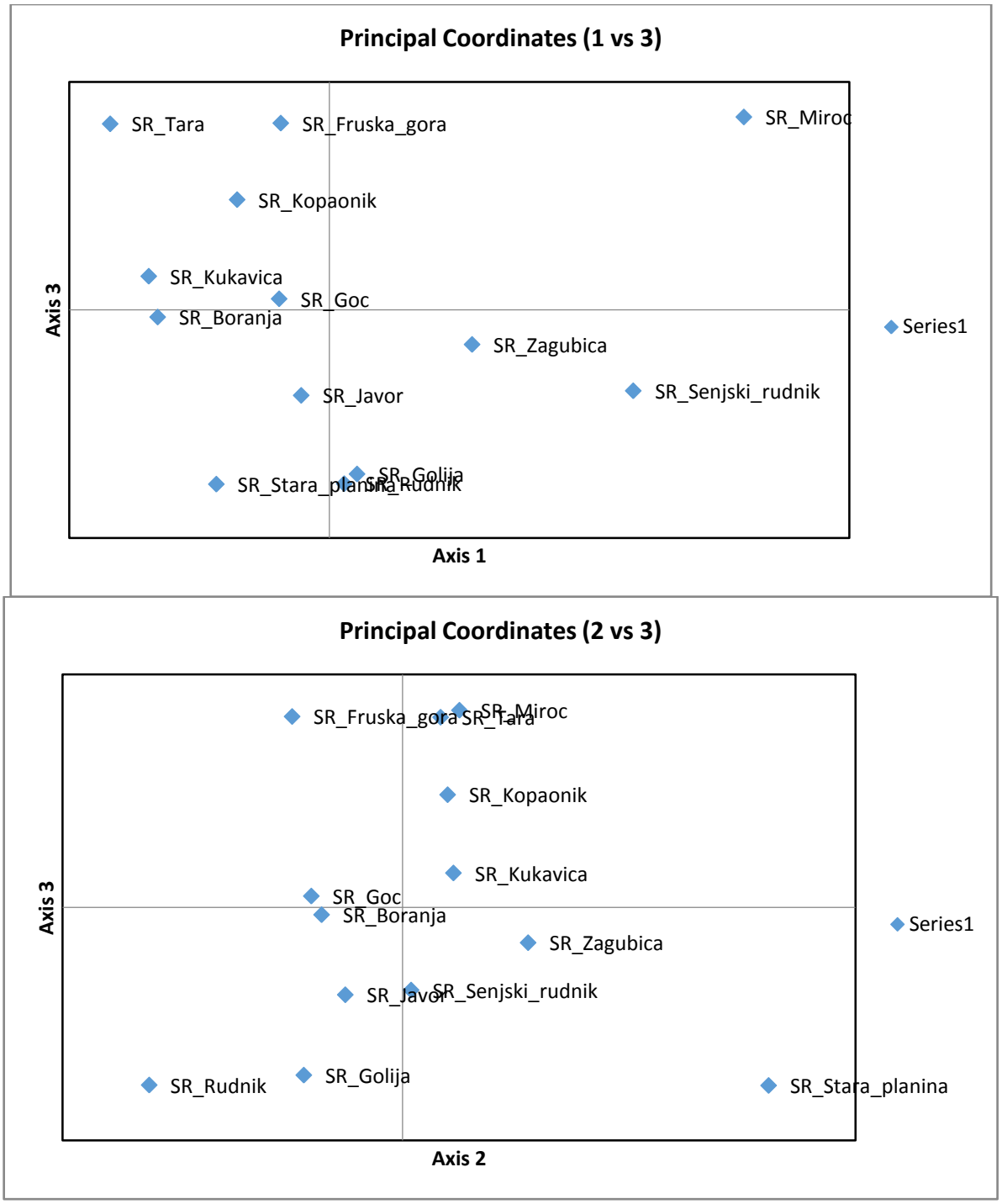

Principal Coordinates (PCoA)
SR_Tara
BH_Crni_vrh
RO_Alesd
SR_Boranja
SR_Kukavica
SR_Kopaonik_1
SR_Stara_planina
BH_Tesanj
CRO_Varani_kamen
SR_Javor
CH_Sihlwaald
SR_Fruska_gora_1
SR_Goc
BH_Grmec
RO_Alka_Iulia
SR_Rudnik
Series1
SR_Zagubica
GER_Schwaebische_
GER_Hasburch
SR_Golija
Alb
AT_Scharnstein
HUN_Valkonya
BH_Bosanska_Krupa
GER_Hoellbach
SR_Miroc
SR_Senjski_rudnik
CRO_Dilj_caglinski
Coord. 2
Coord. 1


Principal Coordinates (1 vs 3)
BH_Tesanj
SR_Miroc
CRO_Varani_kamen
SR_Zagubica
SR_Senjski_rudnik
SR_Goc
Series1
SR_Stara_planina
SR_Tara
SR_Fruska_gora_1
CH_Sihlwaald
SR_Rudnik
SR_Javor
SR_Golija
BH_Bosanska_Krupa
GER_Schwaebische_
GER_Hasburch
GER_Hoellbach
BH_Crni_vrh
Axis 3
Axis 1




**Слика 4.12.** Резултати PCoA анализе свих испитиваних популација/провенијенција






**Слика 4.13.** Резултати PCoA анализе популација са подручја Србије

На основу резултата PCoA анализе, уочава се да не постоји јасно раздвајање популација са подручја Србије од осталих испитиваних провенијенција, као и да се груписање популација са подручја Србије, које одговара груписању добијеном у MDS графику, уочава на PCoA графику дефинисаном осама 1 и 3.

Затим је урађена и анализа молекуларне варијансе (*Analysis of Molecular Variance* - AMOVA) у програму Arlequin у којој су коришћени различити сетови популација. Статистичка значајност вредности параметара је утврђена коришћењем 1023 пермутација. Најпре је урађена AMOVA анализа у којој су коришћене све испитиване популације (табела 4.9), а затим и анализа у којој су коришћене само природне популације из Србије (табела 4.10).

**Табела 4.9.** Резултати AMOVA анализе са свим испитиваним популацијама/провенијенцијама

| Извор варијације | Степени слободе | Сума квадрираних разлика | Компоненте варијације | Проценат варијације |
|---|---|---|---|---|
| Између популација/провенијенција | 26 | 199.800 | 0.12667 | 2.75*** |
| Између индивидуа у оквиру популација/провенијенција | 301 | 1388.718 | 0.12696 | 2.75*** |
| У оквиру индивидуа | 328 | 1430.000 | 4.35976 | 94.50*** |
| УКУПНО | 655 | 3018.518 | 4.61338 | |

*** - P < 0.001.

**Табела 4.10.** Резултати AMOVA анализе са популацијама са подручја Србије

| Извор варијације | Степени слободе | Сума квадрираних разлика | Компоненте варијације | Проценат варијације |
|---|---|---|---|---|
| Између популација | 12 | 83.317 | 0.07312 | 1.57*** |
| Између индивидуа у оквиру популација | 179 | 856.740 | 0.21605 | 4.65*** |
| У оквиру индивидуа | 192 | 836.000 | 4.35417 | 93.77*** |
| УКУПНО | 383 | 1776.057 | 4.64333 | |

*** - P < 0,001.

У првој AMOVA анализи је уочено да низак али статистички значајан проценат укупне варијације отпада на варијацију између популација/провенијенција (2,75%, P = 0,000) и варијацију између индивидуа у оквиру популација/провенијенција (2,75%, P = 0,000), док највећи проценат варијације отпада на варијацију у оквиру индивидуа (94,50%, P = 0,000). Добијене су следеће вредности параметара $F_{IS}$, $F_{ST}$ и $F_{IT}$: 0,028, 0,027 и 0,055, респективно, које су биле статистички значајне. У другој AMOVA анализи је уочено да низак али статистички значајан проценат укупне варијације отпада на варијацију између популација (1,57%, P = 0,000), нешто виши и статистички значаја проценат отпада на варијацију између индивидуа у оквиру популација (4,65%, P = 0,000), док највећи проценат варијације отпада на варијацију у оквиру индивидуа (93,77%, P = 0,000). У овој анализи добијене су следеће вредности параметара $F_{IS}$, $F_{ST}$ и $F_{IT}$: 0,047, 0,016 и 0,062, респективно, које су биле статистички значајне. Добијени подаци указују на то да постоји одређена генетичка диференцијација (структура) свих испитиваних популација као и популација са подручја Србије.

Затим је урађена хијерархијска AMOVA са 2 предефинисане групе популација. У првој анализи су прву групу чиниле популације са подручја Србије (потенцијално мезијска буква) а другу групу све остале испитиване популације (обична буква) (табела 4.11), а у другој анализи су прву групу чиниле све популације букве са Балканског полуострва а другу групу преостале европске провенијенције (табела 4.12).

**Табела 4.11.** Резултати хијерархијске AMOVA анализе са свим испитиваним популацијама/провенијенцијама

| Извор варијације | Степени слободе | Сума квадрираних разлика | Компоненте варијације | Проценат варијације |
|---|---|---|---|---|
| Између група | 1 | 15.347 | 0.02517 | 0.54*** |
| Између популација/провенијенција у оквиру група | 25 | 184.453 | 0.11395 | 2.46*** |
| Између индивидуа у оквиру популација/провенијенција | 301 | 1388.718 | 0.12696 | 2.74*** |
| У оквиру индивидуа | 328 | 1430.000 | 4.35976 | 94.25*** |
| УКУПНО | 655 | 3018.518 | 4.62584 | |

*** - P < 0,001.

**Табела 4.12.** Резултати хијерархијске AMOVA анализе са популацијама са подручја Србије

| Извор варијације | Степени слободе | Сума квадрираних разлика | Компоненте варијације | Проценат варијације |
|---|---|---|---|---|
| Између група | 1 | 11.160 | 0.01693 | 0.37*** |
| Између популација у оквиру група | 25 | 188.640 | 0.12034 | 2.60*** |
| Између индивидуа у оквиру популација | 301 | 1388.718 | 0.12696 | 2.75*** |
| У оквиру индивидуа | 328 | 1430.000 | 4.35976 | 94.29*** |
| УКУПНО | 655 | 3018.518 | 4.62398 | |

*** - P < 0,001.

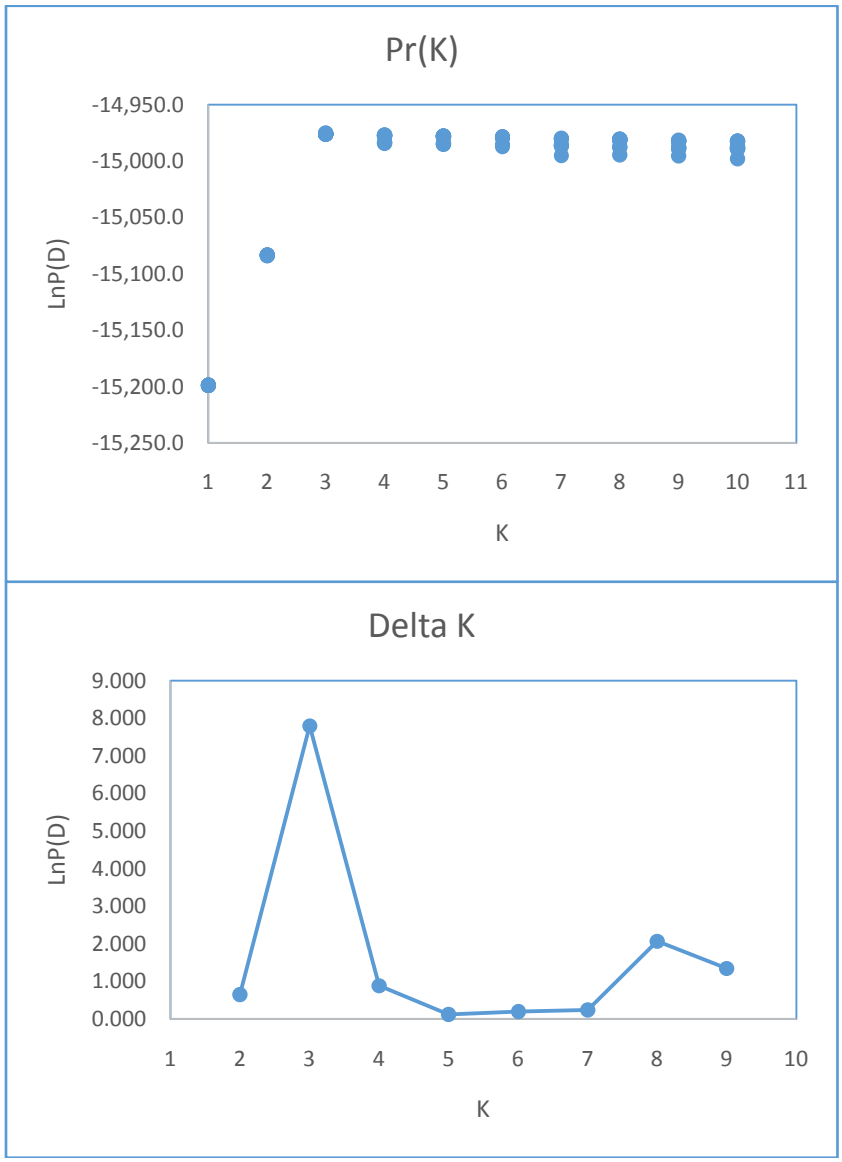
У првој хијерархијској AMOVA анализи је оучено да низак али статистички значајан проценат укупне варијације отпада на варијацију између група (0,54%, P = 0,000), нешто виши проценат на варијацију између популацију у оквиру група (2,46%, P = 0,000) и варијацију између индивидуа у оквиру популација (2,74%, P = 0,000), док највећи проценат варијације отпада на варијацију у оквиру индивидуа (94,25%, P = 0,000). Добијене су следеће вредности параметара $F_{IS}$, $F_{SC}$, $F_{CT}$ и $F_{IT}$: 0,028, 0,025, 0,005 и 0,057, респективно, које су биле статистички значајне на нивоу значајности од 99%.

У другој хијерархијској AMOVA анализи је оучено да низак али статистички значајан проценат укупне варијације отпада на варијацију између група (0,37%, P = 0,000), нешто виши проценат на варијацију између популацију у оквиру група (2,60%, P = 0,000) и варијацију између индивидуа у оквиру популација (2,75%, P = 0,000), док највећи проценат варијације отпада на варијацију у оквиру индивидуа (94,29%, P = 0,000). Добијене су следеће вредности параметара $F_{IS}$, $F_{SC}$, $F_{CT}$ и $F_{IT}$: 0,028, 0,026, 0,004 и 0,057, респективно, које су биле статистички значајне на нивоу значајности од 99%.

Када се упореде $F_{SC}$ и $F_{CT}$ вредности добијене у хијерархијским AMOVA анализама, уочава се да је у првој анализи добијена нешто виша вредност параметра $F_{CT}$ (0,005 наспрам 0,004) и нешто нижа вредност параметра $F_{SC}$ (0,025 наспрам 0,026) што указује на то је да је груписање популација обављено у првој анализи, у којој су једну групу чиниле природне популације букве са подручја Србије а другу групу преостале европске провенијенције, нешто боље.

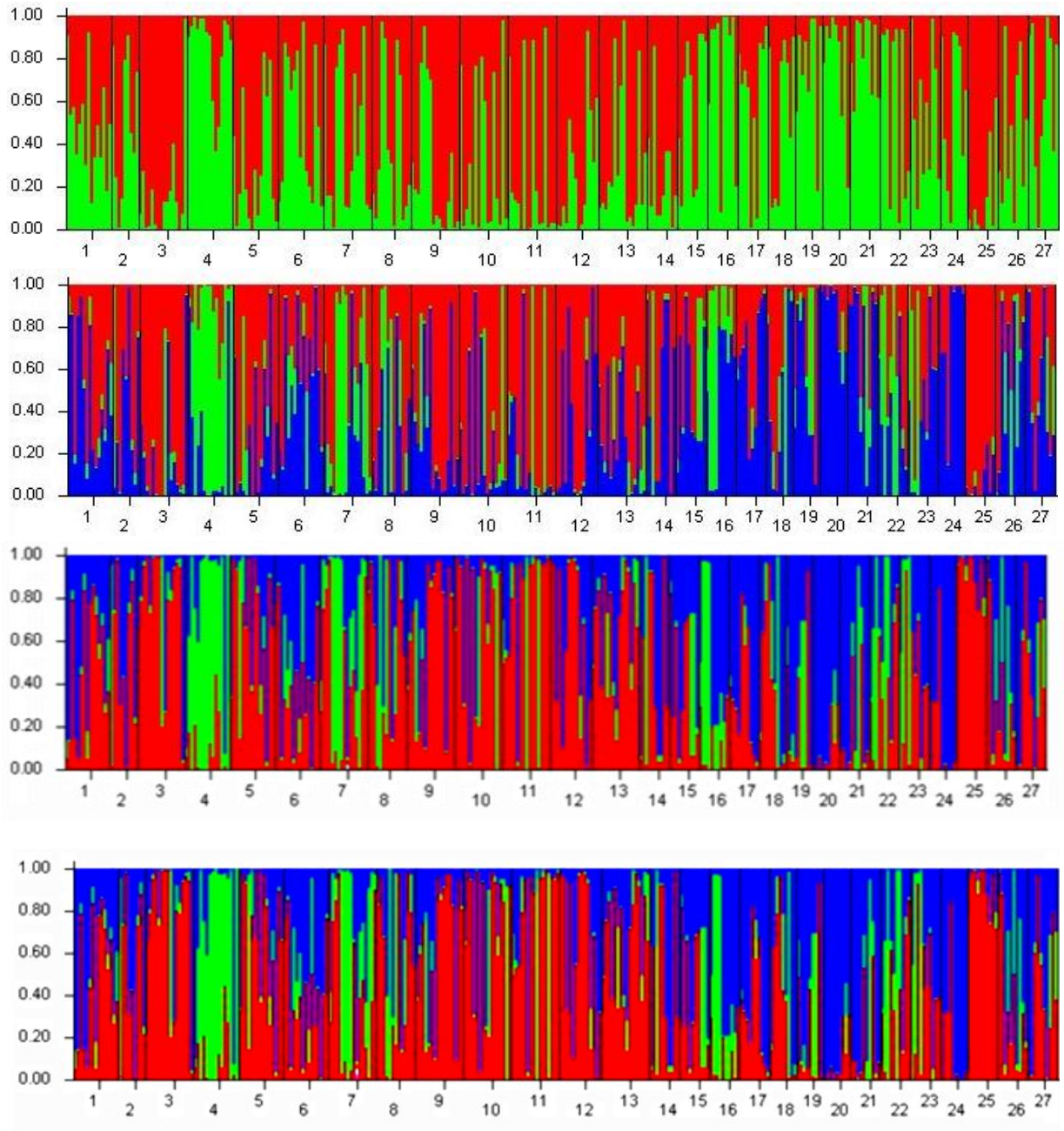
На крају је урађена и анализа у програму STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) који у односу на претходне методе које се заснивају на коефицијентима генетичких

сличности/разлика представља квалитативно другачији тип анализа у којем се применом Бајесове методе и *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) симулација а на основу задатих модела утврђује оптимални број генетичких група (K) у узорку. Важно је напоменути да се у овој анализа могу користити локуси који су у слабој неравнотежи везаности. Након преданализе од 1.000.000 симулација, параметри су анализирани на сваких 100 корака од укупно 3.000.000 понављања MCMC симулација, а изведено је по 10 независних анализа за сваки од задатих K = 1 - 10. Коришћен је модел некорелисаних фреквенци алела и модел сродности индивидуа који не претпоставља адмиксију. Оптималан број генетичких група је утврђен на 2 начина: на основу дистрибуције постериорних вероватноћа за сваки K и коришћењем Δ*K* методе (Evanno *et al*., 2005).

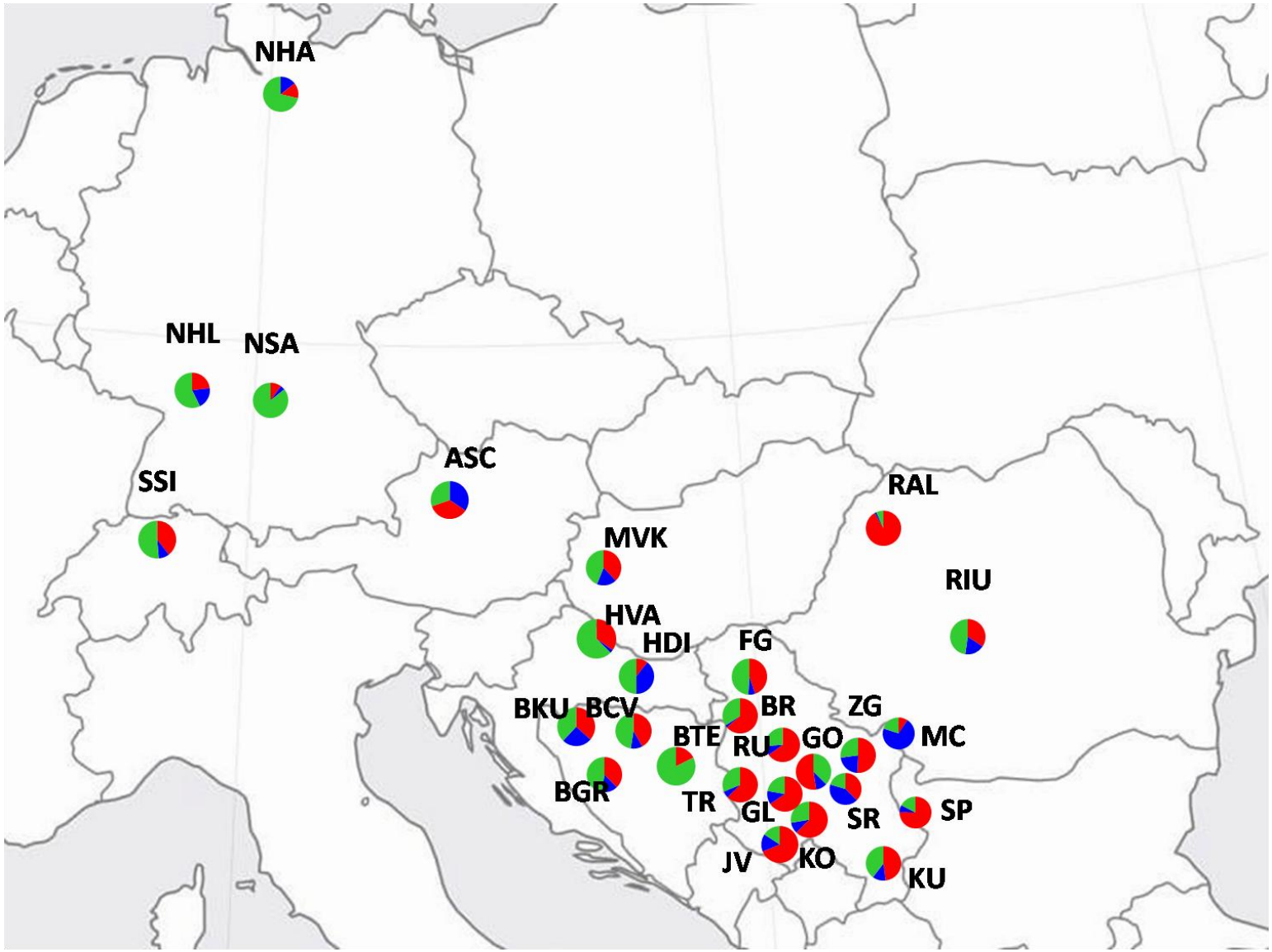



**Слика 4.14.** Утврђивање оптималног броја генетичких група у STRUCTURE анализе са свим испитиваним популацијама на основу дистрибуције постериорних вероватноћа за сваки K (горња слика) и применом Δ*K* методе (доња слика).

Оптимални број генетичких група добијен применом обе методе је био 3 (слика 4.14), а резултати анализе за К = 2, 3, 4 и 5 су приказани на слици 4.15. Дистрибуција 3 генска пула по природним популацијама и провенијеницијама представљеним на локалитетима са којих потичу је представљена на слици 4.16.

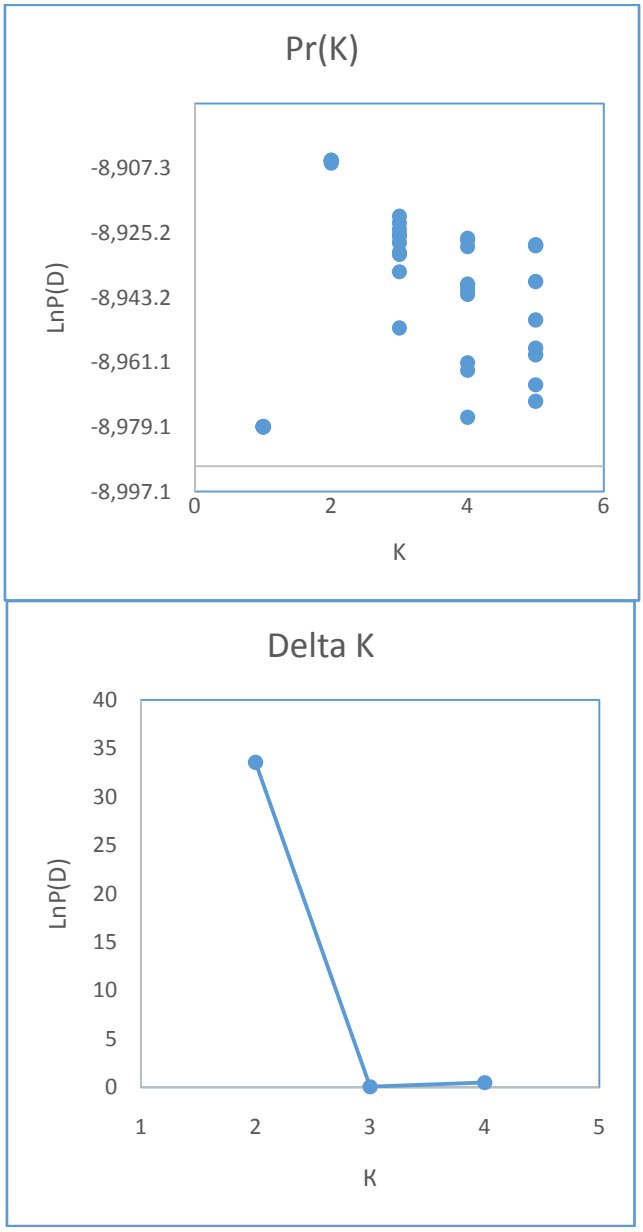



**Слика 4.15.** Резултати STRUCTURE анализе са свим испитиваним популацијама означеним бројевима од 1 до 27 по редоследу датом у табели 1 за К = 2, 3, 4 и 5, респективно

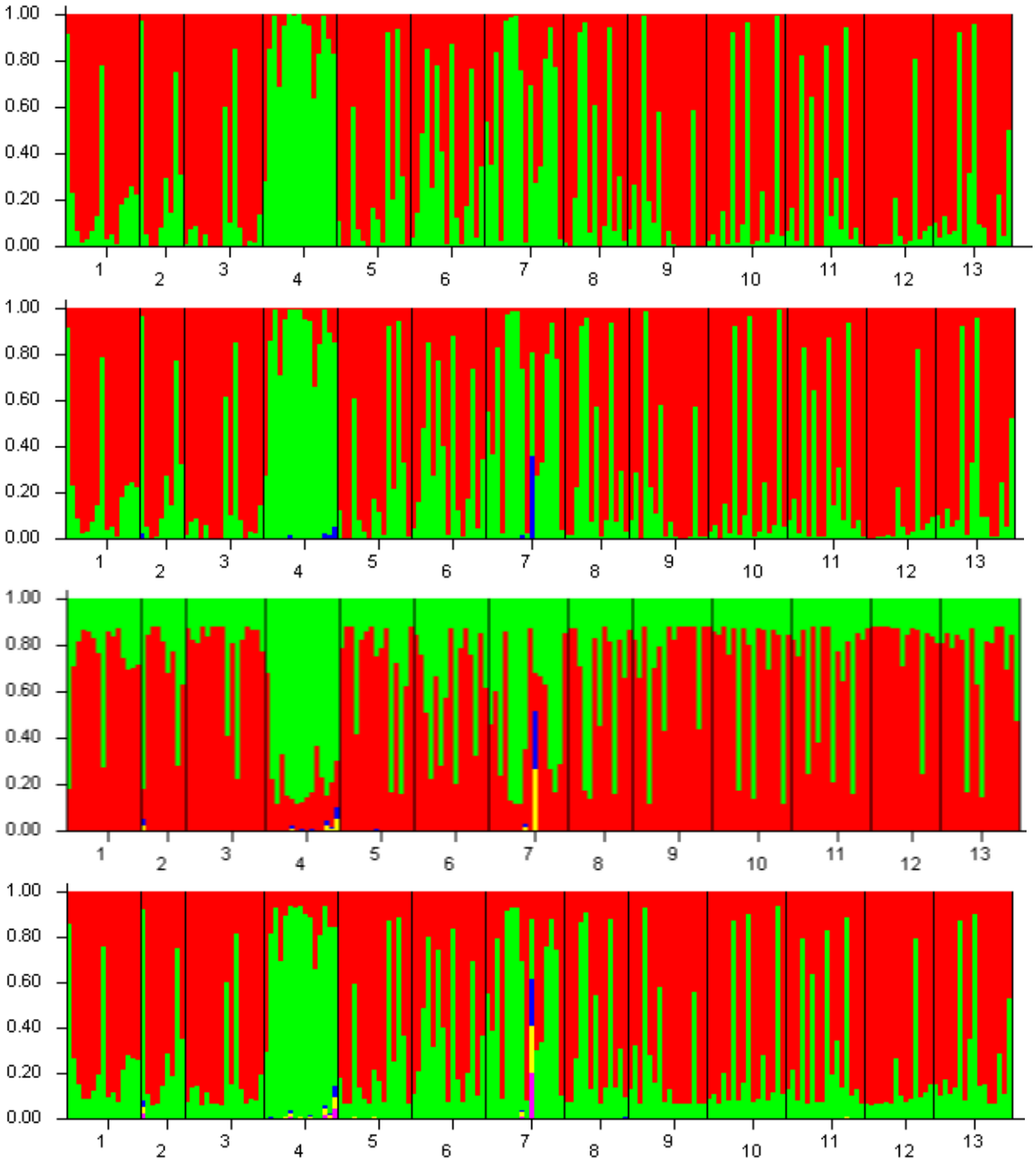



**Слика 4.16.** Дистрибуција 3 генска пула по природним популацијама и провенијеницијама представљеним на локалитетима са којих потичу

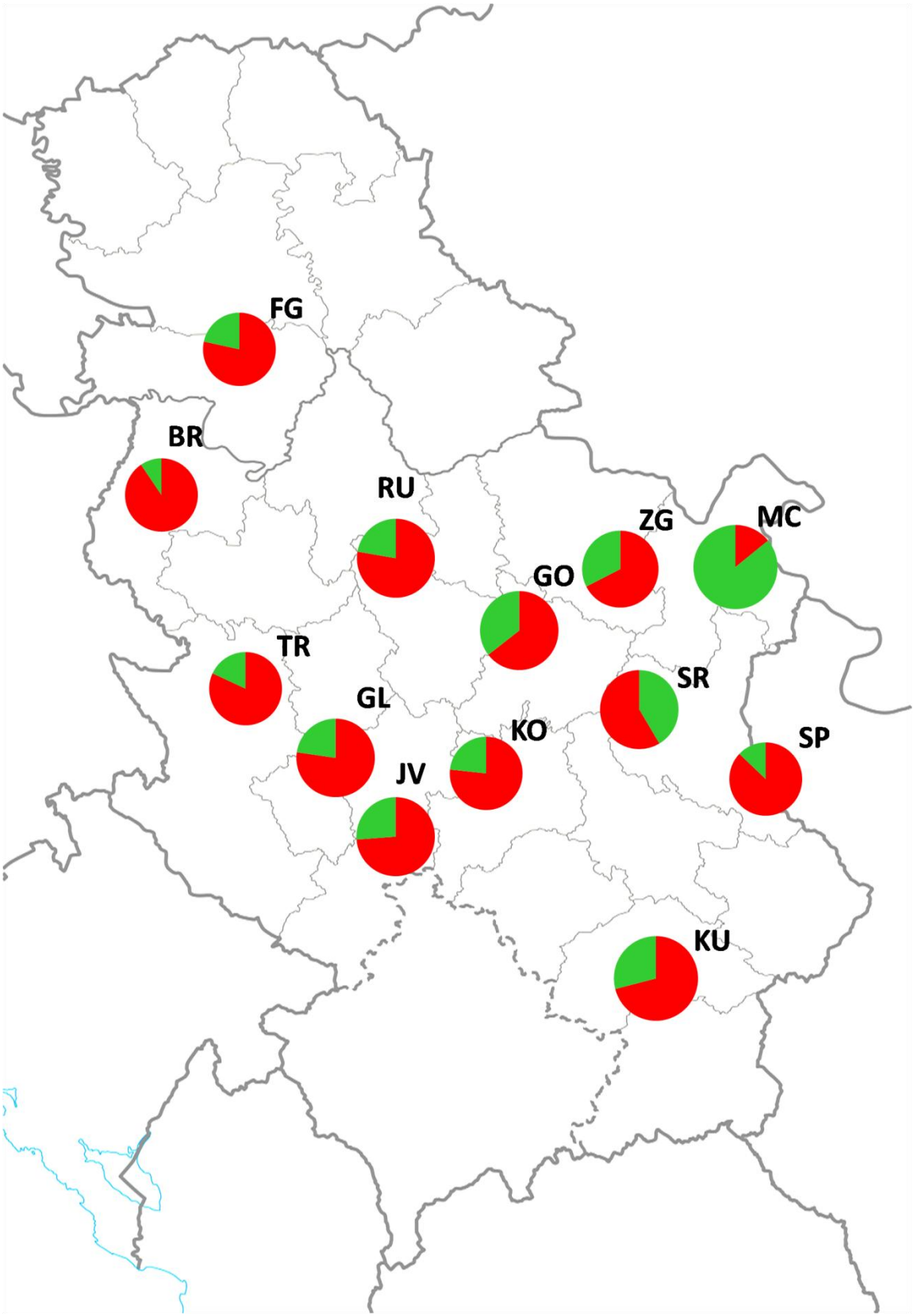
Урађена је још једна STRUCTURE анализа са природним популацијама са подручја Србије са идентичним моделима као и у случају горе наведене анализе, и са преданализом од 500.000 симулација, анализом параметара на сваких 100 корака од укупно 1.000.000 понављања MCMC симулација, и по 10 независних анализа за сваки од задатих K = 1 - 10. С обзиром да се генетичка структура није значајније мењала током анализе почев од K = 2, анализа је прекинута након K = 5. Оптимални број генетичких група добијен применом обе методе је био 2 (слика 4.17), а резултати анализе за K = 2, 3 и 4 су приказани на слици 4.18. Дистрибуција 2 генска пула по популацијама је представљена на слици 4.19.




**Слика 4.17.** Утврђивање оптималног броја генетичких група за STRUCTURE анализу са природним популацијама са подручја Србије на основу дистрибуције постериорних вероватноћа за сваки K (горња слика) и применом $\Delta K$ методе (доња слика)




**Слика 4.18.** Резултати STRUCTURE анализе са природним популацијама са подручја Србије означеним бројевима од 1 до 13 по редоследу датом у табели 1 за K = 2, 3, 4 и 5, респективно




**Слика 4.19.** Дистрибуција 2 генска пула по популацијама са подручја Србије

### 4.3. ЗАКЉУЧАК НА ОСНОВУ МОЛЕКУЛАРНО-ГЕНЕТИЧКИХ АНАЛИЗА

На основу молекуларно-генетичких анализа 328 индивидуа букве (192 пореклом из 13 природних популација са подручја Србије и 136 из 14 европских провенијенција из провенијеничног огледа), применом 12 нуклеарних и 4 хлоропластна микросателита, могу се извући следећи закључци:

1. Све испитиване природне популације букве са подручја Србије се одликују изузетно високим нивоом генетичког диверзитета. Само код популација Јавор и Жагубица је уочен статистички значајан вишак хомозигота. Међутим, вишак хомозигота највероватније није последица инбридинга, већ субструктуре популација (на овај феномен указује и неравнотежа везаности гена која је детектована у релативно великом броју тестова у овим популацијама) или неких других генетичких процеса, што треба додатно испитати на већем узорку. Европске провенијенције букве се, такође, одликују високим нивоом генетичког диверзитета, али се код ових провенијенција уочава изразита неравнотежа везаности гена, у највећем броју случајева, што се може очекивати, с обзиром да се не ради о природним популацијама. Добијене вредности нивоа генетичког диверзитета на нивоу једарног генома у природним популацијама са подручја Србије, као и у европским провенијенцијама из провенијеничног огледа су упоредиве са вредностима детектованим у природним популацијама букве из Европе (нпр., Buiteveld *et al*., 2007; Oddou-Muratorio *et al*., 2010; Kempf и Konnert, 2012; Pluess *et al*., 2015; Westergren *et al*., 2015; Cvrčková *et al*., 2017).
2. На основу параметара генетичке диференцијације између парова популација (Fst) и PCoA анализа, није уочено јасно раздвајање популација из Србије (потенцијално мезијска буква) од осталих европских провенијенција (обична буква).
3. Хијерархијска AMOVA анализа је указала на то да се природне популације букве са подручја Србије могу у малој мери разликовати од провенијенција из Босне и Херцеговине и Хрватске, зато што се нешто виша вредност параметра $F_{CT}$ и нешто нижа вредност параметра $F_{SC}$ добија у анализи у којој се природне популације са подручја Србије посматрају као једна група, а провенијенција из Босне и Херцеговине и Хрватске заједно са осталим испитиваним провенијенцијама из провенијеничног теста као друга група. Међутим, овај налаз се мора узети са резервом, због тога што су код провенијенција из Босне и Херцеговине и Хрватске, које су коришћене у анализама, нарушене полазне претпоставке за извођење анализа, као што је одсуство одсуство неравнотеже везаности гена, девијација од Харди-Вајнбергових очекивања и субструктуре популација. С обзиром да наведене претпоставке задовољавају само 2 популације из провенијеничног огледа (Босна и Херцеговина - Босанска Крупа и Хрватска - Варани камен), и да стога узорак провенијенција са Балканског полуострва, ван подручја Србије, није репрезентативан, као и да у анализе нису биле укључене провенијенције из источног и јужног дела Балканског полуострва, где, према литературним подацима, може постојати мезијска буква (нпр., Magri *et al*., 2006; Gömöry и Paule, 2010), извођење закључака о постојању мезијске букве на целом подручју Србије на основу AMOVA анализа није могуће.
4. Све анализе указују на то да су природне популације са подручја Србије структуиране на нивоу једарног генома, а да се популација Рудник разликује и по генетичком профилу на нивоу хлоропластног генома. Међутим, ови налази могу указивати и на комплексну историју букве на подручју Балкана и

преживљавање неповољних климатских услова током последњег (и/или претходних) леденог доба у више глацијалних рефугијума, које је било праћено њиховом каснијом адмиксијом, што је врло чест случај код биљних врста на Балкану. Поред тога, имајући у виду потенцијално хибридно порекло мезијске букве (нпр., Gömöry и Paule, 2010), за издвајање појединих популација и/или индивидуа букве као засебног таксона (мезијске букве) потребно је у анализе укључити не само једног потенцијалног родитеља (обичну букву), већ и другог потенцијалног родитеља (оријенталну букву). Према наводима Pastorelli *et al*. (2003), исти микросателитски локуси се могу успешно амплификовати и код обичне и код оријенталне букве, при чему се код оријенталне букве обично детектују нови алели, који нису уочени код обичне букве.

5. Резултати STRUCTURE анализе са свим испитиваним популалацијама/провенијенцијама су показали да, иако у целокупном узорку постоје 3 једарна генска пула, популације у којима је: 1) доминантан један од три генска пула, 2) присутно 2 генска пула, и 3) присутно 3 генска пула, су заступљене како у Европи, тако и у Србији. Другим речима, генетички профили популација букве у Србији не одступају значајније од генетичких профила популација букве у Европи.
6. На основу свих резултата молекуларно-генетичких анализа, може се закључити да на подручју Србије није показано постојање мезијске букве као засебне врсте, а уочена генетичка диференцијација популација је највероватније последица изолованости популација током неповољних климатских услова током Квартара и њихове пост-глацијалне адмиксије. Потенцијално присуство популација/индивидуа које би представљале интерспецијске хибриде између обичне и оријенталне букве је могуће утврдити само након укључивања у анализе и оријенталне букве.

## 5. ЗАКЉУЧЦИ

Процена генетичке варијабилности букве из природних популација и провенијеничног теста који је основан у Наставној бази „Мајданпечка домена“, обављена је са циљем утврђивања генетичке диференцијације популација букве са подручја Србије у односу на популације из европског дела ареала.

Истраживања су обављена на нивоу **13 природних популација** (Фрушка гора, Борања, Тара, Рудник, Сењски Рудник, Гоч, Голија, Јавор, Копаоник, Мироч, Жагубица, Стара планина и Кукавица) и **20 провенијенција** букве (5 српских, 5 босанских, 2 хрватске, 3 немачке, 2 румунске и по једна мађарска, аустријска и швајцарска).

На основу спроведених истраживања, може се констатовати следеће:

1. све испитиване популације букве са подручја Србије се одликују изузетно високим нивоом генетичког диверзитета. Европске провенијенције букве се, такође, одликују високим нивоом генетичког диверзитета, али се код ових провенијнција уочава изразита неравнотежа везаности гена, у највећем броју случајева, што се може очекивати, с обзиром да се не ради о природним популацијама. Добијене вредности нивоа генетичког диверзитета, на нивоу једарног генома, у природним популацијама са подручја Србије, као и у европским провенијенцијама, су упоредиве са вредностима које су детектоване у природним популацијама букве из Европе;
2. резултати анализа морфолошких карактеристика листова букве из природних популација показују да **све популације имају интермедијарне карактеристике,** између европске и кавкаске букве, и не показују чисту припадност ни једној од ове две врсте. Ипак, уочава се већа сличност са европском буквом. Анализа варијансе је показала статистички значајне разлике међу популацијама за сва проучавана обележја, али оне не морају бити условљене генофондом саме популације, већ еколошким условима у којима се налазе;
3. резултати анализа морфолошких карактеристика купула и семена букве из природних популација донекле указују на постојање **просторне структуре генетичког диверзитета букве** у Србији, али у потпуности подржавају наводе Мишића (1957) **о постојању висинских екотипова** букве у Србији;
4. разлике добијене у вредностима морфолошких параметара петељке листова из природних популација (дужина петељке, ширина петељке, дебљина петељке, ширина централног цилиндра и дужина централног цилиндра) нису **статистички значајно различите**, изузев у случају Жагубице, где су све вредности, осим дужине петељке која је најмање варијабилна, значајно мање у односу на остале популације;
5. кластеризација провенијенција, урађена на основу морфолошких параметара листова, сакупљених у две сукцесивне године, показује да није дошло до груписања провенијенција из географски блиских подручја, што указује на **екотипски образац генетичечке варијабилности** букве. Такође, није уочена јасна диференцијација српских провенијенција у односу на европске провенијенције;
6. резултати STRUCTURE анализе са свим испитиваним популацијама и провенијенцијама букве су показали да су констована 3 генска пула, која су заступљена како у Србији, тако и у Европи.

**На основу напред изнетог, може се закључити да генетички профили популација букве из Србије значајније не одступају од генетичких профила популација из Европе, што говори да се, на основу анализираног узорка, буква у Србији не може издвојити као посебна врста.**

Јасно дефинисање таксономског статуса букве у Србији биће могуће тек након анализе генетичког профила популација букве из источног и јужног дела Балканског полуострва, где, према новијим литературним подацима, може постојати мезијска буква (Magri *et al*., 2006; Gömöry и Paule 2010).

Поред тога, имајући у виду потенцијално хибридно порекло мезијске букве (Gömöry и Paule 2010), за издвајање појединих популација и/или индивидуа букве као засебног таксона (мезијска буква) потребно је у анализе укључити не само једног потенцијалног родитеља (европску букву) већ и другог потенцијалног родитеља (источну букву).

## 6. ЛИТЕРАТУРА


Asuka Y, Tani N, Tsumura Y, Tomaru N (2004) Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. Molecular Ecology Notes 4:101-103.

Ballian D., Zukić N. (2011): Analysis of the growth of common beech provenances (Fagus sylvatica L.) in the international experiment near Kakanj. Works of the Faculty of Forestry, University of Sarajevo 2: 75-91

Ballian D., Jukić B., Balić B., Kajba D., von Wuehlisch, G. (2015): Fenološka varijabilnost obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) u međunarodnom pokusu provenijencija. Šumarski list, 11–12 (2015): 521–533

Buiteveld J, Vendramin GG, Leonardi S, Kamer K, Geburek T (2007) Genetic diversity and differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands varying in management history. Forest Ecology and Management 247: 98–106.

Chmura D. J., Rozkowski R. (2002): *Variability of beech provenances in spring and autumn phenology*, Silvae Genetica 51(2–3), Germany (123–127)

Comps B., Thiebaut B., Šugar I., Trinajstić I., Plazibat M. (1991): *Genetic variation of the Croatian beech stands* (*Fagus sylvatica* L.): *spatial differentiation in connection with the environment*, Ann. Sci. For. 48 (15–28)

Cvrčková H, Máchova P, Poláková L, Trčková O (2017) Evaluation of the genetic diversity of selected *Fagus sylvatica* L. populations in the Czech Republic using nuclear microsatellites. Journal of Forest Science 63:53–61.

Eriksson G., Ekberg I. (2001). An introduction to forest genetics. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. p. 166.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evoutionary Bioinformatics Online 1:47–50.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. Molecular Ecology 14:2611-2620.

Gailing O, Wuehlisch G von (2004) Nuclear markers (AFLPs) and chloroplast microsatellites differ between *Fagus sylvatica* and *F. orientalis*. Silvae Genetica 53 (3): 105-110.

Gomory D. (2010). Geographic patterns in the reaction of beech provenances to transfer. Proceedings of the Workshop and MC Meeting of the COST Action E52 "Evaluation of Beech Genetic Resources for Sustainable Forestry", Thessaloniki, May 5-7, 2009. p. 90-97.

Gömöry D, Paule L (2010) Reticulate evolution patterns in western-Eurasian beeches. Botanica Helvetica 120:63–74.

Gömöry D., Hynek V., Paule L. (1998): *Delineation of seed zones for European beech* (*Fagus sylvatica* L.) *in the Czech Republic based on isozyme gene markers*, Ann. Sci. For. 55 (425–436)

Gömöry D., Paule L., Vysny J. (2007): *Patterns of allozyme variation in western Eurasian Fagus*, Botanical Journal of Linnean Society 154 (165–174)

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4: 9.

Ivanković M., Bogdan S., Božić G. (2008/a): *Varijabilnost visinskog rasta obične bukve* (*Fagus sylvatica* L.) *u testovima provenijencija u Hrvatskoj i Sloveniji*, Šumarski list 132 (11–12), Zagreb (529-541)

Ivanković M., Bogdan S., Littvay T. (2008/б): *Genetic variation of flushing and winter leaf retention in European Beech provenance test in Croatia*, In: Proceedings – The 8th IUFRO International Beech Symposium organized by IUFRO working party 1.01.07 ”Ecology and Silviculture of Beech”. Nanae, Hokkaido, Japan; Hokkaido Rehabili, Kitahiroshima, Hokaido, Japan (28–30)

Ivanković M., Popović M., Katičić I., Wuehlisch von G., Bogdan S. (2011): *Kvantitativna genetska varijabilnost provenijencija obične bukve* (*Fagus sylvatica* L.) *iz jugoistočne Evpore*, Šumarski list – Posebni broj (25-37)

Ivetić V. (2009): *Izdvajanje regiona provenijencija bukve u Srbiji primenom prostorne analize genetičkog diverziteta*, Doktorska disertacija u rukopisu, Šumarski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd

Jazbec A., Segotic K., Ivankovic M., Marjanovic H., Peric S. (2007): Ranking of European beech provenances in Croatia using statistical analysis and analytical hierarchy process. Forestry 80: 151 - 162

Kang M.S. (2002). Genotype–Environment Interaction: Progress and Prospects. In: Kang, M.S. (eds.). Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding. Louisiana State University, USA. pp. 221-243.

Kempf M, Konnert M (2012) Distribution of genetic diversity in Fagus sylvatica at the north-eastern edge of the natural range. Silva Fennica 50:17.

Kraj W, Sztorc A (2009) Genetic structure and variability of phenological forms in the European beech (Fagus sylvatica L.). Annals of Forest Science 66:203.

Lefèvre S, Wagner S, Petit RJ, Lafontaine G (2012) Multiplexed microsatellite markers for genetic studies of beech. Molecular Ecology Resources 12:484-491.

Magri D, Vendramin GG, Comps B, Dupanloup I, Geburek T, Gömöry D, Latalowa M, Litt T, Paule L, Roure JM, Tantau I, van der Knaap WO, Petit RJ, de Beaulieu J-L (2006) Palaeobotanical and genetic data outline the Quaternary history of European beech populations. New Phytologist 171:199–222

Nielsen Ch. N., Jorgensen F.V. (2003): *Phenology and diameter increment in seedlings of European beech* (*Fagus sylvatica* L.) *as affected by different soil water contents: variation between and within provenances*, Forest Ecology and Management 174 (233-249)

Oddou-Muratorio S, Vendramin GG, Buiteveld J, Fady B (2010) Population estimators or progeny tests: what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci? Conservation Genetetics 10:1343.

Paule L. (1995): *Gene conservation in European beech* (*Fagus sylvatica* L.), Forest Genetics 2 (3), (161-170)

Pastorelli R, Smulders MJM, Van’t Westende WPC, Vosman B, Giannini R, Vettori C, Vendramin GG (2003) Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. Molecular Ecology Notes 3:76-78.

Pluess AR, Frank A, Heiri C, Lalague H, Vendramin GG, Oddou-Muratorio S (2015) Genome–environment association study suggests local adaptation to climate at the regional scale in Fagus sylvatica. New Phytologist 210:589–601.

Pluess AP, Määttänen K (2013) Characterization of eighteen novel microsatellite markers and multiplex PCR protocol for Fagus sylvatica. Conservation Genetics Resources 5:311–314.

Peakall R, Smouse PE (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6:288–295.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959.

Salehi Shanjani P, Vendramin GG, Calagari M (2010) Genetic diversity and differentiation of *Fagus orientalis* Lipsky in Hyrcanian forests revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. Conservation Genetics 11:2321–2331.

Sebastiani F, Carnevale T, Vendramin GG (2004) A new set of mono- and dinucleotide chloroplast microsatellites in Fagaceae. Molecular Ecology Notes 4:259 –261.

Стојнић С. (2013): Варијабилност анатомских, физиолошких и морфолошких карактеристика различитих провенијенција букве у Србији. Докторска дисертација у рукопису. Шумарски факултет, Универзитета у Београду, Београд

Stojnić S., Pilipović A., Šijačić-Nikolić M., Vilotić D., Orlović S. (2010a). Growth variability of Beech in international provenance trials in Serbia. International scientific conference: Forest ecosystems and climate changes. Book of abstracts, Belgrade, 9-10th March 2010, 40.

Stojnic S., Orlovic S., Pilipovic A., Galovic V., von Wühlisch G. (2010b). Variability of morphological and physiological parameters of different European Beech (*Fagus sylvatica* L.) provenances in international provenance trial in Serbia. COST E52 “Evaluation of Beech Genetic Resources for Sustainable Forestry” Final Meeting. Book of abstracts. Burgos, 4-6th May 2010, 22.

Stojnic S., Orlovic S., PilipovicA., Sijacic-Nikolic M., Vilotic D., Katanic M. (2010c). Variability of anatomical-morphological traits of different Beech provenances significant for adaptability to climate changes. International Scientific Conference: "Forestry: Bridge to the Future", Book of abstracts, Sofia, 13-15th May, 2010, 186.

Stojnić S., Orlović S., Pilipović A., Kebert M., Šijačić-Nikolić M., Vilotić D. (2010d). Variability of physiological parameters of different European beech provenances in international provenance trials in Serbia. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica* 6, 135-142.

Stojnić S., Orlović S., Pilipović A., Kebert M., Klašnja B. (2011). Variability of net photosynthesis and stomatal conductance of *Populus* x *euramericana* cl. *Pannonia* rooted cuttings on two landfill sites. In: Proceedings of the "STREPOW" international workshop, Andrevlje-Novi Sad, February 23-24, 2011. p 307-312.

Stojnić S., Orlović S., Pilipović A., Vilotić D., Šijačić-Nikolić M., Miljković D. (2012). Variation in leaf physiology among three provenances of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in provenance trial in Serbia. *Genetika* 44(2), 341-353.

Šijačić-Nikolić M., Milovanović J., Pilipović A., Orlović S. (2009). Varijabilnost preživljavanja biljaka različitih provenijencija bukve u okviru evropskih provenijeničnih testova u Srbiji. Zbornik apstakata sa IV kongresa genetičara Srbije, 1-5. jun 2009. godine, 258.

Šijačić-Nikolić M., Milovanović J. (2010). Konzervacija i usmereno korišćenje šumskih genetičkih resursa. Univerzitet u Beogradu Šumarski fakultet. Beograd. s. 200.

Šijačić-Nikolić M., Milovanović J., Nonić M., Knežević R., Babić V. (2012). Ecotypical characterization of genetic variation of beech provenances from South-Eastern Europe based on the morphometric characteristics of leaves. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 106, 197-214.

Šijačić-Nikolić M., Milovanović J., Nonić M., Knežević R., Stanković D. (2013): *Leaf morphometric characteristics variability of different beech provenances in juvenile divelopment stage*. Genetika Vol. 45, No. 2: 369-380

Tanaka K, Tsumura Y, Tomaru N (1999) Development and polymorphism of microsatellite markers for *F. crenata* and the closely related species, *F. japonica*. Theoretical and Applied Genetics 99(1): 11-15.

Van Oosterhout C, Hutchinson, WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4:535–538.

Weising K, Gardner RC (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome 42:9–19.

Westergren M, Bozic G, Ferreira A, Kraigher H (2015) Insignificant effect of management using irregular shelterwood system on the genetic diversity of European beech (*Fagus sylvatica* L.): A case study of managed stand and old growth forest in Slovenia. Forest Ecology and Management 335:51–59.

von Wuehlisch G. (2004). Series of International Provenance Trials of European Beech. Proceedings from the 7th International Beech Symposium IUFRO Research Group 1.10.00 "Improvement and Silviculture of Beech". 10-20 May 2004, Tehran, Iran. p. 135-144.

von Wuehlisch G., Krusch D., Muhs H.J. (1995): *Variation in temperature sum requirement for flushing of beech provenances*, Silvae Genetica 44 (5-6), Frankfurt (343-346)

von Wuehlisch G., Ballian D., Bogdan S., Forstreuter M., Giannini R., Götz B., Ivankovic M., Orlovic S., Pilipovic A., Sijacic Nikolic M. (2010). Early results from provenance trials with European beech established 2007. COST E52 "Evaluation of Beech Genetic Resources for Sustainable Forestry" Final Meeting. Book of abstracts. 4-6th May 2010, Burgos, Spain. p. 21.

Wortemann R, Herbette S, Barigah TS, Fumanal B, Alia R, Ducousso A, Gomory D, Roeckel-Drevet P, Hevé Cochard H (2011) Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe. Tree Physiology 31:1175–1182.