



**HAL**  
open science

## Odgovor genoma na abioticki stres: primjer serpentinofta u centralnoj Bosni

Fatima Pustahija

► **To cite this version:**

Fatima Pustahija. Odgovor genoma na abioticki stres: primjer serpentinofta u centralnoj Bosni. Agricultural sciences. Université Paris Sud - Paris XI; Univerzitet u Sarajevu, 2011. Bosnian. NNT: 2011PA112187. tel-00769399

**HAL Id: tel-00769399**

**<https://theses.hal.science/tel-00769399>**

Submitted on 1 Jan 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERZITET U SARAJEVU – PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

**UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI – FACULTÉ DES SCIENCES**

**Doktorat prezentiran za dobijanje titule doktora bioloških nauka  
Univerziteta u Sarajevu**

**Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur en Sciences  
de l'Université Paris-Sud XI Orsay**

*Mr. Sci. Fatima PUSTAHIJA*

**ODGOVOR GENOMA NA ABIOTIČKI STRES: PRIMJER  
SERPENTINOFITA U CENTRALNOJ BOSNI**

**REPONSE DU GENOME AUX STRESS ABIOTIQUES: LE CAS  
DES PLANTES SERPENTINOPHYTES EN BOSNIE CENTRALE**

**Sarajevo, 6. oktobar 2011.**

**Soutenu le 6 octobre 2011 devant la commission d'examen:**

**Prof. dr. DRON Michel, Université Paris Sud, ispitivač - examinateur**

**Prof. dr. MAKSIMOVIĆ Milka, Univerzitet u Sarajevu, predsjednik – president**

**Prof. dr. MEĐEDOVIĆ Safer, Univerzitet u Sarajevu, komentor – co-directeur**

**Prof. dr. STEVANOVIĆ Vladimir, Univerzitet u Beogradu, izvještavač – rapporteur**

**Prof. dr. SILJAK-YAKOVLEV Sonja, Université Paris Sud, komentor – co-directeur**

**Prof. dr. ZOLDOŠ Vlatka, Univerzitet u Zagrebu, izvještavač – rapporteur**

*Mojim roditeljima*

## ZAHVALE

Posebnu zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr. Sonji Šiljak-Yakovlev (UMR 8079 CNRS-AgroParisTech-UPS, Université Paris Sud) i prof. dr. Saferu Međedoviću (Šumarski fakultet Univerziteta u Sarajevu) na ukazanom povjerenju, razumijevanju, nesebičnoj podršci, savjetima i svakodnevnim ohrabrivanjima tokom izrade ovog rada. Hvala Vam što ste mi otvorili vrata i "zarazili" me ljepotama čarobnog svijeta citogenetike i fiziologije.

Zahvaljujući razumijevanju i podršci kolektiva Šumarskog fakulteta u Sarajevu, bila sam u mogućnosti završiti najveći dio praktičnog rada doktorata u Laboratoriji za ekologiju, sistematiku i evoluciju u Orsay-u.

Također, veliku zahvalnost dugujem kolegama iz UMR 8079 CNRS-AgroParisTech-UPS Ecologie, Systématique et Evolution, Département "Biodiversité, Systématique, Evolution" koji su me, od prvog dana mog boravka, prihvatili u svoj tim kao ravnopravnog člana i pružili mi svu stručnu i naučnu podršku kad god je to bilo potrebno.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr. Michel Dron, Direktor "Doktorske škole" Univerziteta Paris-Sud kojoj sam pripadala. Svojim nesebičnim savjetima pomogao mi je u generalnoj orijentaciji tokom izrade doktorata, ali također i u rješavanju svih administrativnih procedura vezanih za cotutelle doktorat.

Na uloženom trudu i vremenu, pažljivom čitanju teksta i korisnim kritikama zahvaljujem izvještaičima: akademiku prof. dr. Vladimiru Stevanoviću (Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu) i prof. dr. Vlatki Zoldoš (Prirodoslovno matematički fakultet Univerziteta u Zagrebu).

Iskrenu zahvalnost dugujem predsjednici komisije prof. dr. Milki Mašimović (Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu) na čitanju konačne verzije disertacije i brojnim korisnim sugestijama.

Srdačno zahvaljujem dragim prijateljima i kolegama doc. dr. Neđadu Bašiću i doc. dr. Faruku Boguniću (Šumarski fakultet Sarajevo); mr. Erni Karaliji, doc. dr. Edini Muratović i doc. dr. Adisi Parić (Prirodno-matematički fakultet u Sarajevu); dr. Mariji Editi Šolić (Institut „Planina i more“, Makarska), stručnoj savjetnici Sabaheti Abadžić (Zemaljski muzej BiH u Sarajevu) za nesebičnu pomoć u svim fazama izrade ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem prijateljima i kolegama koji su mi pružili pomoć tokom realizacije praktičnog dijela doktorskog rada: Odile Robin i dr. Christiane Raquin (UMR 8079 CNRS-AgroParisTech-UPS Orsay), prof. dr. Spencer Brown i dr. Mickael Bourge (Institut des sciences vegetales, CNRS, Gif-sur-Yvette); prof. dr. Daliboru Ballianu i ing. Emiri Hukjić (Šumarski fakultet Univerziteta u Sarajevu), prof. dr. Borivoju Galiću i prof. dr. Dubravki Šoljan (Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu); prof. dr. Branki Stevanović (Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu), ing. Jasminku Kapiću (Žepče); gđi Mariji Kulundžić (Makarska); gosp. Ramizu Sariću (Sarajevo); mr. Arifu Salkiću i njegovom timu na Metalurškom institutu „Kemal Kapetanović“ Univerziteta u Zenici.

Izrada doktorata ovog tipa (cotutelle) ne bi bila moguća bez pomoći Francuske ambasade u BiH (Kulturni centar); Univerziteta Paris-Sud za cotutelle doktorante; Regiona Ile de France (SETCI R232) za cotutelle doktorante; projekta NATO-Science For Peace and Security Programme (Collaborative Linkage Grant n° 983838); Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France); i EcoNet projekta n° 16214QE.

I na kraju, najtoplije zahvaljujem svojoj porodici koja je uvijek bila uz mene i bez čije podrške sigurno ne bih mogla okončati ovaj rad.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Ultramafitne stijene .....	2
1.1.1. Rasprostranjenje serpentinskih podloga na području Bosne .....	4
1.1.2. Karakteristike serpentinskih habitata .....	5
1.1.2.1. Klima .....	5
1.1.2.2. Geološko-petrografske karakteristike .....	6
1.1.2.3. Specifičnost i tipovi serpentinskih tala u Bosni .....	7
1.1.3. "Serpentinski sindrom" .....	9
1.1.3.1. Serpentin i biljke .....	11
1.1.3.2. Pregled istraživanja serpentinske flore i vegetacije u Bosni .....	13
1.1.3.3. Veličine genoma biljaka na serpentinima .....	15
1.2. Biljke i teški metali .....	17
1.2.1. Odgovor biljke na stres .....	20
1.3. Bijeli narcis ( <i>Narcissus poeticus</i> L.) .....	21
1.3.1. Karakteristike vrste .....	22
1.3.2. Citogenetičke karakteristike roda <i>Narcissus</i> .....	23
1.4. Ciljevi .....	26
2. MATERIJALI I METODE .....	27
2.1. Veličina nuklearnog genoma serpentinofita .....	27
2.1.1. Određivanje ukupne nuklearne količine DNK .....	28
2.2. Analiza ukupnih koncentracija Ni, Co, Mn, Fe, Ca i Mg u biljnom materijalu i tlu .....	31
2.2.1. Određivanje pH rizosfere uzorkovanih bijelih narcisa .....	33
2.2.2. Određivanje sadržaja Ni, Co, Mn, Fe, Mg i Ca u biljnom materijalu .....	33

2.2.3. Određivanje sadržaja Ni, Co, Mn, Fe, Mg i Ca u tlu .....	34
2.2.4. Preračunavanje očitanih vrijednosti na AAS .....	36
2.3. Citogenetičke metode .....	36
2.3.1. Priprema hromosoma .....	37
2.3.2. Bojenje meristema korjenčića po Feulgen metodi i određivanje kariotipa klasičnom metodom .....	37
2.3.3. Bojenje srebro-nitratom (AgNO <sub>3</sub> ) .....	38
2.3.4. Molekularno-citogenetičke metode – Fluorohrom bojenje hromosoma .....	39
2.3.4.1. Chromomycin A <sub>3</sub> bojenje .....	40
2.3.4.2. Hoechst 33258 bojenje.....	40
2.3.4.3. Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH) .....	41
2.3.5. Analiza preparata i priprema fotodokumentacije .....	45
2.4. Statistička obrada podataka .....	46
3. REZULTATI.....	47
3.1. Analizirane biljne vrste na krajnjem sjeverozapadnom arealu serpentina na Balkanu ...	47
3.1.1. Veličina genoma i serpentinofite .....	47
3.1.2. Odnos veličine genoma i nekih karakteristika serpentinofita .....	50
3.2. <i>Narcissus poeticus</i> i neki biogeni elementi.....	52
3.3. Citogenetičke osobnosti <i>Narcissus poeticus</i> na zapadnom Balkanu .....	56
3.3.1. Osnovne karakteristike kariotipa.....	56
3.3.2. Organizacija heterohromatina.....	58
3.3.3. Fizikalno mapiranje rDNK .....	61
3.3.4. Specifičan sistem B hromosoma kod <i>N. poeticus</i> .....	61
3.3.5. Odstupanja od standardnih karakteristika kariotipa.....	63
3.3.6. Procjena veličine genoma.....	64
4. DISKUSIJA .....	66

4.1. Neke karakteristike biljnih vrsta na krajnjem sjeverozapadnom arealu ofiolitske zone Balkanskog poluostrva .....	66
4.1.1. Prisutnost različitih nivoa ploidijske i B hromosoma kod nekih rodova .....	73
4.2. Interakcija bijelog narcisa sa pH pripadajuće rizosfere i nekim biogenim elementima ....	74
4.2.1. pH tala istraživanih populacija .....	75
4.2.2. Mangan, nikl, kobalt i željezo.....	76
4.2.3. Magnezij, kalcij i njihov molarni odnos .....	80
4.3. Citogenetika vrste <i>Narcissus poeticus</i> .....	84
4.3.1. Karakteristike kariotipa i organizacija heterohromatina.....	84
4.3.2. Organizacija rDNK i heterohromatina na B hromosomima .....	85
4.3.3. Prirodni triploidi vrste <i>Narcissus poeticus</i> .....	87
4.3.4. Devijantni oblici kariotipa .....	89
4.3.5. Količina DNK se povećava usljed prisustva triploidije i B hromosoma .....	89
6. Synthèse de la thèse .....	91
7. ZAKLJUČCI.....	106
8. RÉSUMÉ.....	107
9. SUMMARY .....	108
10. LITERATURA.....	109
PRILOG 1. ....	126

# 1. UVOD

Iako pokrivaju manje od 1% Planete Zemlje (Coleman i Jove, 1992), serpentinizirane podloge predstavljaju unikatne habitate za razvoj specijalizirane flore, obično veoma bogate endemičnim vrstama i vrstama koje često pokazuju specifičnu adaptivnu morfologiju. Područje Balkana, kao najveća serpentinska zona u Europi, se po tome ne razlikuje od drugih velikih svjetskih serpentinskih zona, i predstavlja jedan od centara florističke diferencijacije i specijacije. Zbog toga ova područja predstavljaju stalni interes za istraživače iz različitih oblasti, ali i izazov kako ih pravilno zaštititi i konzervirati (Riter-Studnička, 1963; Stevanović *et al.*, 2003; Chiarucci i Baker, 2007).

Serpentinske zone Balkana ekstenzivno su istraživane tokom 19-og vijeka te su otkrivene brojne vrste. Međutim, u Bosni i Hercegovini su prva veća, višegodišnja i systemska istraživanja serpentinske flore i habitata izvršena od strane Hilde Riter-Studnička. Ova autorica je svoje rezultate objavila u više načinih radova u drugoj polovini 20. vijeka. Nažalost, iako je bilo iskazano određeno interesovanje (Beus, 1980 i 1986; Redžić, 1988; Vojniković, 2006), ovaj prirodni fenomen i bogatstvo flore na serpentinima u BiH tokom proteklih 40 godina nisu značajnije istraživani. Kao doprinos poznavanju ovih specifičnih habitata i biljnih vrsta koje tu obitavaju, odlučili smo se za citogenetički pristup, koji omogućava brzi *screening* vrsta na serpentinskim podlogama, količinu nuklearne DNK, identifikaciju broja hromosoma te prisustvo hibrida, različitih nivoa ploidije i prekobrojnih hromosoma (B hromosoma). Ovaj pristup, kao dio dinamike u uspostavljanju DNK baze na Balkanu (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2010), može mnogo pomoći u evaluaciji i konzervaciji biodiverziteta biljnog svijeta u Bosni i Hercegovini.



## 1.1. Ultramafitne stijene

Ultramafitne (ultrabazične, serpentinske, peridotitske) stijene su magmatske stijene koje su karakterizirane vrlo malim sadržajem silicijuma (manje od 45%), više od 18% magnezij oksida, visokim nivoom željeznih oksida, niskim sadržajem kalija, i najčešće sa više od 90% mafičnih minerala (tamno obojenih, sa visokim koncentracijama magnezija i željeza). Serpentinizirane stijene su distribuirane na cijeloj Planeti, u svim klimatskim zonama i predstavljaju oko 13% globalnih geoloških supstrata (Sequeira i Pinto da Silva, 1991; Coleman i Jove, 1992). Ultramafitne stijene grade specijalizirane habitate s ekstremnim edafskim uvjetima i često imaju jedinstvene biljne zajednice i „ostrva“ biodiverziteta sa brojnim ugroženim i endemičnim vrstama. Zbog svih ovih karakteristika, serpentine su interesantni za biljne ekologe, evolucioniste i ekofiziologe te istraživače u domenu genetike i evolucije (Stevanović *et al.*, 2003; Chiarucci i Baker, 2007). Na Balkanu serpentinska zona pokriva velika područja, površine od 1300 km<sup>2</sup>, tako da pored Urala predstavlja najveći masiv ultrabazičnih stijena u Evropi, i to bilo u obliku velikih blokova ili malih stijena (Riter-Studnička, 1963; Stevanović *et al.*, 2003).

Istočnomediterranski serpentinski region se može podijeliti na „Zapadni region“, koji uključuje Balkan (Bosna i Hercegovina, Srbija, Albanija, FYR Makedonija, Grčka, Bugarska) i na „Istočni region“ (Turska, Sirija, Kipar), gdje su ofioliti uglavnom iz razdoblja Krede. Metamorfni slojevi balkanskih ofiolita su uglavnom formirani u vrijeme srednje jure, te postoji više subparalelnih ofiolitskih pojaseva, koji sistematski pokazuju različit kemijski sastav. Jedna od grana Alpsko-Himalajskog orogenskog pojasa se pruža jugoistočno od Alpa preko Dinarida u Hrvatskoj, Bosni i Srbiji, i potom južno kroz Albanide i Helenide, i dalje. Unutar Dinarida su uočeni subparalelni ofiolitski pojasi: jugozapadni Dinarski ofiolitski pojas *sensu stricto* (DB); centralni Vardarski zapadni pojas (VZWB), te sjevernoistočni, kao glavna Vardarska zona (Fig.

1). Svi ovi pojasi su uglavnom sastavljeni od ofiolitskog melanža, koji uključuje terigenske sedimentarne stijene (nastale erozijom stijena i zemljišta), male količine silikata i krečnjaka, zajedno sa bazaltom, dijabazom, različitim gabrovima i ultramafitnim stijenama. Ofiolitske stijene su različite veličine: od malih blokova do velikih masiva sa melanžom (Pamić, 1964; Pamić *et al.*, 2002; Robertson, 2004; Bazylev *et al.*, 2009).

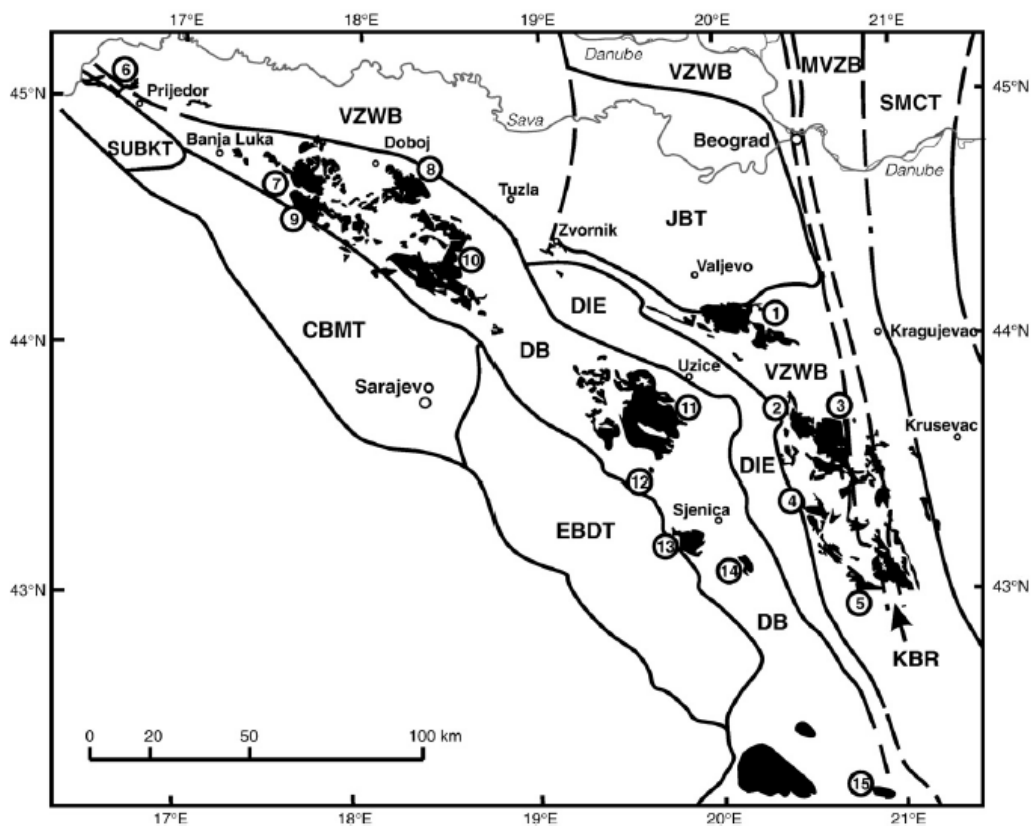


Fig. 1. Pozicija peridotitskih masiva u geodinamičkom okviru regiona. Ofiolitski pojasi i okolni tereni: DB – Dinarski ofiolitski pojas; VZWB – Vardarski zapadni pojas; MVZB – glavni Vardarski pojas; DIE – Drina-Ivanjica element; KBR – Kopaonik blok i brazda; JBT – Jadranski blok; SMCT – Srpsko-Makedonski blok; EBDT – istočno Bosansko-Durmitorski teren; CBMT – Teren centralno-bosanskih planina; SUBKT – Sana-Una-Banja-Kordun teren. Ultramafitni masivi, kompleksi i tijela: 1-Maljen; 2-Troglav; 3-Stolovi; 4-Trnava; 5-Banjska; 6-Kozara; 7-Čavka; 8-Bosanski Ozren; 9-Borja; 10-Konjuh; 11-Zlatibor; 12-Bistrica; 13-Sjenički Ozren; 14-Tuzinje; 15-Brezovica. Dinarski pojas se proteže kroz Albaniju do zapadne Grčke i vjerovatno predstavlja ostatak Dinarsko-Mirdita-Pindos "Okeana" (Prema Bazylev *et al.*, 2009).

Ultramafitna nalazišta u Bosni su brojna, ali raštrkana. Veći i manji kompleksi se protežu u vidu lanca od Prijedora do Rudog.

### 1.1.1. Rasprostranjenje serpentinskih podloga na području Bosne

Bosanska ultramafitna zona se proteže u skoro neprekinutom lancu od sjeverozapada ka jugoistoku, te je samo mjestimično prekrivena mlađim naslagama. Glavni lanac, prekinut u dolini Vrbasa, počinje od Kozara planine i proteže se do Kladnja i Olova. Potom nastupa veći prekid, da bi se opet pojavio u istočnoj Bosni oko Višegrada i Rudog, odakle se nadovezuje na veliki serpentinski masiv Zelengore u Srbiji (Fig. 1 i 2).

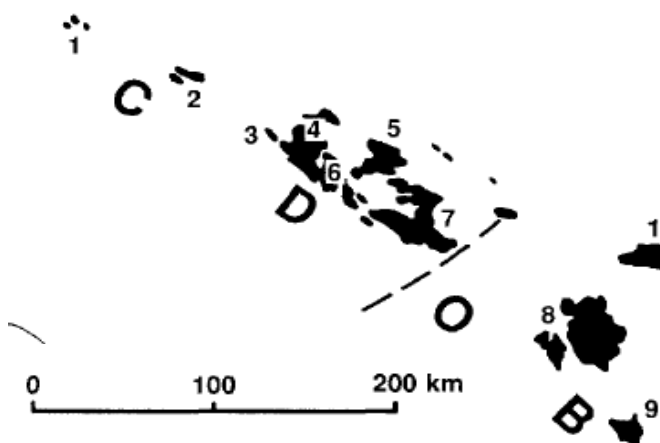


Fig. 2. Prikaz Centralnog Dinarskog ofiolitskog pojasa (CDOB). Individualni masivi: 1 – Banija, 2 – Kozara, 3 – Vrbanja-Čelinac-Skatavica-Šnjegotinja, 4 – Ljubić-Čavka, 5 – Bosanski Ozren, 6 – Borja, 7 – Krivaja-Konjuh, 8 – Varda-Tara-Zlatibor, 9 – Sjenički Ozren (Prema Lugović *et al.*, 1991).

Pored ovog, prisutni su i sporedni lanci: planina Ozren, područje oko Prnjavora (Kalesija), Zvornika i na obodima Majevice (Kišpatić, 1897; Riter-Studnička, 1963).

Na osnovu morfoloških osobina pojedinih kompleksa (prvenstveno reljefa i debljine zemljišnog sloja), serpentinska nalazišta se u Bosni mogu podijeliti u četiri skupine:

1. Nalazišta u zapadnom predjelu serpentinske zone, oko Prijedora i Banja Luke, karakterišu se malom nadmorskom visinom (do 400 m), blagim nagibom, dubljim tlama, te osobitost serpentinske flore ne dolazi do izražaja.

2. Skupini prelaznog tipa pripadaju nalazišta na Borje planini i Ozrenu te područje koje ih povezuje (jugoistočno od Teslića preko Maglaja do Ozrena). Brda su ovdje nešto viša (i preko 1000 m), sa mješavinom dubokih i plitkih tala te golog supstrata. Karakteristična serpentinska flora je mjestimično dobro razvijena.
3. Treću skupinu čine nalazišta koja se protežu sjeverozapadno od Žepča prema Borje planini te područje oko srednjeg toka Gostović potoka i Krivaje. Ova skupina se odlikuje surovim reljefom i prisustvom tipične serpentinske flore. Karakterišu se planinskim lancima visokim preko 1000 m nadmorske visine, duboko usječenim riječnim dolinama, strmim i skeletnim padinama.
4. Serpentinska nalazišta oko Višegrada i Rudog se uglavnom karakterišu grubim i skeletnim goletima, gdje vladaju izrazito kserotermni uvjeti.

## **1.1.2. Karakteristike serpentinskih habitata**

### **1.1.2.1. Klima**

Prema Riter-Studnička (1963), serpentinska zona Bosne se karakteriše prisustvom umjereno kontinentalne klime sa dosta oštrim zimama i toplim ljetima, uz najveće količine padavina u vrijeme razvoja vegetacije. Klima je prilično ujednačena, jer se serpentinska zona prostire paralelno sa visokim planinama vododjelnice. Međutim, primjećuje se postepeno povećavanje zimskih i ljetnih temperatura te smanjenje oborina idući od zapada prema istoku. Ipak, ova klimatska pojava se ispoljava samo u serpentinskoj zoni u Istočnoj Bosni, dok se u prve tri zone ne ispoljava značajnije zbog prisustva visokih planina, koje ih odvajaju, prema istoku.

Prema Riter-Studnička (1963), na bosanskim serpentinskim zonama je najhladniji mjesec januar (srednje minimalne temperature), a najtopliji juli (srednje maksimalne

temperature). Prisustvo kasnih mrazeva (do aprila) štetno djeluje na vegetaciju na serpentinitima. Prve tri skupine bosanskih serpentina se karakterišu godišnjim oborinama od preko 1000 mm, dok je na istoku prisutan nešto niži godišnji prosjek. Uočavaju se dva temperaturna maksimuma: glavni u mjesecu junu i sporedni u oktobru. U suštini, maksimum oborina je tokom ljeta. Najmanji broj dana sa snijegom i kišom je prisutan u istočnoj serpentinskoj zoni. Važan klimatski parametar je i prisustvo magle, koja povećava vlažnost u zraku i time veoma utiče na biljni pokrov. Broj dana sa maglom nije velik i uglavnom se odnosi na jesenski i zimski period, s izuzetkom okoline Kladnja, gdje je najviše maglovitih dana tokom juna.

Iz navedenog se može zaključiti da je klima na većini serpentinskih nalazišta u Bosni srednjoeuropskog karaktera. Prve tri serpentinske zone se karakterišu i dodatnim uticajem klime Posavine, naročito u pogledu količine oborina. Kompleksi u istočnoj Bosni se karakterišu izraženijom kontinentalnom klimom.

### **1.1.2.2. Geološko-petrografske karakteristike**

Ultramafitne stijene se karakterišu malim procentom  $\text{SiO}_2$  i sa minimalnih 70% minerala feromagnezij silikata, te su uglavnom građene od piroksena i olivina, koji je slabije ili jače serpentiniziran. Zbog toga se ove stijene u petrografiji nazivaju peridotitima. Pod uticajem hidrotermalnih procesa peridotiti su slabije ili jače serpentinizirani, a čisti serpentiniti su rijetki. Trošenjem se peridotiti raspadaju u grubi, skeletni detritus, a serpentiniti u lističave pločice. Kao krajnji produkt erozije ovih stijena nastaju žuta ili crvena tla. Uglavnom su vrlo ujednačenog kemijskog sastava i sastoje se iz Si, Mg i Fe, dok su ostali elementi (Cr, Mn, Co i Ni) prisutni u neznatnim količinama. U mineralogiji je poznato do 20 varijeteta tala koji pripadaju serpentinskoj grupi (Riter-Studnička, 1963; Proctor i Woodel, 1975; Kruckeberg, 1984; Brady *et al.*, 2005).

### 1.1.2.3. Specifičnost i tipovi serpentinskih tala u Bosni

Klima je osnovni faktor od kojeg zavisi tip tla koji će se razviti na serpentinskoj podlozi. Ultramafitna (serpentinska) tla, s obzirom na njihove ekstremne fizičko-kemijske karakteristike, predstavljaju negostoljubive habitate i često su nepovoljni za normalan rast biljke. Ova tla su plitka i kamenita sa siromašnom strukturom zemljišta, visokom poroznošću i visokom hidrauličnom provodljivošću. Svi ovi faktori mogu voditi slobodnoj drenaži ovih tala rezultirajući smanjenjem sadržaja (nizak kapacitet zadržavanja) vode (Proctor i Woodell, 1975). Sa kemijskog aspekta, ultramafitna tla obično sadrže male količine esencijalnih nutrijenata (N, P, K, S, Ca) i visoke koncentracije Mg, Fe, Mn i drugih (teških) metalnih elemenata (Ni, Co, Mn i Cr), koji su potencijalno fitotoksični (Riter-Studnička, 1963; Kruckeberg, 1984; Brooks, 1987; Proctor, 1999; Bhatia *et al.*, 2005; Brady *et al.*, 2005). Međutim, postepenim razvojem tla i stvaranjem humusa fizikalni uvjeti na serpentinama postaju znatno blaži. Naime, podloga se manje zagrijava i ne podliježe visokim (skoro ekstremnim) temperaturnim kolebanjima, kao što je to slučaj na golim stijenama. Ipak, tokom procesa trošenja stijene i obogaćivanja podloge sitnom zemljom dolazi i do ispiranja baza te tlo postaje sve kiseliije. To je zapravo i razlog da se na serpentinama često zajedno pojavljuju na istom staništu acidofilni i bazofilni florni elementi. Drugi razlog tome je i to da značajan suvišak iona Mg uvjetuje visok stepen zasićenosti bazama i blago kiselu do neutralnu reakciju, osim u A horizontu koji može biti nešto kiselijji (pH 5.5) (Ćirić, 1984; Resulović i Čustović, 2002; Brady *et al.* 2005).

Serpentinska tla se razlikuju od istih tipova tala razvijenih na drugim podlogama po: 1) manjoj debljini profila i slabije izraženim morfološkim osobinama, 2) znatno većem sadržaju čestica stijena u cijelom profilu i 3) većem sadržaju humusa. U suštini,

koji tipovi tla će dominirati u pojedinim serpentinskim kompleksima zavisi u prvom redu od funkcije reljefa.

Na području Bosne (humidni krajevi umjerene zone) kemijski sastav tla ne razlikuje bitno od matične stijene. Ispitivanja bosanskih serpentinskih kompleksa su pokazala da su na njima prisutna skeletna, smeđa šumska i podzolasta tla te crnice (serpentinske rendzine). Ova tla su u dubljim slojevima bogatija bazama, imaju manju kiselost, a prisutnost čestica matične stijene je veća.

Na osnovu orografskih prilika u Bosni je prisutan različit raspored tala. Tako u prvom kompleksu serpentina (sjeverna Bosna) prisutna su uglavnom podzolasta tla; a kompleks prelaznog tipa se karakterizira prisustvom pretežno smeđih tala koja su više zakiseljena. U trećoj skupini se rjeđe nalaze parapodzolasta tla, a više su zastupljena plitka smeđa tla, koja su intezivnije obojena, plića i grubljeg mehaničkog sastava. Ipak, velika prostranstva zauzimaju i ogoljele površine, uz prisustvo humusnih silikatnih tala. U istočnoj Bosni su uglavnom prisutne ogoljele površine, koje se sastoje od krupnih blokova kamenja i pokazuju mali stepen erozije.

Riter-Studnička (1963) je u Bosni determinirala sljedeće tipove serpentinskih tala:

1. Najveće površine na serpentinama u Bosni zauzimaju plitka *skeletna* i nerazvijena tla. To su površine: a) otvorenih sipara sa nevezanim, krupnijim i sitnijim detritusom stijena, podložnim eroziji; b) skeletne padine građene od velikih blokova stijena; i c) kamenjari. Tokom ljeta na površini stijena temperature dosežu i 60°C, a ujedno je prisutno i intezivno dnevno-noćno kolebanje temperatura. Ovo je manje rastrošena podloga, sa prisutnim većim stepenom zasićenosti bazama adsorpcijskog kompleksa tala. Ipak, može se primjetiti

početak ispiranja baza, jer se odvija kemijsko trošenje serpentina (hidratacija i oksidacija).

2. *Smeđa šumska tla* bosanske serpentinske zone su plitka do srednje duboka, i u cijelom profilu sadrže čestice matične stijene. Kod plitkih tala je pH reakcija neutralna ili slabo kisela, uz visok stepen zasićenosti bazama.
3. *Podzolasta tla*, nastala nagomilavanjem erozijom, su prisutna na dubljim profilima, na blago nagnutim padinama ili ravnijim terenima. Na ovim staništima nema karakteristične serpentinske flore, jer je došlo do zakiseljavanja i opadanja stepena zasićenosti bazama adsorpcijskog kompleksa. Ipak, već na dubinama od 30-40 cm se smanjuje kiselost i povećava sadržaj baza i detritusa matične stijene.
4. *Crnice* (serpentinske rendzine) su plitka tla prisutna u nižim predjelima Bosne, kao primarni razvojni stadij na serpentinima. Njihov postanak je vezan za kserofilne sastojine trava koje se razvijaju pri suhim i toplim uvjetima, kada se nagomilava humus zbog niske mikrobiološke aktivnosti. Karakteristika ovih tala je da je odnos Ca/Mg mnogo povoljniji, jer je usljed biološke akumulacije došlo do obogaćivanja adsorpcijskog kompleksa ionima Ca.

### **1.1.3. "Serpentinski sindrom"**

Serpentinska staništa je lako prepoznati zbog njihovih karakterističnih zeleno-sivih i sjajnih stijena, koje su često prošarane sa crnim i bijelim žilama i rijetkom vegetacijom. Tla nastala od serpentinskih stijena predstavljaju negostoljubiva staništa za život biljaka, tako da je Jenny (1980) osmislio termin "serpentinski sindrom" kako bi kolektivno označio brojne strukturalne i funkcionalne adaptacije biljaka sa serpentina. Zapravo, Jenny je na ovaj način pokušao objasniti preživljavanje biljaka na serpentinima



kao njihov ukupan odgovor na niz faktora: kemijskih, bioloških, fizikalnih i klimatskih. "Sindrom" općenito utiče na biomasu (količinu živog materijala) na serpentinitima, koja je niska u poređenju sa drugim biljnim zajednicama.

Dugo godina se pokušava razriješiti pitanje "serpentinskog sindroma" ali do danas nema općenite saglasnosti. Proctor i Nagy (1992) smatraju da su ključni faktori za kontroliranje vegetacije na serpentinskoj podlozi upravo različita serpentinska tla. Međutim, fizikalni i drugi faktori mogu veoma kontrolirati sastav serpentinske flore. U suštini, zbog toga što su serpentinska tla bogata sa Mg, Fe, teškim metalima i azbestom, ona predstavljaju toksična područja za većinu biljaka. S druge strane, mnogi naučnici vjeruju da su kako odnos Ca/Mg tako i nedostatak važnih nutrijenata ključni faktori u determinaciji preživljavanja biljaka na ovim staništima. Treći važan faktor za život biljaka na serpentinitima je plitkoća serpentinskih tala, tj. prisutnost manje količine supstrata koji može zadržati nutrijente i vodu, čineći ih pristupačnijim za biljke. Duboka serpentinska tla se nalaze samo u dolinama, u aluvijalnim tlima, gdje kiše sapiru male partikule. Vegetacija u ovim dolinama je gušća, ali su tla i dalje ultramafitna (Brooks, 1987; Robinson *et al.*, 1997).

Suša uzrokuje unutrašnje (fiziološke, metaboličke) i spoljašnje (morfološke) promjene u biljkama, što rezultira u konzervaciji/djelotvornoj upotrebi pristupačne vode. Endemične biljke na ultramafitnim tlima tipično demonstriraju karakteristike za preživljavanje kao što su tolerancija na visoku koncentraciju Ni i Mg i nisku koncentraciju Ca, i tolerancija na niske vodne potencijale tala. Oni pokazuju bolju stomatalnu kontrolu prekomjernog gubitka vode u poređenju sa biljkama koje obitavaju na normalnim tlima i odlikuju se kratkim i uskim listovima i kompaktnim rastom (Proctor, 1999). Također, serpentinitofite se često karakterišu nanizmom, plagiotropizmom, stenofilijom i atipičnim indumentumom, te ponekad glaucencijom,

glabrescencijom, purpurescencijom i dekoloracijom lisnih površina te snažno razvijenim korjenovim sistemom (Pichi-Sermolli, 1948; Kruckeberg, 1984; Riter-Studnička, 1963; Proctor i Woodel, 1975; Brady *et al.*, 2005).

### **1.1.3.1. Serpentina i biljke**

Specifičnost flore na serpentinsoj podlozi na području Toskane, Italija, su prvi zapazili Andrea Cesalpino, 1583, i Gaspare Amidei di Volterra, 1841, nakon čega su slijedila brojna proučavanja tih staništa (Chiarucci, 2004). Dugogodišnja istraživanja su pokazala da biljni pokrov na različitim serpentinским kompleksima ima mnogo zajedničkih karakteristika bez obzira na to u kojim klimatskim pojasevima se ti kompleksi nalaze.

Karakteristične vegetacijske zajednice svakog serpentinskog regiona su rezultat međuodnosa svakog tog pojedinačnog područja sa jedinstvenim okolišnim, geokemijskim i fizičkim karakteristikama, jer su upravo te jedinstvene karakteristike serpentinških tala dovele do razvoja karakteristične flore. Ta područja se karakterišu u oskudnosti flore kako po brojnosti tako i po raznolikosti vrsta, u postojanju paleo- i neoendema, prisutnosti specifičnih morfoloških osobina, acidofilnih i bazofilnih vrsta te flornih elemenata različitog porijekla (npr. visokoplaninske vrste, pontski elementi) na istim staništima, itd. (Proctor i Woodell, 1975; Kruckeberg, 1984; Brooks, 1987; Sequeira i Pinto da Silva, 1991; Proctor i Nagy, 1992; Baker *et al.*, 1993; Reeves *et al.*, 1996; Stevanović *et al.*, 2003; Vojniković, 2006).

Nepovoljan mineralni sastav plitkog, alkalnog tla i drugi negativni okolišni uvjeti (nedostatak vode, visoke temperature, intenzivna insolacija) rezultiraju rijetkom zakržljalom vegetacijom, zbog čega se serpentinški predjeli uglavnom smatraju neplodnim. Serpentinške vrste su općenito manjeg rasta nego neserpentinške, te su usljed specifičnih strukturalnih i funkcionalnih adaptivnih karakteristika klasificirane u

ekološku grupu serpentino fita. Adaptivne karakteristike koje su se razvile tokom evolutivnog puta su učinile da su serpentino fite ne samo sposobne da podnose stresne uvjete, već i da uspješno ulaze u kompeticiju sa drugim biljkama na ovim staništima (Harrison, 1999; Freitas *et al.*, 2004; Brady *et al.*, 2005).

Serpentino fite se mogu klasificirati u dvije grupe (Reeves *et al.*, 1996; Stevanović *et al.*, 2003):

1) serpentin endemične ili serpentin obligatne biljke, koje rastu samo na serpentinskim tlima i nisu pronađene na drugim supstratima;

2) serpentin tolerantne ili serpentin fakultativne biljke, koje su sposobne da prežive i da se razvijaju na serpentinima. U okviru ove grupe se mogu razlikovati:

- fakultativne serpentinske vrste – biljke koje uglavnom rastu na serpentinima, ali se mogu pronaći na drugim supstratima (npr. krečnjacima ili silikatima), i
- slučajne serpentinske vrste – vrste koje najčešće rastu na neserpentinskim supstratima, ali ponekad (rijetko) i na serpentinima.

Između serpentin fakultivnih i serpentin obligatnih biljaka postoje određene razlike u strukturalnim i funkcionalnim karakteristikama koje im omogućavaju da podnose nutritivni i druge okolišne stresove. Tolerantne vrste su dominantne u ovom tipu vegetacije, i uglavnom su to niskorastuće grmlje i puzajuće biljke s užim lišćem i manjom dlakavošću (mada ima i suprotnih primjera) te obično tamnozeleno boje. U ovu grupu spadaju i slučajni primjerci velikog drveća sa dlakavim listovima. Vrste koje izbjegavaju serpentine najčešće klijaju iz sjemenki ili rastu iz podzemnih skladišnih

struktura i kompletiraju životni ciklus u periodu kada je pristupačna voda (Riter-Studnička, 1964; O'Dell *et al.*, 2006; Kruckeberg, 1984; Dudić *et al.*, 2007).

Biljne zajednice na serpentinskim tlima su adaptirane na toksične koncentracije teških metala, i to bilo korištenjem mehanizama isključivanja kojima je unos i/ili korijenizdanak transport teških metala ograničen, ili tolerancijom na teške metale putem „hiperakumulacije“, i.e. sposobnosti biljaka da akumuliraju veoma velike koncentracije nekih teških metala u njihovim nadzemnim dijelovima (Baker, 1981; Brooks, 1998). Ipak, novija istraživanja su pokazala da metali u tlu ne predstavljaju najvažniji limitirajući faktor za serpentinsku vegetaciju u Toskani, Italija (Chiarucci *et al.*, 2003), već da je nutricionalni stres najodgovorniji za opstanak mnogih vrsta i za biljnu produktivnost (Chiarucci *et al.*, 1998a; Chiarucci *et al.*, 2003). Međutim, kombinacija različitih faktora koji kontroliraju serpentinsku floru se razlikuje od mjesta do mjesta (Proctor i Nagy, 1992). Općenito, flora na serpentinskim tlima je jedinstvena i dobro diferencirana u odnosu na okolna područja, te je normalno prisustvo velikog procenta endemičnih vrsta i nekih, danas prisutnih, specijalnih fizioloških adaptacija na nepovoljne uvjete (Brooks, 1987; Chiarucci *et al.*, 2003).

### **1.1.3.2. Pregled istraživanja serpentinske flore i vegetacije u Bosni**

U odnosu na istovjetne grupacije na krečnjacima, na serpentinima se uočava velika jednoličnost u oblicima vegetacije kao i siromaštvo u brojnosti vrsta. Specifičnost flore na serpentinima dolazi do izražaja naročito na golom supstratu, na stijenama ili na grubo rastrošenom, skeletnom detritusu. Razvojem vegetacije i akumulacijom humusa dolazi do slabljenja veze sa matičnim supstratom te životni uvjeti postaju povoljniji, što omogućava mezofilnim vrstama da potisnu pionirsku vegetaciju. Osobena serpentinska vegetacija je prisutna i u kserofilnim šumama na kamenitom tlu (Riter-Studnička, 1963). Prema Chiarucci *et al.* (2001) i Chiarucci (2004) efekat nekih fizičkih osobnosti (nagib i

taloženje supstrata) te pokrovnost drveća su odlučujući faktori u distribuciji vrsta na ultramafitnim tlima.

Biodiverzitet na Balkanskom poluotoku je visok, sa velikim brojem interesantnih lokalnih i regionalnih endema. Tako je više od 300 endemičnih svojti identificirano na cijelom Balkanu, što indicira važnost serpentinskih staništa kao centara florističke diferencijacije i specijacije (Stevanović *et al.*, 2003; Chiarucci i Baker, 2007).

Na ultramafitnim tlima Bosne se veoma često susreću acidofilni i bazofilni (neutrofilni) florni elementi (Riter-Studnička, 1963), a kao posljedica ispiranja baza iz tla i suviška iona magnezija. Pojava subalpskih flornih elemenata na ultramafitima je posljedica povećane zračne vlage i inverzije temperatura usljed specifičnosti orografije. Ukratko, ova staništa se karakterišu smjenom mezofilnih sa kserofilnim i acidofilnih sa bazofilnim flornim elementima, kao i prisustvom subalpskih i pontskih flornih elemenata. Nepristupačnost ovih terena te dugogodišnje nepostojanje komunikacija su značajno onemogućili antropogeni uticaj na serpentinskim područjima Bosne. Najčešće negativne posljedice na ovim područjima izazivaju požari, koji se lako šire i, dugoročno gledano, dovode do brze degradacije staništa. Ograničavajući faktori sukcesija na ultramafitnim stijenama su: stres izazvan deficitom vode i hranjiva, specifična kombinacija orografskih faktora, te donekle i toksičnost teških metala, naročito nikla (Robinson *et al.*, 1996; Chiarucci *et al.* 1998a, 1998b, 2001; Chiarucci, 2004).

Može se reći da usljed specifičnih mikroklimatskih prilika najveće površine biljnog pokrova na serpentinama zauzimaju kserofilni oblici vegetacije (stijene, kamenjari i sipari, te šume crnog bora i hrasta kitnjaka). Najkserotermnija je vegetacija sipara, gdje je i najzastupljenija endemična serpentinska flora (Riter-Studnička, 1963; Redžić, 1988; Vojniković, 2006).

Prema istraživanjima Riter-Studničke (1963), u Bosni se nalaze 583 vrste koje obitavaju na serpentinskim supstratima. Od toga su 284 vrste prisutne na skeletnim tlima, u okviru kojih je pronađeno samo 37 obligatnih serpentinofiti (5 paleoendema, 14 neoendema i 17 tipičnih vrsta za serpentin). Na dobro razvijenim tlima u mezofilnim šumama je prisutno 104, a na vrištinama 22 vrste (ukupno 126). Preostale 173 vrste su okarakterizirane kao indifirentne. Pri određivanju biljnih vrsta na serpentinskim kompleksima, Riter-Studnička nije uzela u obzir nekih 60 vrsta, koje uglavnom prate čovjeka i stoku, ili su dio vodene vegetacije. Nažalost, kompletan spisak vrsta pronađenih na serpentinskim supstratima Riter-Studnička nije objavila.

### **1.1.3.3. Veličine genoma biljaka na serpentinima**

Pomoću metoda citometrije je moguće izvršiti brzo i precizno skeniranje veličine genoma i nivoa ploidije, identifikaciju hibrida, te detekciju kako B hromosoma tako i malih razlika u količini DNK (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2010, i reference u radu). Proteklih godina je iskazano povećano interesovanje za mehanizme evolucije veličine genoma i odnosa između veličine genoma i ekoloških faktora, s obzirom na adaptivnu ulogu nukleotipa (Gruner *et al.*, 2010; Hoffmann *et al.*, 2010). Osim toga, veličina genoma važan je karakter u evaluaciji biodiverziteta, sistematici i evoluciji (Godelle *et al.*, 1993; Martel *et al.*, 1997; Cerbah *et al.*, 1999; Le Thierry d'Ennequin *et al.*, 1998; Ohri, 1998; Cerbah *et al.*, 2001; Slovak *et al.*, 2009; Vidic *et al.*, 2009; Siljak-Yakovlev *et al.*, 2010).

Kod eukariota je prisutna veoma velika varijabilnost veličine nuklearnog genoma, što se nije moglo dovesti u vezu sa kompleksnošću organizama niti njihovim porijeklom. Ipak je uočeno da su vrste sa malim genomima prisutne u svim habitatima, da su vrlo invazivne i da opstaju i pri izraženijim ekstremnim uvjetima okoliša (Bennett *et al.*, 1998; Knight i Ackerly, 2002). Suprotno njima, vrste sa velikim genomima su

veoma osjetljive na stresne okolišne uvjete i ograničene su na manje stresne uvjete sa dužim sezonama rasta (Bennett et al, 1982; Grime i Mowforth, 1982; Bennett, 1987; Knight i Ackerly, 2002; Knight *et al.* 2005; Vidic *et al.*, 2009). Veliki broj studija je ukazalo na postojanje brojnih kako pozitivnih, tako negativnih ili odnosa bez signifikantnosti (čak i za isti karakter) između veličine genoma i nekih ćelijskih i fizioloških karakterata. Veličina genoma varira i korelira sa veličinom hromosoma, nukleusa i ćelije; dužinom mitotičkog i mejotičkog ciklusa; veličinom i masom sjemena; nekim karakterima lista; stopom fotosinteze i rastom (Knight *et al.*, 2005, i reference u radu; Gregory, 2001); dužinom ćelija zatvaračica i ćelija epidermisa (Knight i Beaulieu, 2008); geografskom širinom i dužinom i otpornošću na mraz (Knight i Ackerly, 2002, i reference u radu), otpornošću na metale (Vidic *et al.*, 2009).

Sve ove studije su pokušavale dati odgovor na pitanje: da li veličina genoma može imati adaptivnu vrijednost u izvjesnim uslovima? Međutim, ogromna većina ovih studija nisu izučavale veličinu genoma i njegov eventualni selektivan značaj u prirodnim populacijama, a naročito u odnosu na uticaj teških metala. Ipak, nedavno su Vidic *et al.* (2009) upoređivali floristički sastav zajednica na napuštenom rudniku olova sa količinom nuklearnog genoma, brojem hromosoma i prisustvom ploidiije. Oni su u uzorku od 70 višegodišnjih dikotiledonih biljaka uočili da postoji negativna korelacija između koncentracije kontaminirajućih metala u tlu i broja vaskularnih biljaka, i to naročito onih sa velikim genomima. S obzirom da je Drušković (1984) uočio jako veliki broj hromosomalnih aberacija u biljkama s istog područja, može se zaključiti da su biljne zajednice izučavanih travnjaka na napuštenim područjima taljenja olova relativno mlade i najvjerovatnije, pod jakim selektivnim pritiskom.

## 1.2. Biljke i teški metali

“Teški metali”, nije potpuno definirani termin, no vrlo često ćemo ga naći u literaturi. Koristi se kao termin za grupu metala koji su povezani sa polucijom i toksičnošću, mada uključuje i nekoliko kemijskih elemenata koji su značajni za živa bića, ali u malim koncentracijama. “Toksični metali” su alternativni termin za “teške metale”, pod kojim se podrazumjeva i prisustvo određenih elemenata (Pb, Cd, Hg, As, Tl i U), mada ovaj termin nije podesan za biološki važne elemente kao što su Co, Cu, Mn, Se i Zn. Termin „elementi u tragovima“ postaje sve popularniji kao zamjena za termin “teški metali”, ali još uvijek nije u širokoj upotrebi (Stavreva-Veselinovska *et al.*, 2008).

Teški metali su članovi grupe elemenata sa metalnim karakteristikama, a koji uglavnom uključuje prelazne metale, neke metaloide, lantanide i aktinide. Oni su široko rasprostranjeni u Zemljinoj kori, i mogu se osloboditi iz eruptivnih stijena (vulkanskog porijekla), sedimenata (formiranih u slojevima sedimentacijom) ili metamorfnih stijena (transformirane intenzivnom vrućinom i pritiskom) koje sadrže specifične teške metale. Teški metali isprani iz formacija prirodnih stijena su široko prisutni u okolišu, u obliku čestica ili rastvorenih formi u tlima, rijekama, jezerima, morskoj vodi i sedimentima mora. Vulkani također oslobađaju teške metale u atmosferu. Koncentracije teških metala se uočavaju i u područjima povećane agrikulturalne i industrijske aktivnosti. Naročito su tla u blizini rudnika teških metala izložena ne samo stresu uzrokovanim teškim metalima (Zn, Pb, Cr, Mn, Fe ili In), već i metaloidima (Tl i As). Teški metali su veoma interesantni, s antropogenog stanovišta, zbog njihove mobilnosti, biopristupačnosti i toksičnosti u okolišu, gdje predstavljaju potencijalni rizik za žive organizme (Babula *et al.*, 2008).



Biljke iz tla apsorbiraju brojne elemente u odnosu na koncentracijske gradijente indukovane selektivnim unosom iona putem korjenja ili difuzijom elemenata u tlu. Nivo akumulacije elemenata je različit kako među vrstama tako i unutar vrste. Neki od apsorbiranih elemenata se označavaju kao esencijalni, zbog toga što ih biljke trebaju kako bi kompletirale životni ciklus. S druge strane, neki prelazni elementi (npr. Fe, Mn, Mo, Cu, Zn i Ni) su poznati kao mikroelementi, pošto su biljkama za život neophodni u veoma malim količinama. Stimulativan efekat na rast biljaka, ali ne i esencijalan, imaju drugi prelazni elementi (Ag, Au i Co) ali i neki neprelazni elementi (npr. Al). Biljke, također, apsorbiraju elemente za koje se ne zna njihova biološka funkcija, iako čak mogu biti i toksični u malim koncentracijama (As, Cd, Cr, Hg i Pb). U suštini, čak i mikroelementi postaju toksični za biljke kada se apsorbiraju u količinama većim od graničnih (Peralta-Videa *et al.*, 2009; Taiz i Zeiger, 1998). Baker (1981) predlaže podjelu biljaka u tri kategorije:

1) izbjegavači (ekskluderi; *Thlaspi arvense*, *Armeria maritima*, *Silene vulgaris*, etc.): su biljke koje a) nakon unosa u korjenov sistem, sprečavaju transport metala u izdanke i održavaju relativno niske koncentracije metala u izdanku u odnosu na njihove vrijednosti u tlu, ili b) su u nemogućnosti da unesu metal u korjenov sistem, jer ne posjeduju odgovarajuće metaboličke puteve.

2) akumulatori (*Arabidopsis halleri*, *Thlaspi caerulescens*, *Alyssum murale*, etc.): biljke koje, bez vidljivih simptoma toksičnosti, pokazuju tendenciju ili sposobnost da translociraju i akumuliraju veće koncentracije metala u nadzemnim dijelovima bez obzira na to kolike su koncentracije metala u tlima. U okviru ove grupe biljaka se mogu izdvojiti i hiperakumulatori, koji imaju sposobnost da akumuliraju metale u izdancima u koncentracijama preko 100 puta većim od uobičajenih.

3) indikatori (*Taraxacum officinale*, *Populus nigra*, *Forsythia europaea*, etc.): biljke koje pokazuju intermedijarni odgovor na visoke koncentracije metala u tlima. Naime, koncentracija teških metala u biljkama indikatorima je odraz koncentracija istih metala u okolnom tlu, dok ne dođe do trovanja organizma.

Važan faktor biopristupačnosti metala/metaloida je njihovo prisustvo u tlu i vodi pošto nema puno biljaka koje ih mogu usvojiti iz zraka. Sljedeći važan faktor je trenutna forma teškog metala (valencija) u tlu ili vodi koja se poklapa s aktualnim uvjetima, kao što su pH, sadržaj oksigena, prisustvo ili odsustvo drugih anorganskih kao i organskih spojeva. Nije uočena korelacija između sadržaja metala u tlu i u biljnim tkivima. Neki teški metali, npr. olovo (Babula *et al.*, 2008), su skoro apsolutno nepristupačni za biljke zbog njihove netopivosti i interakcija sa česticama tla.

Različiti mehanizmi tolerancije odgovorni za biljnu adaptaciju na visoke koncentracije teških metala u tlu se mogu sumirati kao kapacitet biljke ili da ograniči unos i translokaciju metala ili da akumulira metale u netoksičnim oblicima. Većina serpentinskih vrsta teži da ograniči unos metala, tako da je njihova koncentracija u listovima mala. Samo nekoliko vrsta, visoko adaptiranih i endemičnih za ove supstrate, su sposobne da akumuliraju metale u svojim izdancima, te se mogu smatrati hiperakumulatorima. Također, široko rasprostranjenje odstranjivača sugerira da njihova strategija dozvoljava visoku adaptibilnost na različite uvjete na serpentinima (Baker 1981, 1987; Gabbrielli *et al.*, 1990).

Biljne vrste koje su tolerantne na višestruki nutritivni stres na serpentinskim tlima očekivano imaju nisku stopu rasta, izraženu toleranciju na nisku pristupačnost N, P, K i Ca, kao i toleranciju na toksičnost Mg i teških metala. Vrstama koje rastu u blizini, ali ne na serpentinima, nedostaje barem jedna od ovih karakteristika, zbog čega ne obitavaju na ovakvim staništima (Kruckeberg, 1984; Proctor, 1999; O'Dell *et al.*, 2006).

### 1.2.1. Odgovor biljke na stres

Biljke posjeduju jedinstvene i sofisticirane mehanizme za toleranciju abiotičkih stresova, koji su najčešće uzrokovani sušom, slanošću, visokim ili niskim temperaturama, svjetlošću, nedostatku ili suvišku nutrijenata, teškim metalima, bilo pojedinačno ili njihovim kombinacijama. Stres nastao kao posljedica djelovanja abiotičkih faktora utiče na metabolizam i dovodi do negativnih efekata na rast, razvike i produktivnost biljaka. Ako stres postane veoma izražen i/ili traje duže vrijeme, on može veoma opteretiti metabolizam ćelija i uzrokovati smanjen rast, a u ekstremnim slučajevima i smrt individue.

Povećani sadržaj kako esencijalnih tako i neesencijalnih metala u tlu dovodi do izražaja simptoma trovanja i inhibicije rasta biljaka. Tolerancija na teške metale kod biljaka se može definirati kao sposobnost biljke da preživi u tlu, koje je toksično za ostale biljke, i manifestira se interakcijom između genotipa i njegovog okoliša. U brojnim genetičkim studijama, adaptivna tolerancija na metale uključuje mali broj gena i možda sudjelovanje nekih neznatno promjenjenih gena. Kako bi se zaštitile od trovanja metalima, biljke moraju razviti mehanizam kojim se metal nakon ulaska u citosol ćelije ili odmah izbacuje ili kompleksira i inaktivira. Na taj način se sprječava da metal inaktivira katalitički aktivne ili strukturne proteine, prvenstveno pomoću adaptivnog mehanizma koji može biti uključen u općenitu homeostazu esencijalnih iona i njihovu toleranciju (Baniwal *et al.*, 2004; Shah i Nongkynrih, 2007).

### 1.3. Bijeli narcis (*Narcissus poeticus* L.)

Rod monokotiledonih biljaka narcisa (*Narcissus*), iz porodice amarilisa (Amaryllidaceae), čine trajnice sa lukovicom i nadzemnom stabljikom. Rod je nativan u centralnoj Europi i cijelom Mediteranskom regionu, s izuzetkom jedne vrste koja obitava u Aziji. Centar diverziteta roda se nalazi na Iberijskom poluostrvu (Hanks, 2002).

Postoje dvije verzije porijekla imena roda. Poznati rimski historičari Pliny i Virgil su bili mišljenja da ime *narcissus* dolazi od riječi *narke*, koja označava narkotičko djelovanje jakog mirisa cvjetova. Ipak, švedski botaničar Linnaeus je inspiraciju za ime roda pronašao u ličnosti lijepog mladića *Narcissusa* iz grčke mitologije ([http://en.wikipedia.org/wiki/Narcissus\\_%28flower%29](http://en.wikipedia.org/wiki/Narcissus_%28flower%29); <http://pss.uvm.edu/ppp/articles/sprbulbs.html>).

Taksonomija roda je vrlo kompleksna i predstavljena je sa različitim klasifikacijama i brojem vrsta (Webb, 1980; Fernandes, 1968). Nedavno su Graham i Barret (2004) i Zonneveld (2008) sa različitim pristupima prihvatili samo 36 vrsta. U rodu je opisano više od 27 000 kultiviranih varijeteta (Kington, 1989; *The International Daffodil Register and Classified List /updated 2008/*), s obično veoma složenim porijeklom. Varijeteti su uglavnom proizvedeni ukrštanjem vrsta *N. poeticus* L., *N. pseudonarcissus* L. i *N. tazetta* L. (Wylie, 1952; Brandham, 1992; Brandham i West, 1993).

Uprkos veoma važnoj ulozi koju *Narcissus poeticus* igra u kultivaciji narcisa, do danas je rađeno relativno malo istraživanja na njegovim prirodnim populacijama.

### 1.3.1. Karakteristike vrste

Na osnovu rezultata dobivenih nizom morfoloških i citogenetičkih istraživanja (Cesca, 1972; Fernandes, 1975; Webb, 1980; Graham i Barret, 2004; Tucci *et al.*, 2004; Zonneveld, 2008) kompleks *N. poeticus* se danas posmatra kao jedna vrsta. *Narcissus poeticus* [syn. *N. radiiflorus* (Salisb.) Baker, *N. angustifolius* Curtix ex Haw.] pripada sekciji *Narcissus* L., i nativan je za centralnu, jugozapadnu i jugoistočnu Europu. U geografskom rasprostranjenju ova vrsta obuhvata područja od Slovenije do sjeverozapadne Grčke. U lokalnim florama ova vrsta je uglavnom označena kao ugrožena, osjetljiva ili rijetka (Beck, 1903; Webb, 1980; Šugar, 1994; Šilić, 1996; Stevanović, 1999). *Narcissus poeticus* pripada prealpsko-submediteranskoj flori (Mišić i Lakušić, 1990; Graham i Barret, 2004).

Vrsta *Narcissus poeticus* (bijeli narcis, sunovrat, zelenkada, košuta) ima duge uske i sjedeće listove, koji niču iz lukovica. Listovi su nepotpuni sa paralelnom nervaturom, linearni, na vrhu zatupasti i široki oko pola centimetra, zelene do plavičaste boje, i kraći od stabljike. Stabljika je zelene boje, spljoštena i sa dva istaknuta uzdužna rebra, a može da naraste do pola metra. Lukovica je loptastog ili jajastog oblika, duga oko 5 cm i široka do 2.5 cm, sa tamnim i suhim omotačem. Podzemno stablo (lukovica) omogućava prezimljavanje jer sadrži rezervnu hranu i pupoljak. Korijen je žiličastog tipa. Cvjetovi su vršni i pojedinačni, vrlo rijetko dolaze po dva cvijeta na stabljici. Cvijetna drška je duga do 2 cm i u donjem dijelu je obuhvaćena opnastim priperkom. Krunicu sačinjavaju bijeli listići, koji su jajastog oblika ili su na vrhu šiljati, prema osnovi se sužavaju i po pravilu ne prepokrivaju. Parakrunica je tanjirasta, duga oko 0.5 cm, žute boje, a po obodu sitno nazubljena i crvena. Cvijet je dvospolan. Tučak ima trodjelni žig, a prašnici se karakteriziraju heterostilijom. Plod je čahura sa brojnim sjemenkama u svakom okcu (Mišić i Lakušić, 1990; Graham i Barret, 2004).

U Bosni i Hercegovini, bijeli narcis ima vrlo velike i brojne populacije na kraškim poljima, ali je zastupljen i sa manje brojnim populacijama na planinskim i subalpinskim travnjacima i kamenjarima na krečnjacima te na serpentinskim supstratima. Populacije bijelog narcisa su pronađene na nadmorskim visinama od 700 do 1750 m. Ova biljka zahtjeva bazična do slabo kisela, vlažna i dobro drenirana tla. Što se tiče osunčanosti, veoma dobro podnosi jaku sunčevu insolaciju, ali i polusjenu. Cvjeta od kraja aprila do sredine juna, i karakterizira se sa jakim i specifičnim mirisom.

### **1.3.2. Citogenetičke karakteristike roda *Narcissus***

Prisustvo različitih evolutivnih procesa, kao što su hibridizacija, poliploidizacija, adaptivna radijacija i prisustvo prekobrojnih hromosoma su uočeni kod različitih predstavnika roda *Narccissus* (Fernandes, 1952; Wylie, 1952; Fernandes, 1975; Brandham, 1986; Brandham i Kirton, 1987; Zonneveld, 2008).

Poliploidija je značajan proces u evolutivnoj historiji biljnog svijeta, gdje novonastale promjene u strukturi genoma direktno utiču na fenotip i fitnes individua u različitim okolišnim uvjetima. Na uspostavljanje i održavanje poliploida veliki uticaj imaju perenijalna životna forma, visok fekonditet, samooplodnja ili aseksualni način razmnožavanja, slabo rasijavanje i prisustvo različitih niša (Otto, 2007; Rieseberg i Willie, 2007). Optimalni nivo poliploidije za kultivare roda *Narcissus* je tetraploidija, gdje su individue sa većim nivoom ploidije vrlo rijetke. Poliploidija je rijetka u prirodnim populacijama, osim kod vrste *N. bulbocodium*, koji može biti 2x, 4x i 6x (Wylie, 1952). Prema pristupačnoj literaturi, individue *N. poeticus* iz prirode su uglavnom diploidi  $2n=14$  (Fernandes, 1952; Wylie, 1952; Cesca, 1972; Brandham i Kirton, 1987; Takhtajan, 1990; Zonneveld, 2008). Triploidi ( $2n=3x=21$ ) su registrirani u

samo po jednoj populaciji u Grčkoj i Švicarskoj (Zonneveld, 2008). Iako su i kultivirane individue uglavnom diploidi, ipak postoji evidencija o postojanju nekoliko triploidnih varijeteta (*N. poeticus* var. *poetarum*, *N. poeticus* "Recurvus", *N. poeticus* "Hellenicus", *N. poeticus* "Pheasant Eye") i jednog tetraploida *N. poeticus* "Actaea" (Fernandes, 1952; Wylie, 1952; Cesca, 1972; Brandham i Kirton, 1987; Takhtajan, 1990; Zonneveld, 2008).

Prisustvo B hromosoma je primjećeno kod nekoliko vrsta roda *Narcissus* (Fernandes, 1952; Wylie, 1952; Brandham i Kirton, 1987; Zonneveld, 2008). B hromosomi se karakteriziraju sa nesegregacijskim i sebičnim ponašanjem, jedinstvenim evolutivnim putem i nepoznatim porijeklom, te prisustvom rekombinacijske barijere s A hromosomima. Pošto B hromosomi, kad su prisutni u većem broju, pokazuju negativne efekte na bujnost i fertilnost biljke, te na frekvenciju *crossing-overa*, sugerirana je njihova genetička, ali ne i funkcionalna inertnost (Carchilan i Houben, 2007; Jones *et al.*, 2008). Međutim, nedavno otkriveni geni locirani na B hromosomima kod sisara, raži, ljiljana i penisetuma (Carchilan i Houben, 2007; Muratović, 2007; Robert *et al.*, 2011) ne podržavaju mišljenja o njihovoj genetičkoj tromosti. Također je poznato da B hromosomi predstavljaju jedan od glavnih izvora genetičkog diverziteta, intraspecijske varijabilnosti u veličini genoma i da omogućavaju stvaranje strukturalnih polimorfizama u prirodnim populacijama (Camacho *et al.*, 2000; Jones i Houben, 2003; Jones *et al.*, 2008).

Svi pronađeni B hromosomi u rodu *Narcissus* dugi su oko 2/3 hromosoma iz garniture A, a koji nosi satelit (najčešće najkraćeg hromosomskog para u komplementu), sa subterminalnom centromerom, mogu biti vrlo slični ili morfološki varijabilni, te mogu ali i ne moraju biti heterohromatični (Fernandes, 1952; Wylie, 1952; Brandham i Kirton, 1987; Zonneveld, 2008). U relevantnoj literaturi postoji samo nekoliko referenci o

postojanju B hromosoma kod vrste *N. poeticus* (Takhtajan, 1990), no njihovo je postojanje indicirano i veličinom genoma (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2010).

Zonneveld (2008) je utvrdio količinu nuklearne DNK za sve vrste roda *Narcissus*, međutim njegove vrijednosti dobivene su mjerenjima samo jedne individue po taksonu. Međutim, prema navodima više autora (Olszewska i Osiecka, 1982; Zonneveld, 2008; Siljak-Yakovlev *et al.*, 2010), veličina nuklearnog genoma vrste *N. poeticus* je varijabilna, što upućuje na potrebu mjerenja količine DNK na više individua u populaciji, ali i u okviru više populacija.



## 1.4. Ciljevi

Ciljevi ove studije su sljedeći:

- 1) da se odrede veličina genoma i nivoi ploidije za brojne vrste koje obitavaju na serpentinskim supstratima u zapadnom dijelu Balkanskog poluostrva;
- 2) da se provjeri postojanje favoriziranih odnosa između veličine biljnih genoma i stresnih okolišnih uvjeta u prirodnim habitatima na serpentinskim supstratima;
- 3) da se nastavi sa širenjem baze podataka o veličini genoma biljnih vrsta Balkanske flore;
- 4) da se ukaže na problematiku konzervacije ovih unikatnih biljnih resursa na specifičnim habitatima u Bosni;
- 5) da se izvrši mjerenje koncentracije određenih teških metala (Ni, Co, Mn i Fe) te makronutrijenata Mg i Ca u različitim biljnim dijelovima i pripadajućoj rizosferi datih individua bijelog narcisa koje uspijevaju na različitim supstratima;
- 6) da se identificiraju moguće promjene na bijelom narcisu kao rezultat uticaja nekih teških metala;
- 7) da se izvrše citogenetička istraživanja hromosomalne strukture (prisustvo heterohromatina i ribosomalnih gena) u različitim populacijama vrste *Narcissus poeticus* u zapadnom dijelu Balkanskog poluostrva;
- 8) da se identificiraju tipovi odgovora genoma bijelog narcisa na različite okolišne uvjete;
- 9) da se valoriziraju varijabilnosti veličine genoma među populacijama bijelog narcisa u različitim habitatima, uključujući tla bogata teškim metalima (serpentina);
- 10) da se istraže odnosi između ukupne nuklearne količine DNK bijelog narcisa i broja B hromosoma.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Veličina nuklearnog genoma serpentinofiga

U cilju mjerenja količine nuklearnog genoma biljni materijal (listovi) je prikupljen tokom cijele vegetacijske sezone na prirodnim serpentinskim kompleksima centralne i istočne Bosne, na zapadnim padinama planine Zlatibor u Srbiji, te u FYR Makedoniji. Taksonomska pripadnost, geografsko porijeklo, sklonost ka supstratu, tip životnog ciklusa, životna forma, broj hromosoma iz literature i determiniran u ovoj studiji, nivo ploidije, 2C DNK i 1C DNK vrijednosti, monoploidna veličina genoma, broj analiziranih individua, i vrste koje su služile kao standardi prezentirani su u Prilogu 1. Vaučeri sakupljenih biljaka su pohranjeni u Laboratoriji za istraživanje i zaštitu endemičnih resursa, Odjel za Biologiju, Prirodno – matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu.

Sistematski status, životni ciklus i životna forma su determinirani za svaku svojtu iz relevantne bibliografije (Beck, 1903, 1916, 1927; Beck i Malý, 1950; Beck *et al.*, 1967-1983; Hayek, 1970; Josifović, 1970-1977; Sarić, 1986; Tutin *et al.*, 1992-1996; Oberdorfer, 1994; Šugar, 1994; Šilić, 1996; Tutin *et al.*, 1996; Stevanović, 1999; Nikolić, 1994-2000; Nikolić i Topić, 2005).

Svježi listovi prikupljeni su sa jedne do pet individua, u zavisnosti od brojnosti individua u populacijama na serpentinskim staništima, za određivanje ukupne veličine genoma. Pojedinačni listovi su odvojeno umotavani u vlažni klineks papir, potom u prozirnu foliju i pohranjeni na temperaturi od +4°C do mjerenja.

### 2.1.1. Određivanje ukupne nuklearne količine DNK

Na Institutu biljnih nauka (*Institut des Sciences du Vegetal, CNRS UPR 2355, Compartimentation Cellulaire, F-91198, Gif-sur-Yvette, Francuska*) vršena su mjerenja količine DNK biljaka. Za estimaciju veličine genoma, a prema metodologiji Marie i Brown (1993), korišteni su aparati Elite ESP protočni citometar (Beckman-Coulter, Roissy, France) ili Partec CyFlow 532 nm laserskog citometra. Paralelna mjerenja uzoraka su potvrdila da ovi aparati daju iste vrijednosti u ovoj laboratoriji. Kako bi se pokrio široki raspon vrijednosti veličine genoma korišteni su sljedeći standardi: *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 'Roma' (2C = 1.99 pg; 40.0% GC), *Petunia hybrida* (Hook) Vilm. cv. 'PxPc6' (2C = 2.85 pg; 41% GC), *Pisum sativum* L. cv. 'Long Express' (2C=8.37 pg; 40.5% GC), *Hordeum vulgare* L. cv. 'Sultan' (2C = 9.81 pg), *Artemisia arborescens* L. cv. 'Crete' (2C = 11.43 pg) i *Triticum aestivum* L. cv. 'Chinese Spring' (2C = 30.9 pg; 43.7% GC).

Svježi listovi analiziranih vrsta, zajedno sa listovima odgovarajućeg standarda, usitne se žiletom u sterilnim Petrijevim posudama (Fig. 3), uz dodatak 600  $\mu$ l Galbraithovog pufera (Galbraith *et al.* 1983) koji sadrži 1% PVP (polivinilpirolidin) 10.000; 10 mM natrij metabisulfit i 0.1% Triton X-100. Navedene kemikalije se dodaju radi pojačavanja permeabilnosti nuklearne membrane, što omogućava lakši prodor fluorohroma u svježi materijal (Heslop-Harrison i Schwarzacher, 1996). Da bi se dobili intaktni izolirani nukleusi, vršeno je filtriranje suspenzija maceriranog materijala kroz ultra filter, sa promjerom pora od 48  $\mu$ m. Dobivene otopine se u plastičnim flakonima konstantno drže na ledu. Nakon toga slijedi tretman sa RNA-zom 2.5 jedinica ml<sup>-1</sup> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka). Za estimaciju veličine genoma se dodaje 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> interkalarne fluorescentne boje propidium iodida (Sigma), koji markira totalnu DNK i proizvodi nizak koeficijent varijacije (cv).

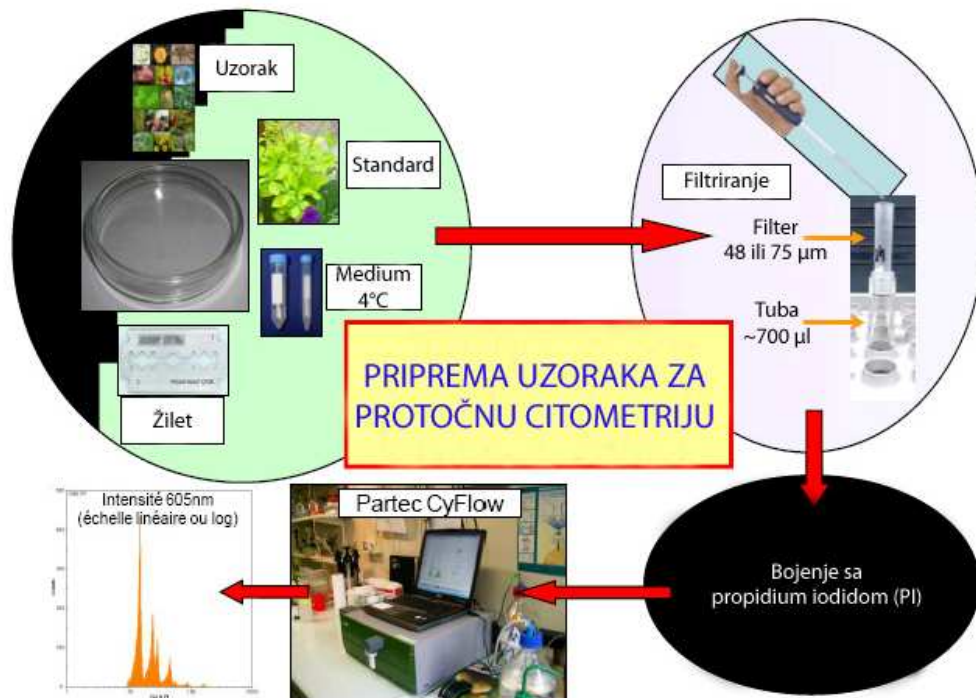


Fig. 3. Priprema uzoraka za mjerenje veličine genoma pomoću protočne citometrije (Bourge i Brown, personalna komunikacija).

Ovako izolirani nukleusi obojeni fluorohromom se propuštaju kroz laserski protočni citometar (Fig 4). Mjerenja su izvršena na pet individua iz svake ispitivane populacije, uz ponavljanje mjerenja (konačna vrijednost je rezultat dobijen na osnovu mjerenja najmanje 2.500 bojenih nukleusa za svaku individuu).

Kroz “protočnu ćeliju” citometra propuštaju se pojedinačno izolovani i fluorohromom obojeni nukleusi u vidu uskog toka. Pri prolasku kroz protočnu ćeliju, nukleusi se obasjavaju snažnim laserskim snopom svjetlosti određene talasne dužine koja odgovara upotrebljenom fluorohromu.

Posljedica toga je istovremeno rasipanje svjetlosti i emisija karakteristične fluorescencije, koja se preko niza leća, ogledala i filtera sakuplja i usmjerava ka različitim detektorima (obično fotomultiplikatorske tube, PMT). Fotomultiplikator konvertuje svjetlost u električne signale, koji se amplificiraju i ovaj put konvertuju u digitalni signal - kanalni broj.

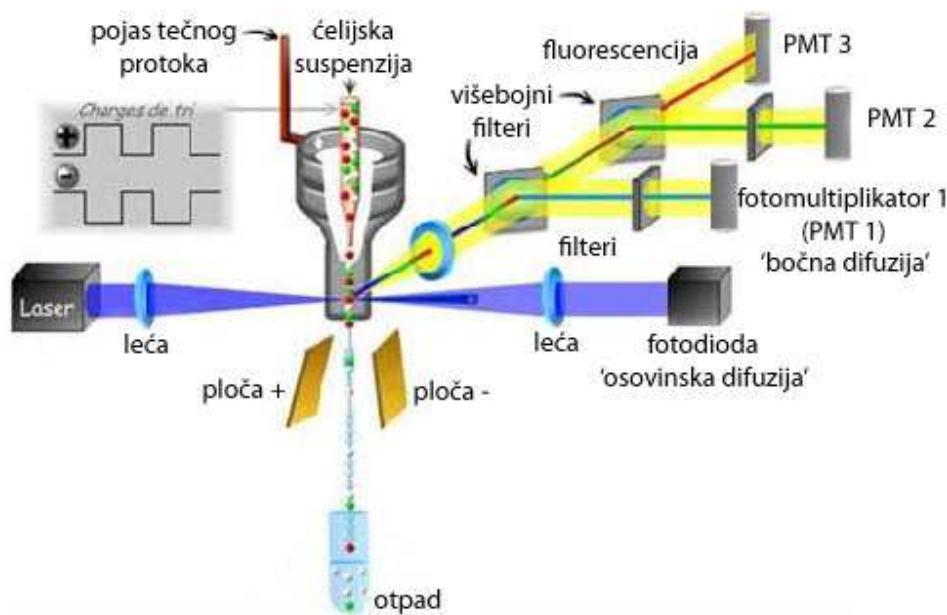


Fig. 4. Shematski prikaz rada protočnog citometra (Bourge i Brown, personalna komunikacija).

Pošto kanalni brojevi predstavljaju vrijednosti produkovane svjetlosti, tada se prema intenzitetu fluorescencije određuje broj kanala, tj. količina DNK. Naime, viši kanalni brojevi predstavljaju i veće količine svjetlosti, odnosno veće količine DNK.

Apsolutna količina DNK se određuje kompariranjem srednjeg kanalnog broja nepoznate DNK u odnosu na standard, tj. poznatu količinu DNK {DNK (pg)= srednji kanalni broj uzorka/srednji kanalni broj standarda x n pg genomske DNK standarda} (Price i Johnston, 1996).

## 2.2. Analiza ukupnih koncentracija Ni, Co, Mn, Fe, Ca i Mg u biljnom materijalu i tlu

Po pet kompletnih individua bijelog narcisa sa pripadajućom rizosferom (tlo oko lukovice i korjenčića) je prikupljeno u 13 populacija u Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj i Srbiji (Tabela 1).

**TABELA 1.** Geografsko rasprostranjenje istraživanih populacija *Narcissus poeticus*.

Br.	Lokalitet	Supstrat	GŠ	GD	NV (m)	N
1.	Mt. Čvrstica, Mala Čvrstica, B&H	K	43° 34' 38"	17° 29' 33"	1384	5
2.	Mt. Čvrstica, Barice, B&H	K	43° 35' 01"	17° 30' 02"	1350	6
3.	Glamočko Polje, Mliništa, B&H	K	44° 14' 07"	16° 49' 57"	1198	11
4.	Mt. Zelengora, Točila, B&H	K	43° 19' 51"	18° 33' 10"	1470-1570	11
5.	Livanjsko Polje, Peulje, B&H	K	44° 08' 42"	16° 27' 56"	806-859	13
6.	Livanjsko Polje, Čelebići, B&H	K	43° 56' 01"	16° 40' 52"	710	5
7.	Mt. Čvrstica, Rakitno, B&H	K	43° 32' 79"	17° 24' 90"	895-910	8
8.	Gatačko Polje, Avtovica, B&H	K	43° 09' 15"	18° 31' 32"	940	54
9.	Mt. Biokovo, Lađena, Cro	K	43° 17' 27"	17° 05' 25"	1265	7
10.	Mt. Biokovo, Vošac, Cro	K	43° 18' 46"	17° 04' 01"	1340	9
11.	Kladanj, Katranica, B&H	S	44° 16' 09"	18° 33' 15"	800-940	26
12.	Žepče, Matinski Vis, B&H	S	44° 28' 03"	17° 58' 37"	820-900	23
13.	Mt. Zlatibor, Mokra Gora, Srb	S	43° 49' 09"	19° 30' 24"	810	11

**Napomena:** GŠ, sjeverna geografska širina; GD, istočna geografska dužina; NV, nadmorska visina; N, broj analiziranih individua; K, krečnjak ; S, serpentin; B&H, Bosna i Hercegovina; Cro, Hrvatska; Srb, Srbija.

Biljni uzorci su očišćeni sa svježom vodom, a zatim saprani destilovanom vodom, kako bi se odstranile sve površinske nečistoće. Nakon separiranja, biljni uzorci (nadzemni izdanci i lukovice) su sušeni na temperaturi od 60°C tokom 24 sata i pohranjeni u polietilenske posude do analiziranja. Uzorci tla su sušeni na sobnoj temperaturi, prosijani kroz sito veličine otvora <2mm, u ahatnom tarioniku usitnjeni do veličine čestica 100µm i pohranjeni u polietilenske posude do analiziranja.

Pripadajuća rizosfera analiziranih bijelih narcisa je uzorkovana u čiste polietilenske vrećice. Uzorci tla su sušeni na sobnoj temperaturi, prosijani kroz sito veličine otvora <2mm, u ahatnom tarioniku usitnjeni do veličine čestica 100µm i pohranjeni u papirne kese do analiziranja količine elemenata i pH tla.

Izbor postupka određivanja sadržaja Ni, Co, Mn, Fe, Mg i Ca u biljnom materijalu je prvenstveno zavisio od njihovih kemijskih i termokemijskih osobina. Naime, oksidi ovih elemenata su lako rastvorljivi u kiselinama i praktički nisu isparljivi na temperaturama od oko 1200°C. Navedene karakteristike su bile odlučujuće za izbor termičkog načina mineralizacije biljnog materijala (spaljivanjem), a na osnovu instrukcija proizvođača uređaja atomskog apsorpcionog spektrometra (AAS) i iskustva Laboratorija (Perkin Elmer Manual, 1996). Dodatna pogodnost načina mineralizacije i pripravljanja otopina uzoraka, u kojima se pomoću AAS vrši mjerenje sadržaja određenog elementa, osim brzine određivanja, ogleda se i u činjenici da je neophodna vrlo mala količina reagensa/kiseline, što umanjuje i mogućnost pojave greške u očitavanju rezultata, jer je manja mogućnost kontaminacije i/ili gubitaka. Preliminarna mjerenja sadržaja elemenata u biljnom materijalu su potvrdila ispravnost izbora određivanja koncentracije elemenata tehnikom plamene, a ne bezplamene AAS tehnike elektrotermičke atomizacije (HGA), s obzirom da je sadržaj analiziranih elemenata u

uzorcima bio dovoljno visok, što omogućava dobijanje pouzdano tačnog i preciznog rezultata.

Ukupna količina Ni, Co, Mn, Fe, Mg i Ca u uzorcima tla i biljnog materijala je analizirana pomoću atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS), korištenjem uređaja Perkin-Elmer M 3110, na metalurškom institutu „Kemal Kapetanović Zenica“, Univerziteta u Zenici.

### **2.2.1. Određivanje pH rizosfere uzorkovanih bijelih narcisa**

Vrijednosti pH tala su determinirane pH metrom u zasićenom mulju = otopini tlo/deionizirana voda (v/v, 1:2.5; 20 g uzorka tla i 50 ml vode; Steubing, 1965).

### **2.2.2. Određivanje sadržaja Ni, Co, Mn, Fe, Mg i Ca u biljnom materijalu**

Odvagano je  $0.5 \pm 0.001$  g uzorka biljnog materijala pomoću analitičke vage i kvantitativno preneseno u platinski lončić. Lončić s odvaganim uzorkom je prenesen u hladnu električnu žarnu peć (Gerhard), koja se u narednih 3 sata zagrijavala do temperature od  $800^{\circ}\text{C}$ , čime se postiglo postepeno, a ne naglo, sagorijevanje organske komponente uzorka i izbjegao "mehanički" gubitak uzorka. Nakon potpunog spaljivanja organske komponente i hlađenja uzorka do sobne temperature, sadržaj pepela u lončiću je razblažen sa 2-3 ml redestilirane vode, a zatim je u lončić dodato 2 ml nitratne kiseline ( $\text{HNO}_3$ , BDH Aristar, UK). Nakon toga je lončić pokriven platinskim poklopčićem i prenesen na grijnu platu kako bi se sadržaj otopio na temperaturi nešto nižoj od temperature ključanja otopine ( $100\text{-}110^{\circ}\text{C}$ ). Potpuno otopljeni



sadržaj je iz lončića kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 10 ml u koju je, nakon hlađenja do sobne temperature, pipetom dodano 2 ml 0.2% otopine lantan nitrata [La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O; BDH Aristar, UK] i dopunjeno redestiliranom vodom do marke. Otopina lantana (0.1-1%) se dodaje kako bi se suzbile eventualne kemijske interferencije u plamenu.

Paralelno sa pripremom otopina uzoraka, pripremane su i referentne otopine za konstrukciju kalibracione krivulje. Na taj način se postiže kompenzacija eventualnih odstupanja sobne temperature pri kojoj su vršena očitavanja, ali i to da se uvijek koristi isti set reagensija (i.e. veoma važno zbog "slijepe" probe). Kalibraciona krivulja je konstruisana sa tri tačke, u okviru čijih raspona se nalaze i najniže i najviše koncentracije određivanih elemenata iz uzoraka i slijepe probe. U četiri odmjerne tikvice je dodavana ista količina reagensa kao kod obrade uzoraka, s tim da su u tri od njih dodavani alikvoti standardnih otopina elemenata čiji je sadržaj određivan.

### **2.2.3. Određivanje sadržaja Ni, Co, Mn, Fe, Mg i Ca u tlu**

S obzirom da je sadržaj određivanih elemenata u tlu, izuzimajući Ca a djelomično i Mg i Fe, nizak, za njihovo određivanje je korištena atomska apsorpciona spektrofotometrija tehnike plamena. Razblaživanjem otopine i snimanjem apsorpcije na talasnim duljinama koje daju nižu osjetljivost (gdje je to bilo neophodno), pomoću AAS je bilo moguće odrediti i sadržaje Ca, Mg i Fe.

Prema uputstvu proizvođača (Perkin-Elmer Manual, 1996), pripremljene su otopine uzoraka te postavljeni parametri, energija lampe (šuplja katoda), talasna duljina i tip plamena (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-zrak ili C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>O), pri kojim je mjerena apsorpcija pojedinih elemenata na AAS.

Izvagano je  $0.2 \pm 0.001$  g tla i kvantitativno preneseno u platinski lončić, koji je zatim stavljen u žarnu peć na temperaturu od  $850^{\circ}\text{C}$  kako bi se odstranili tragovi organske materije. Nakon hlađenja u eksikatoru, u lončić je dodato 1 ml redestilirane vode uz lagano homogeniziranje sadržaja. U lončić je zatim dodat 1 ml koncentrirane nitratne kiseline, 2 ml koncentrirane perklorne kiseline ( $\text{HClO}_4$  p.a., Merck, Njemačka) i 2 ml koncentrirane fluorovodonične kiseline ( $\text{HF}$  p.a., Merck, Njemačka). Lončić sa homogeniziranim rastvorom je prenesen na platu i sadržaj je zagrijan do temperature ključanja. Kada je sadržaj u lončiću uparen do naznake pojave perklorne isparenja, temperatura plate je povećana kako bi se pojavila perklorna isparenja. Nakon isparavanja perklorne kiseline, lončić se djelimično hladio i u njega se dodalo 10 ml 50% otopine klorovodonične kiseline ( $\text{HCl}$ , BDH Aristar, UK), koji se potom ponovo zagrijavao do temperature ključanja, kako bi se potpuno rastvorio sadržaj (soli). Ovako dobiven rastvor je iz lončića, sapiranjem zidova redestiliranom vodom, kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu, u koju je potom dodato 5 ml otopina lantana i dopunjeno do 25 ml redestiliranom vodom. Sadržaj u tikvici se potom homogenizirao, čime je obrada uzorka za mjerenje apsorbancije na AAS bila završena.

Standardne otopine određivanih elemenata u koncentraciji od  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  su pripremljeni otapanjem spektrografski čistih ( $\geq 99,99\%$ ) određivanih elemenata u kloridnoj ili nitratnoj kiselini, ili su pripremljeni otapanjem karbonata u kloridnoj kiselini (za Ca i Mg). Kalibracione otopine su pripremane na isti način kao i za biljni materijal, s obzirom da je Si isplinjen, a ostali elementi su odmjeravani.

Mjerenja koncentracija elemenata u biljnom materijalu i tlu su vršena u serijama po pet otopina uzoraka. Kako su rađene po dvije otopine istog uzorka istovremeno, mjerenje apsorbance je izvođeno prvo na pet otopina prve paralelke, a zatim druge.

Linearnost kalibracione krivulje je kod svakog elementa provjeravana nakon mjerenja apsorbancije seta od pet otopina prve paralelke.

#### 2.2.4. Preračunavanje očitanih vrijednosti na AAS

Iako su koncentracije otopina za kalibracionu krivulju iskazivane u  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , koncentracije pojedinih elemenata u uzorcima su iskazivane u  $\text{mg kg}^{-1}$ . Preračunavanje se vršilo prema sljedećoj formuli:

$$\text{Konc elem (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{A \cdot V}{m}$$

Gdje su:

A – očitana koncentracija otopine na AAS ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

V – volumen tikvice (10 ili 25 ml)

m – početna masa suhe materije (0.2 ili 0.5 g)

### 2.3. Citogenetičke metode

Biljni materijal (svježi listovi za određivanje veličine genoma i lukovice za citogenetička istraživanja) iz svih 13 istraživanih populacija je prikupljen u periodu 2007-2010 godine. Lokaliteti, supstrati i geografske koordinate, te broj analiziranih individua su predstavljeni u Tabeli 1 i Fig. 5. Živi materijal je uzgajan u stakleniku Univerziteta Pariz-Jug (Université Paris-Sud, Francuska) kako bi se dobili meristemi korjenčića za hromosomske analize.

### 2.3.1. Priprema hromosoma

Za citogenetičku analizu su korišteni korjenčići dužine 1.5-2.5 cm, koji su tretirani ili sa 0.05% rastvorom kolhicina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka) u trajanju od 2-4 sata na temperaturi od 18-20°C, ili sa 0.002 M 8-hidroksikinolinom u trajanju od 3-4 sata na temperaturi od 16°C. Nakon toga, korjenčići su fiksirani u svježe napravljenom rastvoru Carnoy II (etanol:sirćetna kiselina, 3:1, v/v) narednih 24-48 sati u frižideru na +4°C, a potom prebačeni u 70% etanol i pohranjeni na temperaturu od -20°C.



Fig. 5. Lokacije istraživanih populacija bijelog narcisa (v. Tabelu 1)

### 2.3.2. Bojenje meristema korjenčića po Feulgen metodi i određivanje kariotipa klasičnom metodom

Bojenje hromosoma se vršilo prema metodi Feulgen i Rossenbeck (1924). Vršena je vruća hidroliza, pomoću 1M HCl na 60°C u vodenom kupatilu, u trajanju od 12-14 minuta. Hidrolizirani korjenčići su, potom, potapani u Schiffov reagens na sobnoj temperaturi, u tamnoj komori. Nakon najmanje 30 minuta, obojeni vršak korjenčića (meristem) je disekovan skalpelom i prebačen na predmetno staklo u kapljicu 45% glacijalne sirćetne kiseline, kako bi se napravio preparat klasičnom "squash" metodom. Ovako pripremljeni preparati su korišteni za analizu morfologije hromosoma, određivanje kariotipa te za konstruiranje idiograma.

Determinacija pozicije centromera, tipa hromosoma i uparivanje homologih hromosoma se vršilo na osnovu nomenklature i metode po Levan *et al.* (1964). Totalna dužina hromosoma (TLC), centromerni index (Ci), odnos krakova (r), index asimetrije (AsI%, prema Arano i Saito, 1980) te odnos najkraći/najduži hromosomski par (R) su korišteni za karakterizaciju kariotipa. Sateliti i dužine sekundarnih konstrikcija nisu uključene u mjerenja. Konstruiranje idiograma kao i poredak hromosoma su vršeni na osnovu opadajuće totalne dužine hromosoma, odnosa krakova i srednje vrijednosti centromernog indexa. Statistička analiza dobivenih podataka je vršena pomoću standardnog T-testa.

### **2.3.3. Bojenje srebro-nitratom ( $\text{AgNO}_3$ )**

U svrhu određivanja aktivnosti ribosomalnih gena 18S-5.8S-26S vršilo se bojenje nukleusa srebro-nitratom ( $\text{AgNO}_3$ ). Mladi korjenčići su tokom noći držani u 2% otopini srebro-nitrata, na temperaturi od 60°C (Hall i Parker, 1995). Naime, otopina srebro-nitrata se vezuje za proteine prisutne u regiji nukleolarnog organizatora (i nukleolusima), što se na citogenetičkom nivou očituje tamno obojenjem u ovim hromosomskim/nuklearnim regijama. Za svaku populaciju je prebrojavano stotinu nukleusa, u kojima su se jasno mogli uočiti i prebrojati tamnije obojeni nukleolusi.

### 2.3.4. Molekularno-citogenetičke metode – Fluorohrom bojenje

#### hromosoma

Na osnovu različitih tipova fluorohrom bojenja (*Chromomycin A<sub>3</sub>* bojenje, *Hoechst 33258* bojenje) omogućena je vizualizacija repetitivnih ili visokorepetitivnih regija DNK, bogatih GC ili AT bazama. Nakon predtretmana i fiksacije korjenčića vršena je enzimatska hidroliza biljnih ćelija (Fig. 6), modifikacijom protokola Geber i Schweizer (1988). Poslije ispiranja u citratnom puferu<sup>4</sup>, korjenčići su hidrolizirani u enzimatskom rastvoru<sup>5</sup>, napravljenom u istom puferu, u vlažnoj komori na temperaturi od 37°C u trajanju od 10-30 minuta. Na ovaj način, ćelije oslobođene od peкто-celuloznog zida (protoplasti) se prebacuju u kap 45% sirćetne kiseline na predmetnom stakalcetu. Ovako dobivena suspenzija protoplasta se promatra pod Wild fazno-kontrastnim mikroskopom (Wild M20).

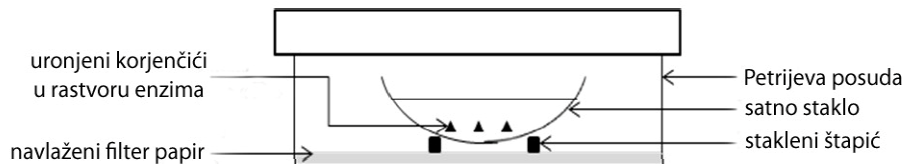


Fig. 6. Shematski prikaz enzimske digestije korjenčića za dobivanje protoplasta (prema Abdeddaim-Boughanmi, 2010).

Odabrani preparati su se oslobađali pokrovnice metodom brzog zamrzavanja (Conger i Fairchild, 1953) pomoću CO<sub>2</sub> (ili na -80°C) i nakon ispiranja apsolutnim alkoholom ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi do konačne upotrebe.

<sup>4</sup> 0.01M citratna kiselina-natrij citrat, pH 4.69

<sup>5</sup> 4% celulaza Onozuka R10/Onozuka, Japan/, 1% pektolijaza Y23 /Seishin Pharmaceutical, Japan/ i 4% hemicelulaza /Sigma Chemical Co., Francuska/

### 2.3.4.1. Chromomycin A<sub>3</sub> bojenje

Pomoću fluorohroma *chromomycin A<sub>3</sub>* (antibiotik iz grupe hromomicina, CMA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka) se mogu identificirati regioni DNK bogati guanin i citozin bazama. Ti regioni emitiraju fluorescenciju (eksitacija na  $\lambda_{\max}=435\text{nm}$ ) nakon izlaganja svjetlosti talasne dužine  $\lambda_{\max}=560\text{nm}$  (Sumner, 1990). Bojenje je izvedeno po izmjenjenim protokolima Schweizer (1976), Kondo i Hizume (1982) i Siljak-Yakovlev *et al.* (2002).

Osušeni preparati su inkubirani 15 minuta, na sobnoj temperaturi, u citratno-fosfornom puferu McIlvain pH7<sup>6</sup> uz dodatak 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Nakon otklanjanja pufera nanosio se rastvor *chromomycin A<sub>3</sub>* boje, koncentracije 0.2 mg ml<sup>-1</sup>, otopljene u McIlvain puferu pH 7. Ova boja je djelovala 90 minuta, na sobnoj temperaturi i u zamračenom prostoru, prije nego je saprana McIlvain puferom pH 7. Narednih 7 minuta (u istim uvjetima) preparati su bojani metil-zelenom bojom (0.5% u McIlvain puferu, pH 5.5<sup>7</sup>), a u cilju dobivanja kontrasta. Konačno, preparati su isprani McIlvain puferom pH 5.5; djelimično osušeni i uklopljeni u rastvoru glicerola "Citifluor AF<sub>2</sub>".

### 2.3.4.2. Hoechst 33258 bojenje

Prema neznatno izmjenjenoj metodologiji Martin i Hesemann (1988), identificirani su regioni DNK bogati adenin-timin bazama pomoću *Hoechst 33258* {2,2-(4-hidroksifenil)-6-benzimidazolil-6-(1-metil4-piperazil)-benzimidazol-trihidrohlorid; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka} bojenja.

---

<sup>6</sup> McIlvain pH 7=6.5 ml (0.21 g citratne kiseline + 10 ml destilovane H<sub>2</sub>O) + 43.6 ml (1.78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O + 50 ml H<sub>2</sub>O) + 49.9 ml H<sub>2</sub>O

<sup>7</sup> McIlvain pH 5.5=21.6 ml (1.05 g citratne kiseline + 50 ml destilovane H<sub>2</sub>O) + 28.4 ml (2.136 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O + 60 ml H<sub>2</sub>O) + 50 ml H<sub>2</sub>O

Region od minimalno četiri do pet uzastopnih baznih AT parova (Godelle *et al.*, 1993) će se vezati za ovu boju, a jačina fluorescencije će zavisiti od koncentracije *Hoechst* i same veličine regiona DNK (eksitacija  $\lambda_{\max}=356\text{nm}$ , a emisija na  $\lambda_{\max}=465\text{nm}$ ) (Sumner, 1990).

U predtretmanu bojenja fluorohromom *Hoechst* potrebno je izvršiti rehidraciju preparata sukcesivnim dodavanjem različitih koncentracija alkohola etanola (70%, 50% , 30%, i to u svakom po pet minuta), potom ih ispirati u destiliranoj vodi, pa onda inkubirati 10 minuta u McIlvain puferu pH 5.5. Nakon toga se na preparat nanosi fluorohrom *Hoechst* ( $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) u trajanju od dvije minute, u zatamnjenom prostoru i na sobnoj temperaturi. Ispiranje je vršeno 2-3 puta u okomitom položaju, te 15 min u zamračenom prostoru pomoću McIlvain pufera pH 5.5, i na kraju u destiliranoj vodi (15 minuta). Nepotpuno osušeni preparati se potom uklapaju u rastvoru glicerola "Citifluor AF2". Na ovaj način je omogućena precizna linearna diferencijacija dobivena različitim molekularno-citogenetičkim metodama na istim metafaznim figurama.

Po potrebi, nakon fluorohrom bojenja, preparati se obezbojavaju potapanjem u fiksativ (etanol-sirćetna kiselina, 3:1) ili u 2xSSC. Nakon uklanjanja pokrovnice i otapanja citifluora, preparati se provlače kroz seriju otopina 70%, 90% i 100% etanola.

#### **2.3.4.3. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)**

Ribosomalna RNA je kod eukariota kvantitativno najzastupljeniji tip ribonukleinske kiseline. Prema modificiranoj metodi Heslop-Harrison *et al.* (1991) kao hibridizacijske sonde, u DNK:DNK dvostrukoj simultanoj *in situ* hibridizaciji, služe ribosomalni geni 5S i 18S-5.8S-26S (18S).

Priprema sonde i njihovo markiranje je izvršeno prema Cerbah *et al.* (1999) protokolu. *EcoRI* fragment, veličine 4 kb, koji odgovara dijelu 18S-5.8S-26S rDNK,



zajedno s internim transkribujućim razmaknicama (ITS), izolovan iz vrste *Arabidopsis thaliana* L., je korišten kao 18S rDNK sonda. 18S rDNK hibridizacijska sonda je markirana pomoću Cy<sub>3</sub> fluorohroma (Amersham Co., Francuska) nik-translacijom.

Sonda 5S rDNK odgovara plazmidu pTa794 sa cijelim 410-bp *Bam*HI fragmentom 5S rRNA gena izolovanim iz *Triticum vulgare* L. (Gerlach i Dyer, 1980). Sonda je markirana pomoću haptena digoxigenina<sup>11</sup>-dUTP<sup>8</sup> (Roche Diagnostics, Meylan, Francuska) PCR metodom.

Prethodno obezbojeni preparati, nakon fluorohrom bojenja, su podvrgnuti predtretmanu, tj. oslobođeni od RNA i proteina, koji mogu biti smetnja uspješnoj hibridizaciji, jer neciljana vezivanja mogu pojačati neželjene signale u pozadini (Fig. 7).

Inkubacijom na temperaturi od 37°C u trajanju od jednog sata, preparati se podvrgavaju RNaznom tretmanu (100 µg ml<sup>-1</sup>), gdje se željena koncentracija RNaze dobiva pomoću pufera 2xSSC<sup>9</sup> (pH 7). Nakon trostrukog (po pet minuta) ispiranja u 2SSC preparati se tretiraju 10-15 minuta, na temperaturi od 37°C pepsinom (0.1 mg ml<sup>-1</sup> pepsina u 0.01 N HCl), koji digestira ostatak citoplazme. Ponovo slijedi ispiranje preparata, ali ovog puta ultračistom vodom (dvije minute), te dvostruko ispiranje (po pet minuta) u 2xSSC puferu.

Potapanjem preparata u seriju otopina 70%, 90% i 100% etanola (po tri minute) vrši se njihova dehidracija. Nakon toga se preparati suše na sobnoj temperaturi najviše dva sata, i pomoću fazno-kontrastnog mikroskopa se provjerava prisustvo prethodno markiranih figura.

---

<sup>8</sup> Digoxigenin je steroid izolovan iz vrste *Digitalis purpurea* L.

<sup>9</sup> 2xSSC=0.03 M natrij citrat + 0.3M natrij hlorid u omjeru 1:1.

Uspješnost hibridizacije zavisi od:

1. baznog sastava probe i ciljanih sekvenci, kao i dužine njihovih fragmenata i
2. temperature i koncentracije iona natrija te formamida pri postupku hibridizacije.

Da bi došlo do hibridizacije potrebno je da postoji najmanje 40% komplementarnih baza na u ciljnoj (hromosomalnoj) DNK i DNK probi. Kraći fragmenti, sa jako visokim procentom homologije sa ciljanom sekvencom, imaju veću mogućnost hibridizacije. Heslop-Harisson (2000) navodi da je veoma bitno i to koji dijelovi proba su nehomologi sa ciljanom sekvencom.

Karakteristična je visoka zastupljenost GC baza u ribosomalnim genima koji kodiraju 18S-26S rRNA molekule. GC bogate sekvence, za razliku od AT sekvenci, zahtjevaju ekstremnije uvjete za denaturaciju: veću temperaturu i koncentraciju formamida, a nižu koncentraciju soli. Upravo ovi uvjeti zahtjevaju apsolutnu komplementarnost probe i ciljane sekvence, zbog velike nestabilnosti dvostrukog heliksa.

Destabilizaciju dvostrukog heliksa DNK:DNK vrši formamid ( $\text{CH}_3\text{NO}$ ) koji, ujedno, omogućava i korištenje nižih temperatura hibridizacije. S druge strane, stabilizaciju heliksa povećavaju monovalentni kationi natrija uz slabi SSC pufer (pH 7) ili uz natrij fosfatni pufer (1M do 20M).

U cilju odvijanja simultane hibridizacije korišten je po 1  $\mu\text{l}$  svake od rDNK proba (koncentracije 50  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  5S rDNK sonde i 40  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  18S-26S rDNK sonde). Sonde su, na kraju, dodavane u pripremljenu hibridizacijsku smjesu:

1. 10  $\mu\text{l}$  dextran sulfata [10% (w/v)] koji povećava volumen hibridizacijske smjese bez njenog razblaživanja;
2. 25  $\mu\text{l}$  formamida [50% (v/v)];
3. 3  $\mu\text{l}$  SDS (natrij dodecil sulfat) [0.1% (w/v)] koji pomaže kod penetracije probe;
4. 1.5  $\mu\text{l}$  sperme lososa ( $250 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) – ova inertna DNK omogućava vezivanja nespecifične probe i proteina ili drugih neciljanih DNK sekvenci;
5. 5  $\mu\text{l}$  20xSSC;
6. i do konačnog volumena hibridizacijske smjese (50  $\mu\text{l}$  po predmetnom staklu) dodana je ultračista voda.

Denaturacija hibridizacijske smjese je trajala 10 minuta na temperaturi od  $72^{\circ}\text{C}$  te je nakon toga prebačena na led i ostavljena da se hladi najmanje pet minuta. Po 40-50  $\mu\text{l}$  denaturirane smjese je nanoseno na svaki preparat koji su potom, prekriveni plastičnom pokrovnicom i ponovo, denaturirani 10 minuta na temperaturi od  $72^{\circ}\text{C}$ . Slijedilo je prebacivanje preparata u vodeno kupatilo na temperaturu od  $55^{\circ}\text{C}$  u trajanju od pet minuta, te u termostat na temperaturu od  $37^{\circ}\text{C}$  u vlažnu komoru, tokom narednih 16 sati.

Sljedeći dan se vršilo posthibridizacijsko ispiranje preparata u 2xSSC na sobnoj temperaturi, a radi uklanjanja nevezanih i slabo hibridiziranih signala. Potom je slijedila serija ispiranja preparata u trajanju od pet minuta na temperaturi od  $42^{\circ}\text{C}$ :

- tri ispiranja u 2xSSC,
- dva ispiranja u 20% formamidu,
- jedno ispiranje u 0.1xSSC,
- tri ispiranja u 2xSSC,

- jedno ispiranje u 4xSSCT<sup>10</sup> i
- jedno ispiranje u 4xSSCT na sobnoj temperaturi.

Detekcija hibridiziranih regiona, markiranih digoxigeninom, je izvršena pomoću anti-digoxigenina (anti-hapten antitijela). Preparati su tretirani u trajanju od pet minuta sa 5% (w/v) BSA (bovin serum albumin) rastopljenim u 4xSSCT, tj. tamponom za detekciju. Nakon toga se na preparate nanosio anti-dioxigenin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) u istom tamponu (koncentracije 20 µg ml<sup>-1</sup>). Narednih sat vremena, na temperaturi od 37°C, je trajala inkubacija te serija ispiranja preparata u 4xSSCT, tri puta po pet minuta na sobnoj temperaturi.

Na kraju FISH eksperimenta, preparati su uklapani u medij za uklapanje (Vectashield mounting medium, Vector Laboratories, Peterborough, UK) koji u sebi sadrži fluorohrom DAPI. Na taj način su hromosomi obojeni plavo (pozadinsko bojenje), kako bi se istakli zeleni i crveni hibridizacijski signali koji odgovaraju 18S-26S i 5S rDNK lokusima.

### **2.3.5. Analiza preparata i priprema fotodokumentacije**

Preparati su nakon bojenja fluorohromima te nakon FISH-a posmatrani i fotografirani pomoću epifluorescentnog Zeiss Axiophot mikroskopa, uz korištenje seta filtera (01, 07, 15 i trostruki 25) i visoko osjetljive CCD kamere (Retiga 2000R, Princeton Instruments, Evry, Francuska). Dobivene fotografije su obrađivane odgovarajućim programom za akviziciju i analizu slike (MetaVue Image analyzer, Metavue, vers.7.0r4 Evry, Francuska) te u programu Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Švicarska).

---

<sup>10</sup> Dodavanjem 0.2% deterdženta Tween 20 u SSC nastaje SSCT.

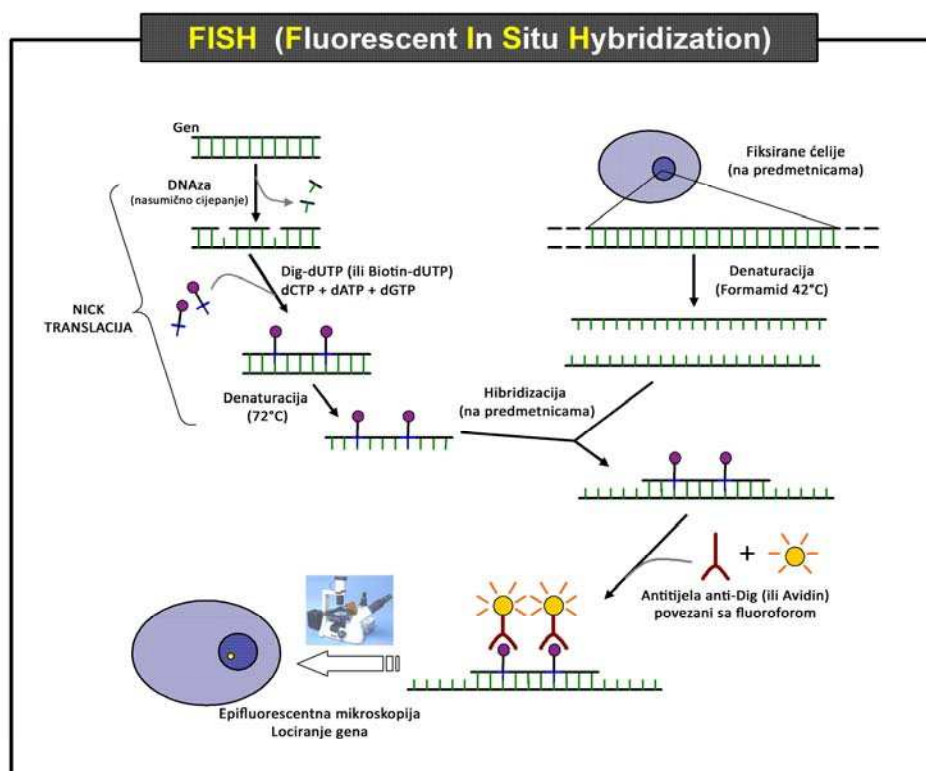


Fig. 7. Shematski prikaz principa FISH eksperimenta za lokalizovanje gena u nukleusu

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:FISH\\_\(Fluorescent\\_In\\_Situ\\_Hybridization\).jp](http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:FISH_(Fluorescent_In_Situ_Hybridization).jp)

## 2.4. Statistička obrada podataka

Deskriptivna statistika je obuhvatila sljedeće parametre: 2C DNK, sklonosti biljaka ka supstratu, životne forme i tipa ciklusa, koncentracije analiziranih elemenata i pH vrijednosti tala. U cilju predstavljanja varijabilnosti pojedinačnih varijabli izračunate su aritmetička sredina, standardna devijacija, koeficijent varijacije, minimum i maksimum. Pomoću univarijantnih metoda ANOVA (analiza varijance) izvršena su testiranja srednjih vrijednosti za grupe, te je korišten Tukey test u cilju detekcije eventualnih razlika. Također, korišten je i Spearman test korelacije u cilju analize odnosa između vrijednosti veličine genoma očitanih u ovoj studiji i rezultata drugih autora.

## 3. REZULTATI

### 3.1. Analizirane biljne vrste na krajnjem sjeverozapadnom arealu serpentina na Balkanu

#### 3.1.1. Veličina genoma i serpentinofite

U ovoj studiji su prezentirani podaci za 308 svojiti koje obitavaju na serpentinskoj podlozi Bosne i Hercegovine, Zapadne Srbije i FYR Makedonije (Tabela 2). Prema našim saznanjima i pristupačnim bazama podataka, dobivene vrijednosti su nove za 28 roda (dva roda papratnjača, tri monokotiledona i 23 eudikotiledona) i 97 vrsta na specijskom i 2 svoje (Tabela 2, Prilog 1). Izmjerene 1C-vrijednosti se kreću od 0.14 pg za *Selaginella helvetica* do 41.59 pg za *Lilium martagon* (Prilog 1), pokazujući ~300-struki raspon. U Prilogu 1 su predstavljeni sklonost svojiti prema tipu supstrata, tip životnog ciklusa, tip životne

forme, 2C-vrijednosti u pg, 1C-vrijednosti u Mbp, i 1Cx-vrijednosti u pg (prema Greilhuber *et al.*, 2005). Hromosomski broj i nivo ploidiije su ili determinirani u ovoj studiji (indicirano sa zvjezdicom) ili preuzeti iz relevantne literature (Fedorov, 1969; IPCN; Bennet i Leich, 2005; Loureiro *et al.*, 2008).

**TABELA 2.** Pregled zbirnih podataka za istraživane taksone.

	Ukupan broj	Prve C-vrijednosti
<b>Taksoni</b>	<b>308</b>	<b>99</b>
Mahovine	1	0
Papratnjače	10	4
Četinjače	6	0
Monokotile	26	10
Dikotile	265	85
<b>Rodovi</b>	<b>213</b>	<b>28</b>
Mahovine	1	0
Papratnjače	7	2
Četinjače	2	0
Monokotile	22	3
Dikotile	181	23
<b>Porodice</b>	<b>80</b>	<b>0</b>
Mahovine	1	0
Papratnjače	7	0
Četinjače	2	0
Monokotile	10	0
Dikotile	60	0

Logaritamski prikaz 1C veličine genoma (Fig. 8) ima pravilnu sigmoidnu krivu i pokazuje da je uzorak slučajan. Međutim, interesantno je primjetiti da distribucija 1C-vrijednosti nije kontinuirana, jer se mogu uočiti četiri prekida u logaritamskoj krivoj: jedan odgovara vrlo malim 1C-vrijednostima, dok preostala tri odgovaraju srednjim, velikim i vrlo velikim veličinama genoma (Fig. 8). Prema Leitch *et al.* (1998) više od pola izmjerenih svojti (55.63%) imaju vrlo male, dok 22.19% svojti imaju male i 18.75% srednje 1C-vrijednosti. Svojte sa velikim i vrlo velikim veličinama genoma su prisutne u malom broju (3.13% i 0.31%) i predstavljaju uglavnom čine četinjače i monokotiledone biljke.

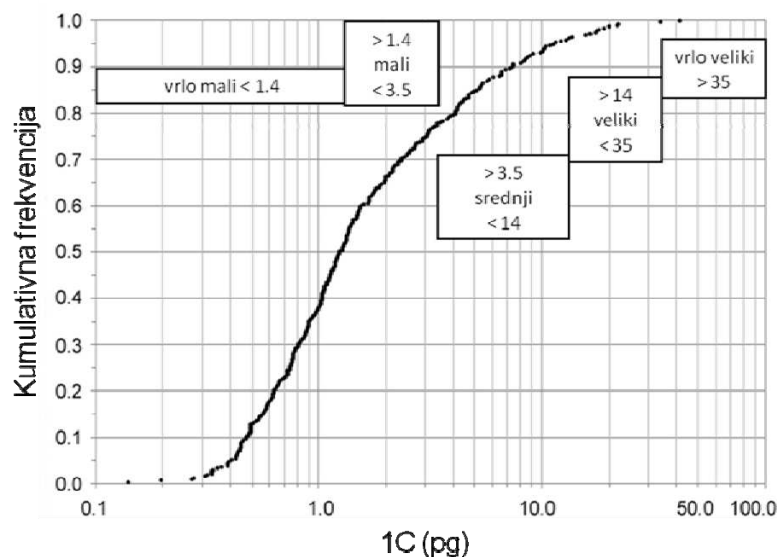


Fig. 8. Kumulativna frekvencija 1C-vrijednosti istraživanih svojti.

Prisutna je visoka pozitivna korelacija ( $r=0.94$ ,  $p<0.05$ , Fig. 9) između 208 prethodno publikovanih i naših mjerenja 1C-vrijednosti. Signifikantne razlike se uočavaju kod nekih vrsta (Fig. 9), što najčešće reflektira različite nivoe ploidije tih svojti. U okviru ove studije je detektovano 10 vrsta sa različitim nivoima ploidije (*Centaurea micranthos*, *Convolvulus arvensis*, *Coronilla varia*, *Daphne mezereum*, *Helianthemum*

*nummularium*, *Leucanthemum vulgare*, *Narcissus poeticus*, *Solidago virgaurea*, *Tanacetum corymbosum* i *Veronica urticifolia*; Prilog 1).

Kod nekih vrsta sa velikim i vrlo velikim genomima (*Lilium bosniacum*, *L. martagon* i *Narcissus poeticus*) je uočeno povećanje DNK C-vrijednosti kod individua koje posjeduju B hromosome, naročito u slučaju većeg broja B hromosoma. S druge strane, detekcija već uočenih B hromosoma klasičnim citogenetičkim metodama nije bila moguća pomoću protočne citometrije kod svojte sa vrlo malom veličinom genoma (*Stachys recta* var. *chrysophea*).

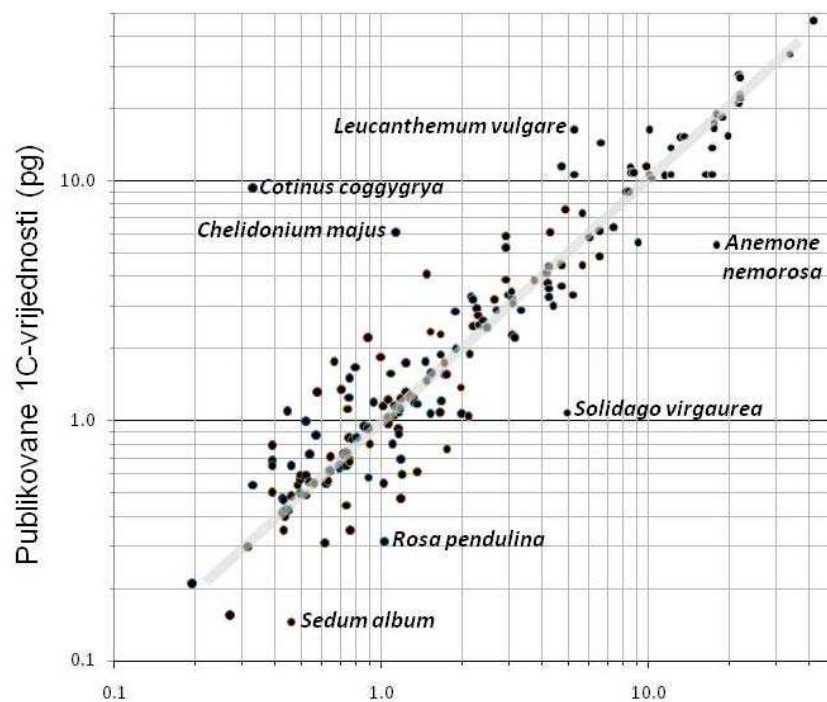


Fig. 9. Poređenje prethodno publikovanih i naših 1Cx podataka (siva linija je tačna korelaciona linija sa  $\pm 5\%$  odstupanja).



### 3.1.2. Odnos veličine genoma i nekih karakteristika serpentinofigita

U analiziranom biljnom setu, najprisutnije porodice sa vrlo malim genomima su Rosaceae (19 svojti), Fabaceae (12), Brassicaceae (10) i Scrophulariaceae (10). Porodica Asteraceae je jedina prisutna sa 10 i više svojti u kategorijama malih (15) i srednjih (10) genoma.

S obzirom na sklonost sakupljenih individua prema tipu geološke podloge, može se uočiti da je prisutno samo 24 vrsta vezanih za serpentin (Fig. 10). Najzastupljenije porodice u kategoriji vrsta vezanih za serpentin su Brassicaceae i Caryophyllaceae (s tri svojte). S druge strane, najveći broj svojti su indiferentne vrste (171) i fakultativne vrste koje se mogu naći i na krečnjaku (103). U stvari, indiferentne svojte su najprisutnije u svakoj kategoriji veličine genoma.

Prema tipu životnog ciklusa, u analiziranom uzorku, čak 272 svojte (88.31%) su višegodišnje biljke. Više od polovine višegodišnjih biljaka imaju vrlo male genome (57%), a po 20% male i srednje genome (Fig. 10). Interesantno je napomenuti da je prisutno relativno malo jednogodišnjih biljaka (~4%).

U analiziranom uzorku, hemikriptofite (149, 48.38%) su dominantna životna forma. Slijede fanerofite (17%), hamefite (15%) te terofite i geofite sa po 9% (Fig. 10).

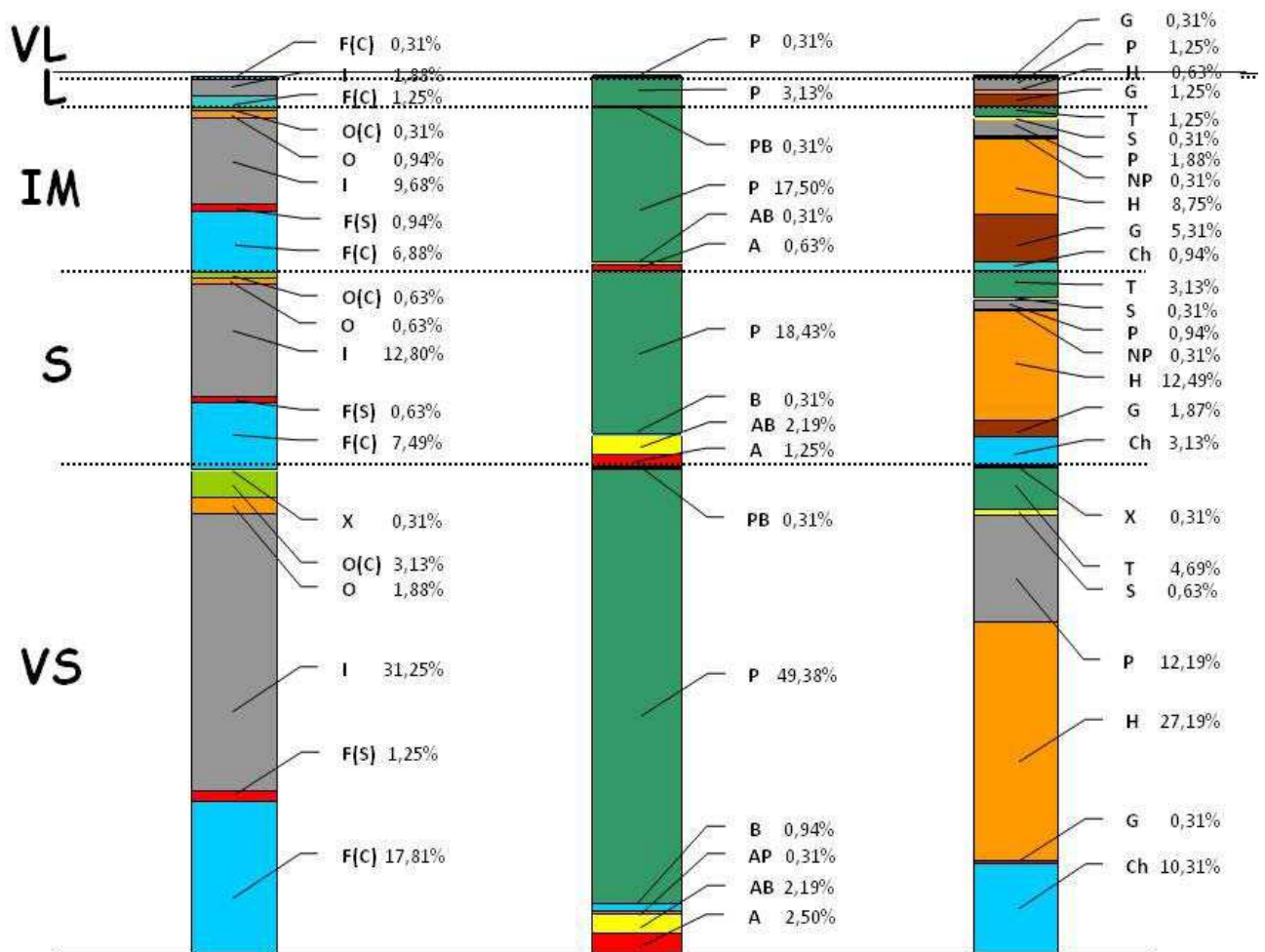


Fig. 10. Procentualna zastupljenost istraživanih vrsta, klasificiranih prema veličini genoma i njihovoj grupisanosti na osnovu: a) sklonosti prema supstratu; b) tipu životnog ciklusa; c) tipu životne forme. Veličina genoma: VS-vrlo mali; S-mali; IM-srednji; L-veliki; VL-vrlo veliki. Sklonost ka supstratu: F(C)-fakultativne serpentinofite koje se pretežno mogu naći na krečnjaku; F(S)-fakultativne serpentinofite koje se pretežno mogu naći na silikatu; I-indiferentne; O-obligatne; O(C)-obligatne serpentinofite koje se veoma rijetko mogu naći i na krečnjačkoj podlozi; X-Nepoznato. Tip životnog ciklusa: A-jednogodišnja; B-dvogodišnja; AB-jedno-dvogodišnja; AP-jedno-višegodišnja; P-višegodišnja; PB-dvogodišnje- višegodišnje. Tip životne forme: Ch—hamefite; G—geofite; H—hemikriptofite; NP—žbunovi ispod 2 m; P—fanerofite; S—penjačice i lijane; T—terofite; X—nepoznato.

### **3.2. *Narcissus poeticus* i neki biogeni elementi**

Vrijednosti prezentirane u Tabeli 3 predstavljaju raspon pH tala, raspone srednjih vrijednosti minimalna–maksimalna koncentracija analiziranih elemenata nakon tri ponavljanja, i odnose Ca/Mg u nadzemnim i podzemnim dijelovima biljaka i pripadajućim tlima.

Interesantno je uočiti da su srednje najmanje i najveće vrijednosti pH tla izmjerene na kraškim poljima: najmanja u populaciji 3 (pH 4.64), a najveća u populaciji 5 (pH 7.85; Tabela 3). Vrijednosti pH serpentinskih tala su u rasponu od pH 5.39-6.95. Nije uočeno postojanje korelacije između pH tla i sadržaja teških metala u analiziranim tlima.

Koncentracije mangana su bile višestruko veće u tlu nego u biljnim dijelovima (Tabela 3). Vrijednosti Mn u krečnjačkim tlima su znatno varijabilnije (44-4800 ppm), dok su ujednačenije u serpentinskim populacijama (600-2000 ppm). Nadzemni dijelovi biljaka su uvijek sadržavali veće količine Mn u odnosu na podzemne, osim u populaciji 13. U populacijama 2, 3, 7, 11 i 12 nadzemni i podzemni dijelovi analiziranih individua imali su približno slične i ujednačene vrijednosti koncentracija Mn (do 10 ppm). Također, potrebno je napomenuti da je kod nekoliko analiziranih individua u populacijama 5 i 12 koncentracija Mn bila ispod praga osjetljivosti AAS, iako je pripadajuća rizosfera imala relativno veliku koncentraciju Mn. S druge strane, populacija 5 se, u odnosu na sve ostale, karakterisala nešto većim razlikama u koncentracijama Mn (20-40 ppm) između nadzemnih i podzemnih dijelova.

Izmjerene koncentracije Ni u serpentinskim tlima su bile višestruko veće u odnosu na vrijednosti krečnjačkih tala (Tabela 3). Koncentracije usvojenog Ni u podzemnim izdancima su bile manje u odnosu na nadzemne, s očekivano većim vrijednostima kod

individua iz serpentinskih populacija. Nivo Ni u tkivu individua u populacijama 6 i 10 je bio manji od detekcionog limita.

Iako su koncentracije kobalta u serpentinskim tlima bile značajno veće, biljke su, u svim populacijama, pokazivale relativno ujednačene koncentracije kako u nadzemnom tako i u podzemnom dijelu (Tabela 3). Izuzetak su bile tri individue iz serpentinske populacije 13, koje su imale akumuliranog Co u podzemnom izdanku čak i do četiri puta više u odnosu na nadzemni. U tkivima serpentinskih individua je koncentracija Co uvijek bila niža od Ni, što nije uvijek slučaj s individuama sa krečnjačke podloge.

Koncentracije željeza su uglavnom veće u lukovicama u odnosu na nadzemne izdanke (osim u populacijama 5 i 11), ali uvijek znatno manje od koncentracija u tlima. Općenito, koncentracije Fe u serpentinskim tlima su veće u odnosu na krečnjačke (Tabela 3), što nije slučaj i sa koncentracijama u biljnim tkivima.

Serpentinska tla su se karakterizirala skoro dvostruko većim vrijednostima magnezija u odnosu na krečnjačka tla (Tabela 3). Nadzemni biljni dijelovi su, uglavnom, imali veće koncentracije Mg u odnosu na podzemne dijelove. Međutim, individue iz serpentinskih populacija su uglavnom pokazivale suprotan trend.

Iznenadjuća je konstatacija da je rizosfera analiziranih individua bijelog narcisa iz serpentinskih populacija uglavnom imala veće koncentracije kalcija u odnosu na krečnjačke (Tabela 3). Međutim, skoro sve individue, bez obzira na geološku podlogu, su akumulirale više Ca u podzemnim izdancima.

Izmjenljivi Mg u svim istraživanim tlima je bio u suvišku u odnosu na Ca. Biljke serpentinskih populacija su u većini slučajeva sadržavale veće nivoe Mg od Ca, te je odnos Ca/Mg u biljnom tkivu bio  $<1$  i mnogo više varirao nego u tlu. S druge strane, krečnjačka tla su imala relativno slične vrijednosti izmjenjivih iona Ca i Mg, te je raspon

**TABELA 3.** Kemijske karakteristike (pH tala, minimalne i maksimalne koncentracije elemenata u ppm, i odnosi Ca/Mg) nadzemnog i podzemnog izdanka te rizosfere istraživanih individua vrste *Narcissus poeticus* u uzorkovanim populacijama.

Populacija	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
<b>pH tla</b>	5.38	4.64-5.32	7.43-7.85	5.54	5.80-7.57	4.89-7.14	6.42-7.24	6.98-7.24	5.39-6.22	6.02-6.95	5.50-6.35	
<b>Mn</b>	L	24.2	25.60-36.60	24.98-38.00	17.6	34.60-48.20	25.40-32.80	28.80-29.80	19.60-32.70	18.30-29.40	2.00-24.00	22.40-29.20
	K	21.6	21.60-43.20	0-4.00	9.2	33.00-43.20	12.20-25.00	14.00-29.40	6.40-8.00	13.40-27.00	0-4.23	21.80-58.30
	T	109.5	1560-2550	687.50-1112	44	540.00-4800	274.50-369.00	246.00-284.50	153.00-229.50	1150-2000	862.50-1588	600.00-1075
<b>Ni</b>	L	4.6	5.80-7.90	0.20-1.04	<0.01	0.40-4.40	2.20-5.20	2.60-3.00	<0.01	11.80-36.20	5.80-22.62	7.40-32.80
	K	0.6	0.60-11.60	0-0.60	<0.01	0.40-2.20	1.60-4.60	1.60-3.40	<0.01	5.10-17.80	5.20-28.40	15.70-55.60
	T	32.5	56.00-90.00	58.75-88.75	15.5	64.00-89.00	42.50-44.50	25.00-30.00	3.00-24.50	1100-1530	1000-1425	725.00-1675.00
<b>Co</b>	L	3.2	0.60-1.40	0.40-2.70	4.4	2.20-3.20	2.00-3.20	2.60-2.80	1.20-2.68	1.40-3.30	0-1.40	3.00-4.06
	K	3.6	1.60-2.00	1.60-3.20	1.6	1.80-3.40	1.80-2.60	3.20-4.40	0.80-1.20	0.80-3.70	0.42-1.00	2.40-15.00
	T	16	32.50-41.00	36.25-52.50	10.5	23.50-29.00	12.50-13.00	13.50-14.00	11.00-12.50	94.50-160.00	67.50-153.80	60.00-111.30
<b>Fe</b>	L	56.4	64.00-161.00	96.00-322.40	86	58.00-400.00	86.80-122.00	183.60-308.00	127.60-150.40	137.00-706.30	96.00-386.60	60.30-126.00
	K	98.2	103.80-222.60	42.00-186.00	154	212.00-276.00	248.00-250.00	148.40-396.00	125.20-151.80	90.40-158.00	68.00-853.20	82.00-621.30
	T	13250	30500-35100	27000-49000	8650	17000-30500	12250-13000	13000-13750	7950-13200	52900-65200	48750-67750	28750-51250
<b>Mg</b>	L	1240	960.00-1280	1996-2837	1240	186.00-242.00	1500-1780	1380-2260	2480-2587	2510-4288	2174-4236	3600-5257
	K	920	640.00-1440	1004-2656	1340	210.00-380.00	880.00-1420	660.00-1540	920.00-1360	2040-4400	2635-6971	5280-17204
	T	2950	4360-4910	8313-47625	900	4400-7600	3350-4250	2500-2700	2700-3300	63000-91050	39500-81687	48125-93750

Populacija		2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ca	L	4120	2800-5680	2954-3440	5720	928.00-1516	3920-6520	1880-6800	9400-10794	920.00-2089	346.00-2292	1552-2064
	K	5680	5600-10400	2880-5680	4380	816.00-1448	4020-4340	10440-14240	5740-10860	1376-3027	406.00-1635	2760-3680
	T	395	57.50-283.00	725.00-8000	18.5	645.00-1200	915.00-1800	705.00-1260	650.00-1600	6380-8210	1413-5625	2075-3375
Ca/Mg	L	3.32	2.69-5.92	1.04-1.72	4.61	4.84-6.80	2.61-3.66	1.36-3.01	3.79-4.17	0.25-0.75	0.08-0.45	0.06-0.54
	K	6.17	4.24-8.88	2.02-3.52	3.27	2.99-6.32	3.06-4.57	9.25-15.82	6.24-7.99	0.31-0.91	0.11-0.62	0.21-0.53
	T	0.13	0.01-0.06	0.09-0.29	0.02	0.11-0.27	0.27-0.42	0.28-0.47	0.20-0.59	0.07-0.13	0.04-0.08	0.03-0.06

**Napomena:** L–list; K–podzemni izdanak sa korjenčićima; T–rizosfera; Populacije: 2-Mt. Čvrsnica, Barice; 3-Glamočko Polje, Mliništa; 5-Livanjsko Polje, Peulje; 6-Livanjsko Polje, Čelebići; 7-Mt. Čvrsnica, Rakitno; 8-Gatačko Polje, Avtovica; 9-Mt. Biokovo, Lađena; 10-Mt. Biokovo, Vošac; 11-Kladanj, Katranica; 12-Žepče, Matinski Vis; 13-Mt. Zlatibor, Mokra Gora.

variranja odnosa Ca/Mg veoma mali. Međutim, iako su odnosi Ca/Mg očekivano u biljnim dijelovima bili  $>1$ , njihov raspon variranja je bio relativno velik, s uglavnom većim vrijednostima u lukovicama u odnosu na nadzemni izdanak (Tabela 3).

### **3.3. Citogenetičke osobenosti *Narcissus poeticus* na zapadnom Balkanu**

Na Fig. 11 dat je prikaz nekih karakteristika istraživanih populacija (veličina i gustina) i individua (morfologija, boja, veličina i broj cvjetova) bijelog narcisa.

#### **3.3.1. Osnovne karakteristike kariotipa**

Individue svih istraživanih populacija *N. poeticus* su se karakterisale diploidnim hromosomskim brojem  $2n=2x=14$ , uz izuzetak dvije populacije (8 i 12), gdje su pronađene i triploidne individue,  $2n=3x=21$ . Uočene su interindividualne varijabilnosti kariotipa (jedinki oba nivoa ploidije) s obzirom na prisustvo B hromosoma (varijabilan broj i morfologija kod različitih jedinki).

Morfometrijski podaci o kariotipu su predstavljeni u Tabeli 4, s osnovnom hromosomskom formulom za vrstu *N. poeticus*  $2n=8\ sm + 2\ m + 2\ st + 2\ sm-m^{sat}$ . Većina uočenih B hromosoma su bili submetacentričnog tipa, ali su također uočeni i metacentrični i akrocentrični tipovi. Srednja dužina hromosoma varira od 5.02 do 9.31  $\mu\text{m}$ , dok B hromosomi predstavljaju  $2/3$  dužine najkraćeg para A hromosomske garniture.

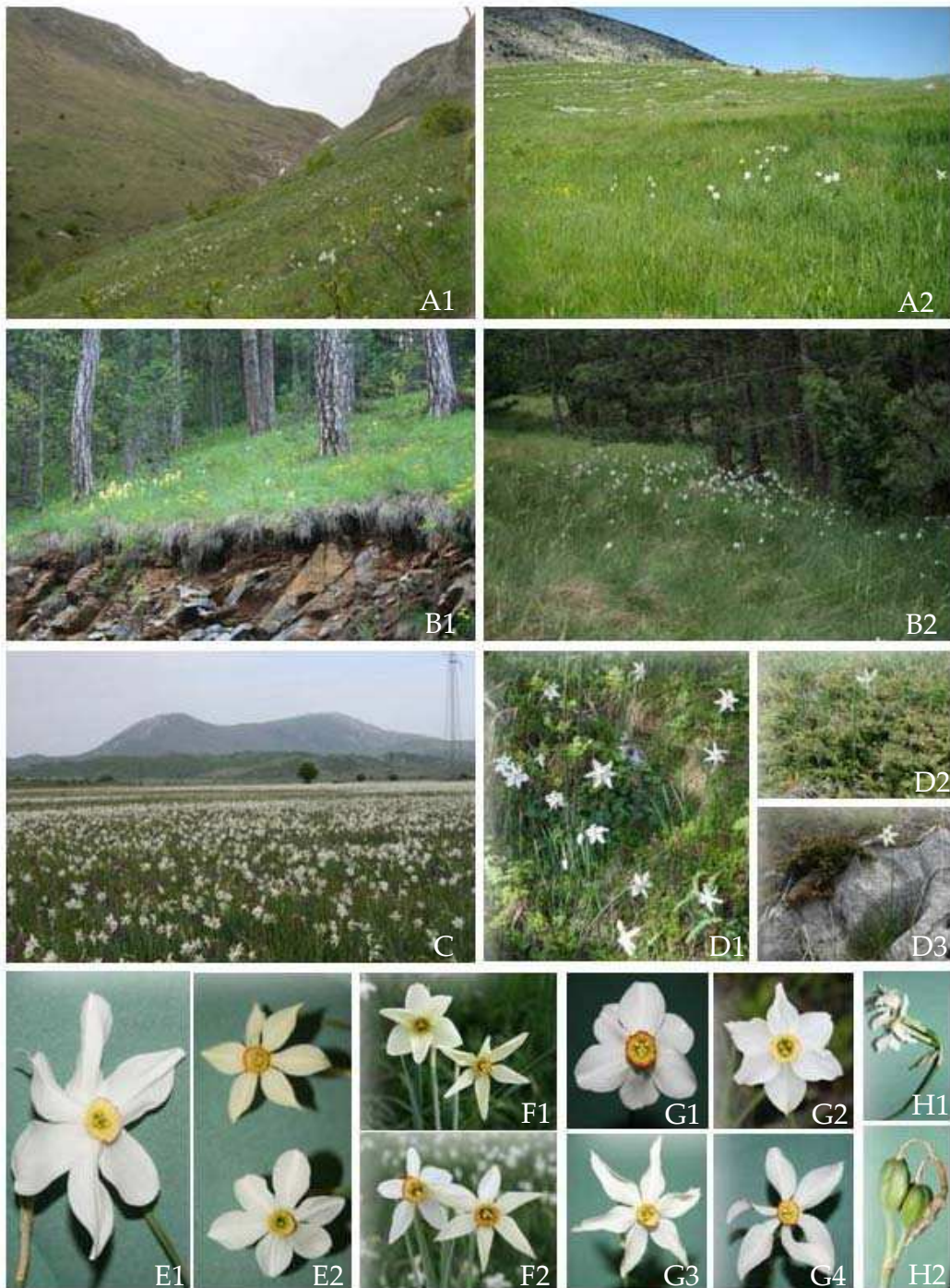


Fig. 11. Neke karakteristike istraživanih populacija i individua *N. poeticus*. Različita brojnost populacija: A1 i A2, subalpinske i submontane livade; B1 i B2, serpentinški habitati; C, populacija na kraškom polju; D, različita 'skloništa' individua: D1, serpentinška i D2-3, subalpinska populacija; E1 i E2, različita veličina i boja cvjetova na lokalitetu Mokra Gora; F1 i F2, različita obojenost cvjetova na kraškim poljima; G1-4, različita morfologija cvjetova u kraškoj populaciji; H, rijetki dvo cvjetni bijeli narcisi: H1, serpentinška i H2, subalpinska populacija.



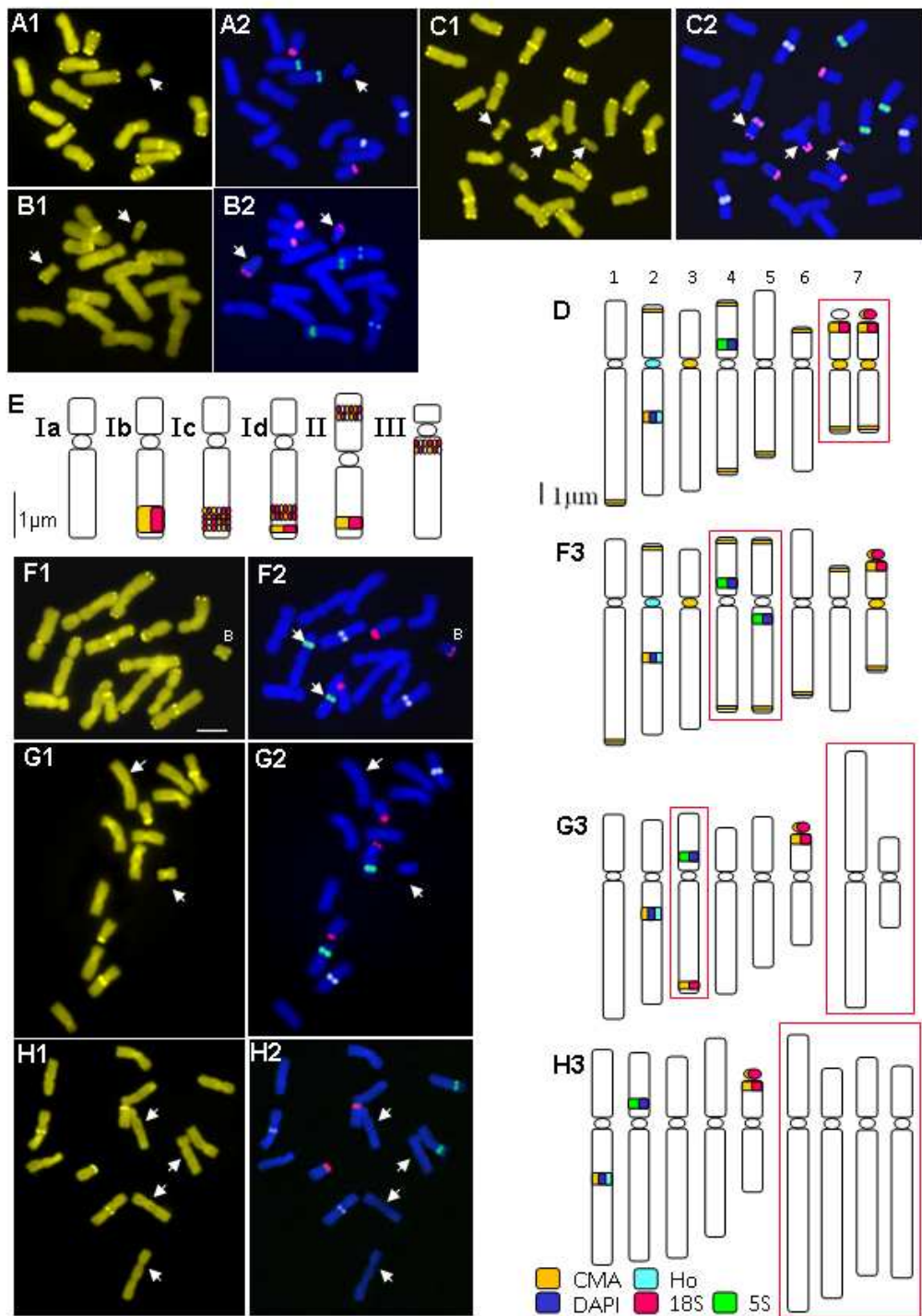
**TABELA 4.** Srednje vrijednosti morfometrijskih podataka za haploidni kariotip *Narcissus poeticus* u 13 istraživanih populacija.

Hrom. par	1	2	3	4	5	6	7	I	II	III
L ( $\mu\text{m}\pm\text{sd}$ )	6.49 $\pm$ 0.14	6.09 $\pm$ 0.26	5.95 $\pm$ 0.17	5.61 $\pm$ 0.39	4.42 $\pm$ 0.35	5.89 $\pm$ 0.19	3.15 $\pm$ 0.19	2.49 $\pm$ 0.89	1.89 $\pm$ 0.13	2.86 $\pm$ 0.21
S ( $\mu\text{m}\pm\text{sd}$ )	2.82 $\pm$ 0.27	2.78 $\pm$ 0.19	2.35 $\pm$ 0.24	2.69 $\pm$ 0.38	3.21 $\pm$ 0.37	1.64 $\pm$ 0.18	1.87 $\pm$ 0.47	1.05 $\pm$ 0.99	1.78 $\pm$ 0.19	0.48 $\pm$ 0.12
TLC ( $\mu\text{m}\pm\text{sd}$ )	9.31 $\pm$ 0.34	8.87 $\pm$ 0.25	8.30 $\pm$ 0.16	8.30 $\pm$ 0.38	7.63 $\pm$ 0.28	7.53 $\pm$ 0.05	5.02 $\pm$ 0.21	3.54 $\pm$ 0.05	3.67 $\pm$ 0.07	3.34 $\pm$ 0.11
r	2.30	2.19	2.53	2.09	1.38	3.59	1.68	2.37	1.06	6.00
Ci	30.29	31.34	28.31	32.41	42.07	21.78	37.25			
CT	sm	sm	sm	sm	m	st	m-sm	sm	m	st
$\Sigma\text{TLC}$	54.96									
AsI	67.05									
R	1.85									

**Napomena:** L–dugi krak; S–kratki krak; TLC–totalna dužina hromosoma (TLC = L+S); r–odnos krakova ( $r = L/S$ ); Ci–centromerni index [ $Ci = 100 \times S/(L+S)$ ]; CT–tip hromosoma [m–metacentrični, sm–submetacentrični, st–subtelocentrični; prema Levan *et al.*, 1964];  $\Sigma\text{TLC}$ –totalna dužina hromosoma za haploidni kariotip; AsI–asimetrični index [ $AsI \% = (\sum L / \sum TL) \times 100$ ; prema Arano et Saito, 1980]; R–odnos najduži/najkraći hromosomski par; sd–standardna devijacija; I,II,III–tipovi B hromosoma.

### 3.3.2. Organizacija heterohromatina

U osnovnom kariotipu *N. poeticus* pronađena su 22-24 CMA signala, u zavisnosti od njihove prisutnosti na satelitnom paru 7, distribuirana na svim hromosomima (Fig. 12 A1, B1 i D; Tabela 5). Hromosomski parovi 1 i 5 posjeduju samo jedan terminalni CMA signal na dugom kraku, dok je na paru 6 lociran samo jedan signal na kratkom kraku. Hromosomski par 3 posjeduje samo centromerni CMA band, a hromosomski par 4 ima slabe terminalne CMA signale na oba kraka. Jak interkalarni band na dugom kraku i slab terminalni signal na kratkom kraku su uočeni na hromosomskom paru 2. Satelitni hromosomski par 7 se karakteriše sa jednim centromernim bandom i jednim slabim terminalnim signalom na dugom kraku koji nije uvijek bio vidljiv. Dodatno, ovaj



**Fig. 12.** Rezultati hromomicin bandinga i FISH eksperimenta za različite populacije *N. poeticus*. **A1** CMA i **A2** FISH za diploide kraških populacija sa 1 B hromosomom (strelica); **B1** CMA i **B2** FISH za diploide serpentinske populacije sa 2 Bs (strelice); **C1** CMA i **C2** FISH za triploidnu populaciju sa 3 različita tipa Bs (strelice, kraška populacija); **D** idiogram standardnog diploidnog kariotipa /dva homologna hromosoma para 7 pokazuju razliku u obrascu bojenja satelita (uokvireno); **E** različiti tipovi B hromosoma: **Ia** submetacentrični B hromosom bez signala, **Ib**, **Ic**, **Id** submetacentrični B hromosomi sa različitim obrascem signala (kolokalizacija CMA i 18S u bloku **Ib**, disperziran **Ic**, ili s oba obrasca **Id**); **II** metacentrični B hromosom sa dva signal na oba kraka, jedan u bloku a drugi disperziran, i tip **III** subtelocentrični B hromosom sa jednim disperziranim signalom na dugom kraku blizu centromere; **F1** CMA, **F2** FISH i **F3** idiogram individue iz serpentinske populacije s inverzijom na paru 4 (strelice, uokvireno); **G1** i **H1** CMA, **G2** i **H2** FISH, i **G3** i **H3** idiogrami dvije individue sa translokacijama (populacije na serpentinu /G/ i subalpinskoj livadi /H/, neupareni hromosomi uokvireni). Bar na fotografijama = 10 $\mu$ m.

hromosomski par posjeduje vrlo jake CMA signale na obje strane sekundarne konstrikcije (SC), uključujući satelit, ili samo na terminalnom dijelu kratkog kraka, bez bojenja satelita (Fig. 12 A1, B1 i D–uokvireno).

**TABELA 5.** Nivo ploidije; karakteristike hromosomskog para 7; broj, tip B hromosoma, broj nukleolusa, i ekološke karakteristike analiziranih populacija.

Br	2n	Hrom. par 7		Tip B hr.	Broj nukleolusa	Karakteristike habitata
		CMA	18S			
1.	14	+/-	+/-	/	1-2	Kratka vegetacijska sezona
2.	14 <sup>T,RV</sup>	+/-	+/-	/	1-2	Dugotrajan snježni pokrivač
3.	14	+/-	+/-	/	1-2	Visoke negativne temperature
4.	14			/	1-2	Dugotrajan mraz
5.	14+0-1B hr.	+	+	Ib, Ic	1-3	Kraška polja
6.	14+0-1B hr.	+	+	Ib, Ic	1-3	Vodni stres
7.	14+0-1B hr.	+	+	Ia, Ib, Ic	1-3	Velike temperaturne
8.	14+0-3B hr.	+	+	Ib, Ic, Id, II, III	1-6	oscilacije
	21+0-3B hr.					Dugotrajan snježni pokrivač
9.	14+0-1B hr.	+	+	Ic, Id	1-3	Vodni stres
10.	14+0-1B hr.	+	+	Ia, Id	1-3	Visoke ljetne temperature
						Visoka insolacija
						Plitka tla
						Jaki vjetrovi
11.	14+0-2B hr.	+	+	Ib, Ic, Id	1-4	Vodni stres
12.	14 <sup>T</sup> +0-1B hr.	+	+	Ib, Ic, Id	1-3	Velike temperaturne oscilacije
	21					Teški metali
13.	14+0-1B hr.	+	+	Ib, Ic, Id	1-3	Visoka insolacija
						Plitka tla

**Napomena:** Br pop–broj populacije prema Tabeli 1; CMA–hromomicin bandovi; 18S–18S rDNK lokusi; T–prisustvo hromosomskih translokacija; RV–vrlo vlažno tokom ljeta; B hr.–B hromosom.

Hoechst bojenje je pokazalo da je samo hromosomski par 2 posjeduje AT bogate regione: slabi centromerni i jaki interkalarni bandovi na dugom kraku, koji kolokalizira sa CMA bandom (Fig. 12 A2, B2 i D).

Interkalarni DAPI signali uočeni su nakon FISH eksperimenta na hromosomskim parovima 2 (dugi krak) i 4 (kratki krak), koji odgovaraju konstitutivnom heterohromatinu (Fig. 12 A2, B2 i D).

Sve triploidne individue imale su iste osnovne karakteristike kariotipa kao diploidi (Fig. 12 C1, C2 i D).

### **3.3.3. Fizikalno mapiranje rDNK**

Ova studija po prvi put otkriva broj i položaj 18S-26S i 5S rDNK lokusa na kromosomima vrste *N. poeticus*. Osnovni kariotip (Fig. 12 A1, A2, B1, B2, D) posjeduje jedan 5S rDNK lokus na hromosomskom paru 4, dok je 18S rDNK lokus bio vidljiv kao veoma jak signal na terminalnom dijelu kratkog kraka ili na obje strane sekundarne konstrikcije hromosomskog para 7. Hromosomski par 4 nosi 5S signale na kratkom kraku koji su DAPI pozitivni (Fig. 12 A2, B2, D).

Standardni rDNK obrazac za diploide je također prisutan i u kariotipu triploidnih individua.

### **3.3.4. Specifičan sistem B hromosoma kod *N. poeticus***

Jedan do tri B hromosoma je uočeno u većini istraživanih populacija (u 9/13 populacija). Kod diploidnih individua B hromosom je predstavljao 3.22% (tip I), 3.39% (tip II) i 3.11% (tip III) totalne dužine A hromosoma. Kod triploidnih individua sa tri B hromosoma, oni su predstavljali 6.53% totalne dužine hromosomskog komplementa (Tabela 4).

Dodatni hromosomi se karakterišu sa različitim obrascima GC bogatih regiona i brojem-položajem 18S rDNK lokusa (rDNK kariotip). Submetacentričan tip B hromosoma koji je najčešće prisutan kod *N. poeticus* (tip I) pokazuje četiri različita obrasca. Mali broj individua je posjedovao B hromosome bez signala (Fig. 12 A1, A2, E-Ia). Svi ostali submetacentrični B hromosomi su posjedovali CMA signale koji su kolokalizirali sa 18S rRNA genima na dugom kraku. Tri kombinacije kolokalizirajućih signala su bile vidljive: jedan jaki band (tip Ib), veća disperzna zona (tip Ic), ili kombinacija ova dva obrasca (tip Id) [Fig 12. B1, B2, C1, C2, 1E Ib, Ic, Id]. Metacentrični tip B hromosoma (tip II) je posjedovao CMA bandove kolokalizirane sa 18S rRNA genima na oba kraka: jak subtelocentrični signal na dugom kraku i disperzni subtelocentrični signal na kratkom kraku (Fig. 12 C1, C2, E II). Subtelocentrični B hromosom (tip III) se karakterizirao sa disperznim CMA bandovima, kolokaliziranim sa 18S rRNA genima, na subcentromernoj poziciji na dugom kraku (Fig. 12 C1, C2, E III).

Triploidna individua iz populacije 8 je posjedovala tri morfološki različita tipa B hromosoma: tip I, II i III (Fig. 12 C1, C2, E; Tabela 5). Mali broj diploidnih individua je posjedovao B hromosome bez konstitutivnog heterohromatina i rRNA gena (tip Ia), dok su drugi posjedovali Ib, Ic ili Id tip B hromosoma (Fig. 12 E; Tabela 5). Individue u serpentinskim populacijama (11, 12 i 13) su se karakterizirale sa prisustvom 1-2 submetacentrična B hromosoma, Ib, Ic ili Id tipa.

Interesantno je napomenuti da individue na subalpinskim livadama, sa ili bez kolokalizacije CMA banda i 18S rDNK lokusa na terminalnom dijelu kratkog kraka hromosomskog para 7 (Tabela 5), nisu posjedovale B hromosome.

Aktivnost rRNA gena lociranih na B hromosomima je potvrđena bojenjem nukleolusa pomoću srebro-nitrata. U slučaju kada su B hromosomi nosili rRNA gene

broj obrazovanih nukleolusa se povećao i odgovarao ukupnom broju 18S rDNK lokusa uočenih na A i B hromosomima.

Sve uočene citogenetičke karakteristike analiziranih individua su bile stabilne tokom tri ili četiri godine uzgajanja u stakleniku Univerziteta Paris-Sud, Francuska.

### **3.3.5. Odstupanja od standardnih karakteristika kariotipa**

Neke individue sa različitim hromosomalnim translokacijama i inverzijama su uočene u tri populacije: dvije na serpentinskoj i jedna subalpinska na krečnjačkoj podlozi.

Jedan tip odstupanja kariotipa je uočen kod individue koja je imala B hromosom u populaciji 11 na serpentinskoj podlozi (Fig. 12 F1, F2, F3). Ovaj kariotip se karakterisao s inverzijom velikog dijela hromosoma na jednom homologu para 4. Ovu inverziju je bilo moguće uočiti zahvaljujući prisustvu markera kao što su DAPI band i 5S rDNK lokus na invertnom dijelu hromosoma. Inače, ovaj kariotip je posjedovao iste CMA i Hoechst obrasce kao i individue sa standardnim kariotipom.

Dva tipa hromosomalnih translokacija uočenih u populacijama 2 i 12 prouzrokovala su jasno različite kariotipove u odnosu na standardan kariotip. Za serpentinsku individuu (populacija 12; Fig. 12 G1, G2, G3) je bilo moguće kompletirati samo šest homologih parova, a dva neuparena metacentrična hromosoma bila su karakterizirana važnim razlikama u njihovoj dužini. Tako je ova individua imala pet submetacentričnih parova, jedan subtelocentričan par i dva neuparena metacentrična hromosoma (Fig. 12 G3). Kariotip individue sa planinskih livada na krečnjaku (populacija 2) bio je sastavljen od jednog metacentričnog i četiri submetacentrična para

te četiri neuparena submetacentrična hromosoma (Fig. 12 H1, H2, H3). Najvjerovatnije je nekoliko hromosoma učestvovalo u ovim translokacijama.

Individue sa translokacijama su imale skoro identičan CMA i Hoechst obrazac kao u osnovnom kariotipu. Razlika je uočena u odsustvu centromernog Hoechst signala na hromosomskom paru 2, koji već posjeduje Hoechst band na dugom kraku. Osim toga, telomerni i centromerni CMA signali se nisu uočili na hromosomima ovih dviju individua.

U odnosu na osnovni kariotip, individue sa translokacijama (populacije 12 i 2; Fig. 12 G2, G3, H2, H3) pokazuju istovjetan obrazac DAPI bandova te 5S i 18S rDNK lokusa. Jedino se individua iz serpentinske populacije 2 karakterizirala prisustvom dodatnog terminalnog neuparenog 18S rDNK lokusa na dugom kraku hromosomskog para 3 (Fig. 12 G2, G3–uokvireno).

### **3.3.6. Procjena veličine genoma**

Srednja vrijednost veličine genoma koja se odnosi na 13 populacija predstavljena je u Tabeli 6. Mjerenja su izvršena kod diploidnih biljaka bez B hromosoma i sa 1-2 B hromosoma, triploidnih biljaka bez B hromosoma i sa 3 B hromosoma, kao i kod biljaka sa hromosomalnim translokacijama.

Među istraživanim populacijama se veličina genoma za diploide bez B hromosoma kretala u rasponu od 23.97 do 25.84 pg, za diploid sa B hromosomima od 24.31-26.86 pg, za triploide bez B hromosoma od 34.51 do 35.32 pg, i za triploidnu individuu sa 3B hromosoma 38.80 pg (Tabela 6). Analiza varijanse (ANOVA) je pokazala da postoje signifikantne razlike među grupama. LSD test je pokazao da su

interpopulacijske razlike u veličini genoma između populacija sa ili bez B hromosoma signifikantne ( $p < 0.05$ ).

Intrapopulacijske razlike u 2C DNK vrijednostima između diploidnih individua sa i bez B hromosoma su također bile signifikantne ( $p < 0.01$ ). S obzirom da je detaljno i produbljeno istraživanje o veličini genoma *N. poeticus* u toku, ovdje su prezentirani samo preliminarni rezultati.

**TABELA 6.** Veličina genoma različitih varijanti kariotipa vrste *Narcissus poeticus*.

	Diploidi				Triploidi		
	Bez B hr.	Sa 1B hr.	S 2B hr.	Translokacije		Bez B hr.	S 3B hr.
				Serpentin	Krečnjak		
2C DNK (pg±sd)	25.25±0.39	25.81±0.36	26.52±0.15	25.77	24.91	34.55±0.59	38.80
% za B hr. (±sd)		3.29±0.07	5.94±0.03				6.53

**Napomena:** Za diploide su srednje vrijednosti računane za 39 individua bez B hromosoma, 27 individua sa 1 B hromosomom, dvije individue sa 2 B hromosoma, po jedna individua sa translokacijama iz serpentinske i krečnjačke populacije. Srednja vrijednost je predstavljena za tri triploidne individue bez B hromosoma, i za jednu individuu sa 3 B hromosoma; B hr.–B hromosom; sd–standardna devijacija; % za B hr.–procenat veličine genoma koji se odnosi na B hromosome.



## 4. DISKUSIJA

### 4.1. Neke karakteristike biljnih vrsta na krajnjem sjeverozapadnom arealu ofiolitske zone Balkanskog poluostrva

S obzirom da se Balkansko poluostrvo karakterizira izvanrednim biljnim diverzitetom, ono predstavlja jedno od glavnih *hotspot* regiona u Europi. Zapravo, ovo područje je jedno od najvažnijih europskih refugijuma, veoma bogato tercijskim reliktima te elementima glacijalne i postglacijalne flore, što ga čini prirodnim laboratorijom za evolutivne studije (Krystufek i Reed, 2004; Thompson, 2005; Taberlet *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 2002; Stevanović *et al.*, 2003; Siljak-Yakovev *et al.*, 2010).

Ultramafitne podloge su „domaćini“ specifične flore razvijene tokom dugoročnoj interakciji s edafskim i fizikalnim karakteristikama pripadajućih tala (Brooks 1987; Baker *et al.* 1992; Roberts i Proctor 1992). Najvjerojatnije fizički faktori (kseričnost tla, nagib i insolacija) i sadržaj nutrijenata u tlu imaju veći utjecaj na sastav vrsta nego sadržaj teških metala u tlu (Chiarucci *et al.*, 2001). U kombinaciji s općenito stjenovitim i izloženim ultramafitnim stijenama, sastav minerala i njihov odnos kreiraju negostoljubiv okoliš za mnoge biljke (Kruckeberg 1979; Rajakaruna i Whittton, 2004). Zbog specifičnih kemijskih i fizioloških uvjeta serpentinska tla predstavljaju ekstremni selektivni pritisak za biljne organizme te se smatraju podstrekačima specijacijskih događaja (Kruckeberg, 1984). Rezultat ovih procesa je jedinstvena flora, visoka stopa endemizma i velik broj vrsta s ograničenim rasprostranjenjem (Brooks 1987; Whittaker 1954; Stevanović *et al.*, 2003). Ipak, karakteristične flore određenog regiona su rezultat kombinacije svakog pojedinačnog područja sa jedinstvenim okolišnim, geokemijskim i

fizičkim karakteristikama (Proctor i Nagy, 1991; Coleman i Jove, 1991; Rajakaruna i Bohm, 1999).

Prema Brady i suradnicima, serpentinska tla se, iako posjeduju bogat diverzitet endemičnih vrsta, smatraju nisko produktivnim staništima koje naseljava flora često okarakterisana tipičnom tolerancijom na različite stresne faktore (Brady *et al.*, 2005). Sposobnost vrsta da koloniziraju i prežive na serpentинима se razvila od njihovih neserpentinskih predaka. U mnogim slučajevima nove vrste opstaju na serpentínima upravo usljed toga što su slabi kompetitori na drugim supstratima. Kao rezultat ovog ostrvskog efekta, serpentinski supstrati su domaćini relativno velikom broju vrsta koje se mogu naći samo na serpentínima i koje imaju veoma ograničeno rasprostranjenje. Neke od ovih vrsta su ugrožene zbog antropogenog uticaja, ali mnoge su rijetke upravo zbog neuobičajenog ograničenja u njihovoj distribuciji. S druge strane nisu sve vrste koje rastu na serpentínima ograničene samo na ove supstrate, što im omogućava da imaju široko rasprostranjenje.

Prema Riter-Studnička (1963), u odnosu na istovjetne grupacije na krečnjacima, na serpentínima BiH se uočava velika jednoličnost u oblicima vegetacije kao i siromaštvo u brojnosti vrsta. Usljed specifičnih mikroklimatskih prilika, na serpentínima Bosne najveće površine biljnog pokrova zauzimaju kserofilni oblici vegetacije (Riter-Studnička, 1963).

Ista autorica (1963) je, nakon dugogodišnjih istraživanja, uočila da je bogatstvo vrsta na serpentínima Bosne daleko veće na skeletnom supstratu nego na razvijenom tlu, iako su tu uvjeti za život znatno povoljniji. Njihov odnos iznosi 70:30%. U suštini, približno 10% vrsta uzorka je vezano za serpentín, a oko 60% vrsta su indiferentne. Najveći broj vrsta vezanih za serpentín pripada porodicama Caryophyllaceae i Scrophulariaceae, i to su najčešće kserofilne vrste.

Tokom naše trogodišnje studije, koja se odnosila na veličinu genoma, sakupljeno je 308 vrsta koje obitavaju na serpentinskim supstratima. Najveći broj su indiferentne (171. 55%) vrste i fakultativne vrste koje se mogu naći i na krečnjačkoj podlozi (112. 36%), dok su prisutne samo 24 vrste vezane za serpentin, što čini 8% istraživanog uzorka. Nažalost, nije bilo moguće izvršiti poređenje prisutnosti i zastupljenosti vrsta između naše i studije Riter-Studničke, s obzirom da originalna lista vrsta nije dostupna. Očito, neophodno je proširiti naša istraživanja i kompletirati inventarizaciju serpentinofta, kao vrijednih resursa flore BiH.

Naša studija potvrđuje rezultate Stevanović i suradnika da se najmanji broj endemičnih vrsta nalazi na krajnjem sjeverozapadnom dijelu serpentinske zone Balkanskog poluostrva (Stevanović *et al.*, 2003). Postoje kontradiktorna mišljenja o ulozi strukture habitata i drugih faktora na bogatstvo lokalne i regionalne serpentinske vegetacije (Kazakou *et al.*, 2008 i reference u radu). Prisustvo lokalnih endema je, najvjerojatnije, determinirano veoma varijabilnim okolišnim faktorima (karakteristike tla i vegetacije), ali ne i veličinom serpentinske zone i njene izoliranosti. S druge strane, prema Kazakou i suradnicima postoje suprotna mišljenja o faktorima koji utiču na bogatstvo regionalnih endema Kazakou *et al.* (2008 i reference u radu). Naime, brojnost regionalnih endema raste ili sa povećanjem ukupne veličine serpentinskih habitata ili ovisi od količine padavina. Dodatno, kao i drugdje, geološka starost područja utiče na bogatstvo regionalnih endema.

Najveći broj autora se slaže da je nivo biljnog diverziteta pozitivna funkcija u većim prostornim okvirima, dok su neutralni ili negativni odnosi između produktivnosti i diverziteta često uočeni u manjim prostornim okvirima (Kazakou *et al.*, 2008 i reference u radu). Prema Davis i suradnicima (Davis *et al.*, 2005) zajednice okarakterisane visokim diverzitetom su otpornije na invaziju, što se može dovesti u

vezu sa karakteristikama serpentinskih tala (mala hranjivost, velike koncentracije metala) i uspostavljanja kompeticije nativnih i invazivnih vrsta (Kazakou *et al.*, 2008 i reference u radu).

Međutim, kada se razmatra ukupno bogatstvo vrsta na serpentinskim (ali i na neserpentinskim) tlima može se reći da ono raste sa pojavom požara i ispaše (Kazakou *et al.*, 2008). Naime, usljed požara i ispaše brojnost nativnih vrsta na serpentinama se povećava, ali i uz pojavu povećanja brojnosti invazivnih vrsta, kao rezultata narušavanja habitata.

U uzorku od 583 vrste sa bosansko serpentinskih kompleksa, Riter-Studnička (1963) je uočila da su hemikriptofite najzastupljenije u svim tipovima vegetacije, uz blagi porast prema mezofilnijim uvjetima života. Prisustvo hamefita se smanjuje u mezofilnim uvjetima, dok su geofite podjednako prisutne i na golom supstratu i na mezofilnim staništima. Terofite su nešto zastupljenije u otvorenim sastojinama. Ovom obrascu je veoma slična i zastupljenost životnih formi dobivena tokom ove studije.

Uopćeno, može se reći da su hemikriptofite najzastupljenija životna forma na serpentinama (Chiarucci, 2004; Selvi, 2007; Pavlova, 2010). Neophodno je istaći i to da su jednogodišnje biljke zastupljene u vrlo malom procentu u okviru istraživane flore. Odsustvo i slabu zastupljenost jednogodišnjih biljaka je uočio i Selvi (2007) u Toskanskom serpentinskom regionu, što je objasnio njihovim kratkim životnim ciklusom u odnosu na kserofilnu prirodu serpentinske flore.

Prema Riter-Studnička (1963) serpentinska flora u Bosni predstavlja ostatke jedne stare autohtone flore, ograničene na Balkansko poluostrvo. Ova činjenica je doprinjela tome da je flora Balkana veoma mnogo izučavana, i to na različitim nivoima: morfološkim, fitogeografskim i taksonomskim. Međutim, obimnije citogenetičke studije

sa posebnim osvrtom na veličinu nuklearnog genoma su rijetke (Dimitrova i Greilhuber, 2000; Bogunic *et al.*, 2003; Siljak-Yakovlev *et al.*, 2005; Bancheva i Greilhuber, 2006; Bogunic *et al.*, 2007; Siljak-Yakovlev *et al.*, 2010). Ovo je prva studija koja se odnosi isključivo na istraživanje veličine genoma vrsta sa serpentskih područja.

Općenito, biljke iskazuju izuzetnu varijabilnost veličine genoma (razlika od oko 2000 puta između najmanjeg i najvećeg biljnog genoma; Greilhuber *et al.*, 2006), što omogućava testiranje značajnosti selektivnih razlika u veličini genoma. Tako su prisutna brojna istraživanja značajnosti varijacije veličine genoma u odnosu na životnu historiju, taksonomske i evolutivne veze i geografsku distribuciju.

Neke studije o geografskoj distribuciji biljaka sugeriraju da vrste sa malim genomima preovladavaju u svim okolišima, jer su vrste sa velikim genomima osjetljivije na ekstremnije okolišne uvjete (Bennett *et al.*, 1982; Grime i Mowforth, 1982; Bennett, 1987; Knight i Ackerly, 2002; Knight *et al.*, 2005; Vidic *et al.*, 2009; Temsch *et al.*, 2010; Kubešová *et al.*, 2010). Ovo svojstvo je iskazano hipotezom o ograničenju velikog genoma ("Large Genome Constraint Hypothesis"; Knight *et al.*, 2005), kojom se pretpostavlja da u stresnim okolišima vrste sa prevelikim genomima nestaju.

Zamijećeno je, također, da su veliki genomi naročito prisutni kod mediteranskih geofita i trava, kod kojih je rast ograničen usljed mrazeva tokom zime i ranog proljeća. Postoje pretpostavke da su se veliki genomi razvili pod uvjetima u kojima je rast ograničen s efektima niske temperature u odnosu na stopu ćelijske diobe. Naime, ove biljke ostvaruju rast na niskim temperaturama brzim porastom velikih ćelija obrazovanih tokom prethodne tople suhe sezone. Zapravo, uočeno je da vremenska odvojenost mitoze i ćelijske ekspanzije nije favorizirana kada vlažnost potpomaže rast biljke tokom ljeta. Na taj način duži mitotički ciklus velikih genoma biva najvjerojatnije

ograničen te efekat prirodne selekcije ide u pravcu redukovanja veličine ćelije i genoma (Grime i Mowforth, 1982). Suprotni stavovi su izneseni za nivo vrste, prema kojima individue pod stresom imaju veći genom od individua koje rastu u uobičajenim uvjetima. Razlog tome leži u činjenici da se gen povećava ekspanzijom mobilnih elemenata kao odgovor na stres. Na ovaj način se, povećanjem mase nukleusa (efekat nukleotipa), produžuje ćelijski ciklus, usporavaju ćelijske diobe i biljka usporava rast (prilagodba na vodni stres i stres na niske temperature; Kalendar *et al.*, 2000).

U prilog navedenom idu i dobiveni rezultati analiziranja odnosa veličine genoma i okolišnih uvjeta od strane Knight i Ackerly (2002). Autori navode da npr. i ekstremne temperature i niska precipitacija favoriziraju biljke sa malim genomima. Vinogradov (2003) je zamijetio da vrste sa crvenih lista mnogo češće posjeduju velike genome u odnosu na neugrožene svoje što, također, ukazuje na njihovu veću osjetljivost.

S druge strane, postoje i hipoteze da vrste sa velikim genomima ne mogu obitavati u ekstremnim okolišnim uvjetima usljed polucije sa teškim metalima (Vidic *et al.*, 2009). Naime, autori su prilikom istraživanja biljnih zajednica koje su se razvile na napuštenom rudniku olova dokazali negativnu korelaciju između koncentracije teških metala u tlu i prisustva vrsta sa velikim genomima duž gradijenta polucije. Ovu pojavu objašnjavaju time da korelacija između okolišnih faktora i količine DNK može reflektovati funkcionalne odnose između nukleotipskih efekata DNK mase i zapremine sa fiziološkim procesima na nivou ćelije i organizma. Autori zaključuju da je veličina genoma u vezi sa različitim stepenom preživljavanja vrsta u ovim ekstremnim uvjetima, gdje vrste sa velikim genomima nestaju. Sintezom rezultata istraživanja drugih autora (Druškovič, 1984; Vidic *et al.*, 2001) na istoj oglednoj plohi sa vlastitim rezultatima, Temsch *et al.* (2010) zaključuju da usljed genotoksičnih nekih teških metala efekata dolazi do različitih oštećenja DNK, kako kod vrsta sa malim tako i kod vrsta sa velikim

genomom. Ipak, efekat oštećenja DNK je puno vidljiviji kod vrsta sa velikim genomom, s obzirom da takve individue primaju više “udaraca” zbog veličine genoma (odnosno, veće su “mete”).

Dosadašnje studije se zasnivaju na analizama distribucije veličine genoma ili ograničenih grupa biljaka ili fragmentiranih podataka iz pristupačne literature, osim studija Vidic *et al.* (2009) i Temsch *et al.* (2010). U odnosu na prethodne, u našoj studiji se po prvi put razmatra veličina genoma u prirodnim populacijama na serpentinskim supstratima. Čak više od 2/3 analiziranih biljaka ima vrlo male i male genome ( $1C < 3.5$  pg, Leitch *et al.*, 1998), što je u saglasnosti sa nizom autora (Bennett *et al.*, 1982; Grime i Mowforth, 1982; Bennett, 1987; Knight i Ackerly, 2002; Knight *et al.*, 2005; Vidic *et al.*, 2009; Temsch *et al.*, 2010; Kubešová *et al.*, 2010). Više od 50% vrsta iz ovih kategorija su hemikriptofite te hamefite i fanerofite (sa po ~17%). Važno je napomenuti da oko 90% kratkoživućih vrsta, od ukupnog uzorka, ima male i vrlo male genome, što je u saglasnosti sa mišljenjima da su minimalno generacijsko vrijeme i životni ciklus ilustrativni primjeri biljnih karaktera koje ograničava veličina genoma (Bennett, 1972; Kubešová *et al.*, 2010).

Vrlo interesantna činjenica jeste prisustvo vrsta sa velikim i vrlo velikim genomima ( $1C > 14$  pg; prema Leitch *et al.*, 1998) u analiziranom uzorku sa serpentina. Iako je ova kategorija predstavljena sa samo 11 vrsta (3.44%), nijedna od njih nije vezana za serpentinsku podlogu (6 indiferentnih vrsta i 5 fakultativnih svojiti sa krečnjaka), i sve su višegodišnje. U ovom uzorku pet vrsta su geofite, četiri fanerofite i dvije hemikriptofite, što ne iznenađuje s obzirom da su to uglavnom monokotiledone biljke i četinjače. Ovi rezultati idu u prilog Knightovoj hipotezi (2005), jer je očito da vodni stres, visoke temperature i prisustvo teških metala vrše visok selekциони pritisak i favoriziraju vrste sa malim genomima. Iako Knight i Ackerly (2002) navode da biljke sa

velikim genomima preferiraju umjereno vlažna staništa, u ovoj studiji smo pronašli dvije vrste sa velikim genomima (*Leucanthemum vulgare* i *Narcissus poeticus*) na izraženijim kserofilnim staništima.

#### **4.1.1. Prisutnost različitih nivoa ploidije i B hromosoma kod nekih rodova**

Povećavanje veličine genoma kroz auto- i aloploidiju predstavlja jedan od najvažnijih mehanizama specijacije i evolucije vrsta u biljnom svijetu (Soltis i Soltis, 1999). Aloploidija je primarna snaga hibridizacije koja višestruko utiče na variranje veličine genoma kroz poliploidne serije (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2010 i reference u radu ), što je dokumentirano i kod niza rodova u Balkanskoj flori. U ovom radu je uočeno prisustvo različitih nivoa ploidije kod 10 vrsta, gdje najinteresantnije slučajeve predstavljaju *Leucanthemum vulgare* i *Narcissus poeticus*. Naime, *L. vulgare* je na serpentinskim podlogama u Bosni prisutan sa tri nivoa ploidije (2x, 4x i 6x), gdje se diploidi i tetraploidi mogu naći u simpatriji. Bila bi interesantna detaljnija studija ovog poliploidnog kompleksa, naročito na području Istočne Bosne, gdje su zabilježene simpatrijske populacije.

Otkrivanje individua sa različitim nivoom ploidije u istoj populaciji potvrdilo je dobru praksu mjerenja veličine genoma za tri i više individue s istog lokaliteta. U suštini, citometrija olakšava brzi pregled veličine genoma kako na nivou jedinki tako i na populacionom nivou, čime je moguće relativno lako i brzo otkriti prisustvo poliploidije.



Pomoću protočne citometrije moguće je lako detektirati i individue koje imaju jedan ili više B hromosoma, naročito kod vrsta sa srednjim i velikim genomima. Na ovaj način se može značajno ubrzati i olakšati izvođenje, kao i smanjenje troškova, različitih eksperimenata. Identifikacija broja B hromosoma kod vrsta koje imaju vrlo male ili male genome pomoću protočne citometrije ipak nije najsigurniji, pa time i uobičajen, metod kao što je prethodno spomenuto za takson *Stachys recta* var. *chrysophea*.

## **4.2. Interakcija bijelog narcisa sa pH pripadajuće rizosfere i nekim biogenim elementima**

Ovo je prva, i vjerovatno jedinstvena studija o odnosu bijelog narcisa prema tlu u prirodnim populacijama, sa posebnim osvrtom na neke teške metale.

Količina mineralnih hranjiva u biljkama varira kod različitih vrsta ovisno o genotipu, starosti individue, lokalitetu i sezoni, kao i o tipu tkiva i organa iste jedinke (Marschner, 2002). Adekvatne intercelularne koncentracije esencijalnih metalnih iona su neophodne za optimalni rast i razvoj biljaka. Međutim, veoma izražen disbalans u ishrani ispoljavaju biljke koje obitavaju na serpentinskim tlima (Proctor, 1999).

S obzirom da ultramafitna tla obično sadrže visoke koncentracije teških metala, biljna otpornost na toksičnost metala je posljedica strategije „izbjegavanja”, koja je bazirana na smanjenju unosa metala u korjenov sistem, pohranjivanju metala u vakuole ćelija korjena i ograničenju translokacije metala u izdanke (Kruckerberg, 1984; Brooks, 1987; Lasat i Kochian, 2000; Kazakou *et al.*, 2008). S druge strane, neke biljke aktivno usvajaju metale što vodi njihovoj akumulaciji u visokim koncentracijama, ponekad

daleko većim nego u tlu (Baker, 1981; Brooks, 1998; Asemaneh *et al.*, 2006; Kazakou *et al.*, 2008).

#### **4.2.1. pH tala istraživanih populacija**

Kiselost, odnosno bazičnost tla je glavni faktor u determiniranju pristupačnosti nutrijenata u tlu, jer utiče na oksidaciono stanje i rastvorljivost elementa ili biološke procese, a time i na koncentraciju nutrijenata u biljkama (Marschner, 2002). Na veoma izraženo variranje pH tla (kako unutar male površine, tako i u zavisnosti od dubine soluma) utiče niz faktora: geološka podloga, klima, živi organizmi, topografija i geološko vrijeme (Brooks, 1987; Marschner, 2002).

U ovoj studiji je uočeno da bijeli narcis ima relativno široki raspon vrijednosti pH rizosfere (pH 4.64-7.85), što je vjerovatno jedan od razloga njegovog viševjekovnog uspješnog kultiviranja. Rizosfere serpentinskih individua imaju blago kiselu do neutralnu pH reakciju (5.39-6.95), najvjerovatnije uzrokovanu specifičnim kemijskim sastavom, prvenstveno suficitom magnezija. Prema Ćirić (1984) i Resulović i Čustović (2002), značajan suvišak iona magnezija uvjetuje visok stepen zasićenosti bazama i blago kiselu do neutralnu reakciju, osim u A horizontu koji može biti nešto kiseliji (pH 5.5). S druge strane Brooks (1987) serpentinska tla generalno karakterizira sa pH 6.5-8. Međutim, različiti fizički faktori (nagib, taloženje supstrata, plitkoća tla, relativna blizina matične podloge) značajno utiču na njihovo zakišeljavanje (Robinson *et al.*, 1996; Chiarucci *et al.*, 2001, 2004). S druge strane, kod krečnjačkih populacija je pH rizosfere dosta većeg raspona (ujedno i za analizirani uzorak): od 4.64 do 7.85, bez iskazane pravilnosti u distribuciji, kako unutar tako i među populacijama.

Na osnovu rezultata dobivenih analiziranjem prirodnih populacija bijelog narcisa moguće je reći da ta vrsta podnosi relativno velike promjene pH tla, ali i to da izbjegava bazičnija tla.

#### **4.2.2. Mangan, nikl, kobalt i željezo**

*Mangan* je važan biljni mikronutrijent neophodan za niz metaboličkih procesa: od različitih uloga u procesu fotosinteze, preko kofaktora za čitav niz enzima do neophodnog prisustva za obrazovanje nekih lipida i vitamina (Buchanan *et al.*, 2000; Marschner, 2002; Millaleo *et al.*, 2010).

U tlima se koncentracija Mg, najčešće, kreće u vrijednostima od 0.02 do 1% (Buchanan *et al.*, 2000; Marschner, 2002; Millaleo *et al.*, 2010). Međutim, velika količina mangana u tlu je nepristupačna za biljke, što uglavnom ovisi o pH tla i koncentracije organskih materija u tlu.

Općenito, mangan se predominantno akumulira u izdancima, a ne u korjenovom sistemu. Stepentranslokacije Mn od korjenova do izdanka varira znatno među vrstama i čak može značajno varirati i između ekotipova iste vrste (El-Jaoual i Cox, 1998; Marschner, 2002). Prema Vitosh *et al.* (1994), biljke su izložene deficijenciji Mn kada ga ima manje od 20 ppm u tkivima i suficijenciji pri vrijednostima iznad 300 ppm, dok Marschner (2002) navodi da je većini biljnih vrsta kritična granica za Mn između 200 i 5300 ppm u izdancima. Međutim, divljerastuće vrste imaju tendenciju da budu tolerantnije na toksične stresove i veće koncentracije Mn od kultiviranih svojti (El-Jaoual i Cox, 1998; Marschner, 2002).

Minimalne i maksimalne koncentracije Mn zabilježene u uzorcima tla tokom ove studije su bile u očekivanim vrijednostima, a u odnosu na geokemizam uzorkovanih tala. Može se reći da bijeli narcis ima relativno zadovoljavajuću ishranu sa Mn na

analiziranim lokalitetima (Tabela 3). Koncentracije Mn u nadzemnim izdancima su najčešće bile veće u odnosu na podzemne izdanke, što Marschner (2002) smatra očekivanim rezultatom. Izuzetak su bile individue u populaciji 13, kod kojih je količina Mn bila veća u lukovicama i korjenčićima nego u nadzemnim izdancima, što je vjerovatno posljedica specifičnih odnosa iona u nešto dubljim i vlažnijim serpentinskim tlima na ovom lokalitetu.

*Nikl* je neophodni mikronutrijent za biljne organizme, koji utiče na rast biljaka, njihov metabolizam i starenje, vijabilnost sjemenki, ali i povećava otpornost biljaka na neke bolesti (Brown *et al.*, 1987; Marschner, 2002).

Srednje vrijednosti Ni u tlu iznose  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , ali uopćeno variraju od 5 do  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  (Barceloux, 1999). Međutim, ukupni sadržaj nikla nije dobar pokazatelj njegove pristupačnosti, pošto mu se mobilnost povećava u kiselijim tlima (Brown *et al.*, 1989).

Sadržaj nikla u biljkama ovisi od njegove pristupačnosti u tlu, biljne vrste, dijela biljke i sezone. Biljke koje rastu na serpentinitima ili kontaminiranim tlima sa niklom, mogu da ga akumuliraju u značajnijim dozama. Poznato je da se biljke koje rastu na istom lokalitetu, ali i njihovi organi, mogu međusobno značajno razlikovati u sadržaju nikla (Guha i Mitchell, 1966; Baker, 1981, 1987; Reeves, 1992). U suštini, povećanjem pH vrijednosti tla opada količina izmjenljivog nikla, koji se tada taloži (ukupna količina nikla raste) i postaje nepristupačan za biljke (Chiarucci *et al.*, 2001, 2004).

Prosječne potrebe biljaka za niklom su manje od  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe mase, što je inače najmanja vrijednost za neki od esencijalnih elemenata. Međutim, kod biljaka sa prirodnih staništa nije zabilježena niža vrijednost Ni od  $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe mase (Hovmand, 1984). Uobičajeno, biljke sadrže  $1\text{--}5 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  (Brooks, 1987; Reeves, 1992; Uren, 1992) i trpe značajnu fitotoksičnost pri vrijednostima ispod  $100 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  (Kukier i Chaney, 2004). Nešto drugačiju skalu koncentracije Ni u biljkama su dali

Freitas *et al.* (2004), gdje navode da nesperpentinske biljke sadrže Ni u listu oko 0.1-5 mg kg<sup>-1</sup> suhe materije, a serpentinske 20-100 mg kg<sup>-1</sup> suhe materije.

Koncentracije Ni kod individua bijelog narcisa iz krečnjačkih populacija u ovoj studiji su bile u okviru raspona vrijednosti predloženih za nesperpentinska i nekontaminirana tla. S obzirom da se nikl prvenstveno akumulira u epidermalnim ćelijama, dobiveni rezultati o većim koncentracijama u nadzemnim dijelovima biljaka nisu iznenađujući. Međutim, kod određenog broja analiziranih individua iz serpentinskih populacija (12 i 13), u podzemnim izdancima su zabilježene veće koncentracije nikla. Ova pojava se nije mogla dovesti u korelaciju niti s ijednim ispitivanim faktorom tokom ove studije.

U suštini, može se reći da je ukupna količina nikla u tkivima individua istraživanih serpentinskih populacija bila ekstremno visoka (10-40 mg kg<sup>-1</sup> suhe materije) u odnosu na koncentraciju Ni uopćeno iskazanu kod nesperpentinskih populacija (0.1-5 mg kg<sup>-1</sup> suhe materije). Ipak, vrijednosti karakteristične za serpentinske Ni-hiperakumulatore (Reeves *et al.*, 1999; Wenzel *et al.*, 2003) nisu nađene kod analiziranih individua.

*Kobalt* je za neke biljne vrste beneficijalan, a za neke esencijalan mikroelement. Učestvuje u nizu fizioloških procesa u biljkama: inhibicijom sinteze etilena potpomaže razvoj nadzemnog izdanka; sprječava senescenciju; povećava toleranciju na vodni stres; pokazuje biocidalnu i antifungalnu aktivnost; regulira akumulaciju nekih alkaloida i neophodan je za fiksaciju azota (Buchanan *et al.*, 2000; Taiz i Zeiger, 1998).

U nesperpentinskim tlima koncentracija Co se kreće od 1 do 40 ppm, i jedino u vrlo visokim koncentracijama može uzrokovati anomalije kod biljaka (Palit *et al.*, 1994). Međutim, distribucija Co u biljkama zavisi prvenstveno od same biljne vrste. Unos Co u

biljku je kontroliran različitim mehanizmima, gdje fizikalni uvjeti (npr. salinitet, temperatura, pH tla i prisustvo drugih metala) veoma utiču na procese unosa i akumulaciju (Marschner, 2002).

Iako su Palit *et al.* (1994) prezentirali da različite biljke sa serpentina pokazuju povećan sadržaj Co od korijena preko stabljike do listova, u ovoj studiji su neke individue imale veće koncentracije Co u podzemnim izdancima. Prema Freitas *et al.* (2004), listovi serpentinskih biljaka sadrže 10 puta veće koncentracije Co u odnosu na neserpentinske biljke. Međutim, rezultati dobiveni ovom studijom nisu potvrdili njihove nalaze jer su koncentracije Co u skoro svim analiziranim individuama bile međusobno veoma bliske i relativno malih vrijednosti (Tabela 3). Slični rezultati su dobiveni i pri poređenju vrijednosti Co između populacija, s izuzetkom nekih individua iz populacije 13. Najvjerojatnije, različiti organi bijelog narcisa imaju slične zahtjeve za Co, tako da njegova koncentracija u tlima značajnije ne utiče na njegov unos, translokaciju i akumulaciju.

Željezo je mikroelement neophodan za sintezu hlorofila, fiksaciju azota i aktivaciju nekih respiratornih enzima (Vitosh *et al.*, 1994; Kozłowski i Pallardy, 1997; Marschner, 2002). Deficijencija željeza je rijetka pojava kod biljaka koje rastu na tlima čiji je pH manji od 7.0 (Kozłowski i Pallardy, 1997; Marschner, 2002). Međutim, željezo postaje toksično za biljke koje rastu na kiselim tlima (pH<5.0). Važno je istaknuti da visoka koncentracija mangana može dovesti do deficijencije željeza, i obratno (Vitosh *et al.*, 1994).

Općenito, količina željeza je najveća u fotosintetički aktivnim organima (Marschner, 2002), dok je kod nekih serpentinofita dominantna u korijenu (Dudić *et al.*, 2007). Ovaj neophodni biljni mikronutrijent ima tendenciju da bude manje pristupačan u serpentinskim tlima sa visokim pH, tako da njegova apsorpcija zavisi od acidifikacije

rizosfere s organskim kiselinama koje su izlučene iz korijena (Vert *et al.*, 2002; Dudić *et al.*, 2007). Prema Epstein (1972) i Larcher (1995), količina željeza u biljnim tkivima serpentinita je znatno veća u odnosu na normalne vrijednosti za biljke 100 – 700 mg kg<sup>-1</sup> suhe materije.

Iako biljke većinom akumuliraju željezo u listovima, bijeli narcis ga je uglavnom deponovao u podzemnim organima (osim u dvije populacije, Tabela 3). Drugi interesantan rezultat jeste relativno visoka koncentracija Fe u kompletnoj biljci, kako u populacijama na krečnjaku tako i u serpentinskim. Ovi rezultati upućuju na to da se pristupačno željezo nalazi u relativno velikim količinama u rizosferi bijelog narcisa. Međutim, zahvaljujući specifičnostima mikrostaništa, ove veće vrijednosti Fe nisu dovele do deficijencije Mn u biljkama, iako su relativno niske vrijednosti Mn izmjerene u lukovicama individua u populacijama 5, 10 i 12. Rizosfere ovih individua su imale pH vrijednosti ~7.00 ili veće, što je dodatno otežavalo unos mangana u biljku i protok željeza kroz organizam.

#### **4.2.3. Magnezij, kalcij i njihov molarni odnos**

*Magnezij* je esencijalan makronutrijent koji nije pronađen u elementarnom obliku u prirodi. Sastavni je dio klorofila, aktivator mnogih enzima i učestvuje u očuvanju integriteta ribosoma. Relativno je mobilan element i lako se translocira u biljkama (Vitosh *et al.*, 1994; Kozłowski i Pallardy, 1997; Marschner, 2002).

Koncentracija Mg varira u različitim biljnim dijelovima te zavisi od starosti individue i od pristupačnih nutrijenata u tlu. Prosječne vrijednosti magnezija u biljkama su ~80 μmol g<sup>-1</sup> suhe mase (Marschner, 2002).

Značajan efekat na unos iona magnezija ima njegova interakcija sa drugim kationima u rizosferi (Kozłowski i Pallardy, 1997; Marschner, 2002). Tako deficit Mg najčešće nije uzrokovan njegovim nedostatkom u tlu, već inhibicijom unosa u biljku (Marschner, 2002). S druge strane, veoma rijetko se uočava suficit Mg, jer većina biljaka višak magnezija deponuje u vakuole (Stelzer *et al.*, 1990). Ali, ako je ova pojava praćena sa vodnim deficitom, tad se koncentracija Mg u biljkama drastično povećava. U suštini, bilo koja vrsta poremećaja u ishrani sa Mg (bilo deficit ili suficit) dovodi do smanjenja stope fotosinteze (Marschner, 2002).

Prisustvo skoro identičnih raspona koncentracija Mg u listovima istraživanih individua, bez obzira na geološki supstrat, u ovoj studiji ukazuje na ujednačeno odvijanje fotosintetskih procesa.

Najvjerovatnije je stopa fotosinteze kod analiziranih individua bijelog narcisa u krečnjačkim populacijama zadovoljavajuća. Na to ukazuje prisustvo skoro dvostruko veće koncentracije Mg u nadzemnim nego u podzemnim izdancima, uzevši u obzir vrijeme prikupljanja materijala (faza punog cvjetanja). S druge strane, povećane koncentracije Mg kod serpentinskih individua (naročito u podzemnim izdancima) ukazuju na njihovu sposobnost prilagođavanja i opstanka u stresnijim uvjetima. Upravo ta sposobnost bijelog narcisa da reagira na sušne uvjete povećanim unosom Mg i njegovom akumulacijom u podzemnim dijelovima, a u cilju zaštite fotosintetičkog aparata, mu najvjerovatnije omogućava opstanak u specifičnim serpentinskim habitatima.

*Kalcij*, esencijalni makroelement, je neophodan za izgradnju ćelijskog zida, obezbjeđuje normalan transport i održavanje drugih elemenata u biljci, kofaktor je mnogih enzima i djeluje kao sekundarni nosač (Vitosh *et al.*, 1994; Taiz i Zeiger, 1998; Marschner, 2002).



Adekvatna koncentracija Ca u biljnim listovima je  $5 \text{ g kg}^{-1}$  (Epstein 1972; Tisdale *et al.*, 1993; Taiz i Zeiger, 1998). Kalcij je uvijek prisutan u većim koncentracijama u stabljici i listovima biljaka, u odnosu na substrat (serpentin ili krečnjak), iako su serpentinske endemične vrste bolje adaptirane na niske koncentracije Ca (Marschner, 2002; Chaney *et al.*, 2008).

Izmjerene koncentracije Ca u podzemnim izdancima krečnjačkih individua su bile zadovoljavajuće i u adekvatnim granicama (Tabela 3). Međutim, primjećena je blaga deficijencija Ca u listovima krečnjačkih individua, osim u populacijama 5 i 10. Za utvrđivanje razloga koji su doveli do ovakve raspodjele usvojenog kalcija neophodno je izvršiti dodatna istraživanja, s obzirom da ovo svojstvo može biti karakteristika bijelog narcisa ili posljedica specifičnih antagonističkih odnosa kalcija sa nekim drugim kationima i njegove slabe pokretljivosti. Kao što se i očekivalo, serpentinske individue su imale znatno manje akumuliranog kalcija u odnosu na krečnjačke. Uz to, koncentracije Ca u listovima su skoro uvijek bile manje u odnosu na podzemne izdanke, što je vjerovatno posljedica prisustva magnezija u vrlo visokim koncentracijama, kako u tlu tako i u tkivima. Zapravo, jednosmjernan transport Ca iz zone elongacije korijena do izdanaka, te slaba pokretljivost i translokacija Ca iz izdanaka u korijen dovodi do toga da meristemska zona korijena koristi sav raspoloživi Ca (Kazakou *et al.*, 2008). Sve ovo govori o prisustvu specijaliziranih fizioloških mehanizama za zaštitu vrhova korjenova i sprječavanje pojava nekroza na njima kod biljaka koje rastu na serpentinskim podlogama.

*Molarni odnos Ca/Mg* u listu se smatra najvećom specifičnošću serpentinskih kongeneričkih parova u odnosu na neserpentinske (Kazakou *et al.*, 2008). Serpentinske vrste, uglavnom, imaju lisni molarni odnos Ca/Mg manji od njihovih neserpentinskih kongeneričkih parova, što je primarna posljedica regulacije translokacije od korijena do

izdanka (Asemaneh *et al.*, 2007). Izgleda da su selektivni unos Ca i eliminiranje Mg u korjenovom sistemu važniji od različitih načina translokacije Ca i Mg iz korjenova u izdanke (Asemaneh *et al.*, 2007; Kazakou *et al.*, 2008).

Nije neuobičajeno da serpentinske vrste imaju molarne odnose Ca/Mg u listovima veće i do nekoliko puta u odnosu na tlo gdje rastu. Na osnovu nekoliko studija, čak 79% istraživanih serpentinskih vrsta su općenito imale veći lisni molarni odnos Ca/Mg nego njihovo odgovarajuće tlo (Kruckeberg, 1950; Lyon *et al.*, 1971; Proctor i Woodell, 1975; Koenigs *et al.*, 1982; Angelone *et al.*, 1993; Nagy i Proctor, 1997; Lombini *et al.*, 1998). Široko rasprostranjena pojava povećanih lisnih molarnih odnosa Ca/Mg kod serpentinskih vrsta i ekotipova u odnosu na niske molarne odnose Ca/Mg u tlima podržavaju mišljenja da su selektivna translokacija Ca do listova i inhibicija translokacije Mg i sekvestracije putem korjenova važne evolutivne adaptacije kod serpentinskih vrsta (Asemaneh *et al.*, 2007; Kazakou *et al.*, 2008).

Smatra se da je za normalan rast biljaka neophodan odnos  $Ca/Mg > 1$ . Međutim, serpentinske biljke su prilagođene na niske nivoe Ca (Main, 1981) ili niske odnose Ca/Mg (0.04-0.2) u njihovim supstratima (Brooks, 1987).

Dobiveni rezultati o molarnim odnosima Ca/Mg u ovoj studiji, kako u biljkama tako i u tlima, potvrđuju gore navedeno. Osobenost bijelog narcisa se ogleda u tome da je njegov molarni odnos Ca/Mg podzemnog dijela bio veći nego kod nadzemnog dijela. Ovo se može dovesti u vezu sa životnom formom vrste (geofita) i njene potrebe da se tkivo lukovice dodatno zaštiti sa rigidnim i debljim ćelijskim zidovima. Naime, vrsta ima karakterističnu ljetnu dormanciju tokom koje se odvija mejoza, i to neposredno nakon izloženosti lukovice veoma visokim temperaturama i suši tokom ljeta.

Na osnovu dobivenih rezultata, može se konstatirati da vrsta *Narcissus poeticus*, iako općenito akumulira veće količine analiziranih metala (Mn, Ni, Co, Fe), nije hiperakumulator istih. Također, ova vrsta posjeduje fiziološke mehanizme koji joj omogućavaju da se prilagodi i preživi u različitim stresnim uslovima, naročito izloženosti vodnom deficitu i visokim temperaturama.

### **4.3. Citogenetika vrste *Narcissus poeticus***

#### **4.3.1. Karakteristike kariotipa i organizacija heterohromatina**

Prethodne studije su pokazale da *N. poeticus* i *N. radiiflorus* predstavljaju jednu vrstu s izvjesnim morfološkim razlikama (Webb, 1980; D'Amato, 2004; Tucci *et al.*, 2004). Naši rezultati također potvrđuju identičnost kariotipa bez obzira na varijabilnost u morfologiji. Citogenetički rezultati dobiveni u ovoj studiji jedino ukazuju na varijabilnost u prisustvu, broju i strukturi B hromosoma u različitim populacijama.

Standardni kariotip *Narcissus poeticus* opisan u ovoj studiji odgovara onim već opisanim od strane Wylie (1952), Maugini (1962), Brandham i Kirton (1987), De Dominicis *et al.* (2002), D'Amato (2004) i Tucci *et al.* (2004).

Prisustvo tri regiona konstitutivnog heterohromatina je dokazano Giemsa bojenjem od strane De Dominicis *et al.* (2002) i D'Amato (2004). Naši rezultati potvrđuju da interkalarni band na hromosomskom paru 2 odgovara kolokalizaciji GC i AT bogatih DNK regiona i konstitutivnog heterohromatina (DAPI poslije FISH). Isti autori su također prezentirali da interkalarni C-band na hromosomskom paru 4 nije prisutan u svim metafaznim figurama te nije bio vidljiv ni pri fluorohrom bojenju. Ipak, dvostruki FISH eksperiment, u našoj studiji, je pokazao kolokalizaciju nespecifičnog

heterohromatina (DAPI bandovi) i 5S rDNK lokusa u istom regionu. Satelitni par, karakteriziran prisustvom trećeg C-banda na nivou SC, odgovara CMA bandu i 18S rDNK lokusu u našoj studiji. Prema prethodnim izvještajima (De Dominicis *et al.*, 2002; D'Amato, 2004; Tucci *et al.*, 2004), bojenje srebro-nitratom je potvrdilo prisustvo NOR-a u nivou SC na ovom hromosomskom paru.

Svi ovi rezultati upućuju na konstantnost karakteristika osnovnog kariotipa vrste i organizacije heterohromatina na specijskom nivou, neovisno od geografske udaljenosti među populacijama te različitih tipova habitata u kojima obitavaju.

#### **4.3.2. Organizacija rDNK i heterohromatina na B hromosomima**

Iako nisu neophodni za preživljavanje, B hromosomi su prisutni kod 10-15% angiospermi (Jones, 1995). B hromosom je dinamičan sistem i njegova frekvencija ovisi od dvije suprotne sile: akumulacije i njegovog efekta na fitness individua (Camacho *et al.*, 2000). Individue u prirodnim populacijama ne posjeduju više od tri do četiri B hromosoma, s izuzetkom *Allium schoenoprasum* kod koga je zabilježeno čak 20 B hromosoma (Camacho *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2011). U rodu *Narcissus*, uglavnom kod hortikulturnih varijeteta, broj B hromosoma obično varira od jednog do maksimalnih pet (Wylie, 1952; Brandham i Kirton, 1987). Prisustvo 1-4 B hromosoma je uočeno kod vrste *N. angustifolius* (sin. *N. poeticus*; Takhtajan, 1990). U istraživanim populacijama najčešće je zabilježen jedan, rijetko dva, a kod triploida maksimalno tri B hromosoma.

Uočena je razlika u prisustvu B hromosoma u populacijama na kontinentalnim Dinaridima i litoralnim Dinaridima na višim nadmorskim visinama. Naime, za razliku od četiri populacije na kontinentalnim Dinaridima bez B hromosoma, u populacijama na litoralnim Dinaridima zabilježeno je prisustvo B hromosoma. Ova činjenica ukazuje

na moguću korelaciju između prisustva B hromosoma i specifičnih vodnih i temperaturnih režima.

B hromosomi kod vrsta roda *Narcissus* su uglavnom euhromatični, jednoliko se boje kao i A hromosomi, sa nekoliko izuzetaka (Wylie, 1952; Brandham i Kirton, 1987). U ovoj studiji svi posmatrani tipovi B hromosoma su imali sličnu veličinu ( $2/3$  veličine najmanjeg hromosomskog para), što je u saglasnosti sa publikovanim podacima za druge vrste roda *Narcissus* koje posjeduju B hromosome (Wylie, 1952). Uočeno je, također, i prisustvo strukturalnog polimorfizma B hromosoma (tri tipa) kod bijelog narcisa. Više od 65 biljnih vrsta posjeduju dva ili više tipova B hromosoma, i njihovo porijeklo se može objasniti nepravilnom diobom tokom mejoze (Jones, 1995). Tako, B hromosomi tipa II i III kod bijelog narcisa mogu biti efemeralni proizvodi različitih hromosomskih mutacija na B hromosomu tipa I, za koji smatramo da je standardan kod narcisa zbog široke rasprostranjenosti (prisutan u skoro svim istraživanim populacijama). Kod vrste *Allium schoenoprasum* (Bougourd i Parker, 1979; Holmes i Bougourd, 1991), polimorfizam B hromosoma je također otkriven u populaciji sa najvećom frekvencijom istih. Ovi autori izvještavaju da nivo vlažnosti ima signifikantan uticaj na povećanje proporcije nestandardnih tipova B hromosoma.

Ponekad vrste sa B hromosomima imaju veću sposobnost preživljavanja od onih bez B hromosoma (Jones, 1995), vjerovatno zahvaljujući genima koje ovi hromosomi ponekad posjeduju. Kod mnogih vrsta utvrđeno je prisustvo aktivnih ribosomalnih gena na B hromosomima (Jones, 1995; Camacho *et al.*, 2000; Muratović, 2007). S obzirom da je ova studija uključivala 13 populacija koje obitavaju u različitim ekološkim uvjetima, bilo je moguće analizirati prisustvo, karakterizaciju i potencijalne efekte B hromosoma kod *N. poeticus*. Najveći polimorfizam B hromosoma je uočen u četiri populacije na kraškim poljima, naročito u dvije populacije koje su potopljene većim

dijelom godine, a preživljavaju veoma suha ljeta. Prisustvo nukleolusa je citogenetička manifestacija transkripcijske aktivnosti rRNA gena čiji produkti su rRNA molekule, osnovni gradivni konstituenti ribosoma. Povećanje broja nukleolusa u ovim populacijama dokazuje aktivnost ribosomalnih gena na B hromosomima. Prema Teruel *et al.* (2007) broj nukleolusa vjerovatno igra važnu ulogu u odgovoru individue na stres.

Broj i efekti B hromosoma kod *N. poeticus* najvjerovatnije zavise od okolišnih uvjeta u istraživanim populacijama. Preživljavanje individua *Allium schoenoprasum* sa različitim tipovima i brojem B hromosoma je bilo pod uticajem uvjeta vlažnosti, naročito suše (Holmes i Bougourd, 1991). Naši rezultati mogu implicirati moguću vezu između prisustva različitih tipova B hromosoma kod individua *N. poeticus* sa njihovom izloženošću vodnom stresu u istraživanim populacijama. Naime, populacija sa tri tipa B hromosoma se karakterizirala sa vrlo stresnim okolišnim uvjetima: ekstremne kombinacije vodnih i temperaturnih režima tokom zime i ljeta.

### **4.3.3. Prirodni triploidi vrste *Narcissus poeticus***

Poliploidija, kao glavni mehanizam adaptacije i specijacije kod biljaka, je prisutna kod 47-70% angiospermi (Ramsey i Schemske, 1989). Potomstvo triploida često preživljava i može participirati kao "most" u uspostavljanju većih nivoa ploidije (Soltis *et al.*, 2003; Leitch i Leitch, 2008). Novonastali autopoliploidi često posjeduju nove fiziološke, ekološke ili fenološke karakteristike, i mogu predstavljati brze vidove adaptacije i specijacije (Ramsey i Schemske, 1998).

Genus *Narcissus* se karakterizirao sporadičnim primjerima poliploidizacije, sa najvećom frekvencijom tetraploida (Wylie, 1952; Fernandes, 1975; Brandham i Kirton, 1987; Van Tuyl, 1997; Zonneveld, 2008). Poliploidi mogu biti glavni faktor u kreiranju

hortikulturnih varijeteta, gdje se prvo formiraju triploidi, pa tek onda tetraploidi (Wylie, 1952). Prisustvo triploida sa nepoznatim porijeklom je primjećeno kod nekih vrsta roda *Narcissus*, uključujući *N. poeticus* cv. "Hellenicus" i cv. "Pheasant eye" (Wylie, 1952; Fernandes, 1975; Brandham i Kirton, 1987). Do danas nije poznato postojanje prirodnih populacija triploida *N. poeticus* "Hellenicus" i *N. poeticus* "Recurvus", iako je opisano da postoje u Grčkoj i Švicarskoj. Wylie (1952) pretpostavlja da su ovi triploidi ili mogući "bjegunci" kultivara ili su odabrani iz prirode zbog njihove triploidne bodrosti.

Postojanje prirodnih triploida kod vrste *N. poeticus* u nekim Balkanskim populacijama je po prvi put dokumentirano tokom ove studije. Morfološki je bilo nemoguće razdvojiti ove individue od diploida. One posjeduju tri identične kopije osnovnog hromosomskog seta, što podržava njihovo autotriploidno porijeklo. Interesantno je napomenuti da se ovi triploidi: *a*) nalaze u dva skoro potpuno kontrastna habitata (populacije 8 i 12), i *b*) posjeduju dodatna maksimalno 3 B hromosoma, sa različitim tipovima u kraškoj populaciji (populacija 8).

Nepogodni okolišni uvjeti utiču kako na prisustvo tako i na evolutivnu dinamiku poliploida. Veoma je teško determinirati koji od okolišnih faktora ima stresno djelovanje na biljke, iako su brojne i brze temperaturne promjene u vlažnom okolišu najčešće predlagane (Hadač, 1989; Ramsey i Schemske, 1998). Pošto je prisustvo najvećeg broja triploida uočeno u populaciji 8, može se pretpostaviti da u ovoj populaciji proizvodnja diplopolena (često uočena, podaci nisu prikazani) predstavlja jednu od posljedica specifičnih i teških ekoloških uvjeta. Dodatna istraživanja su neophodna u ovim populacijama u cilju procjene frekvencije spontanih triploidnih individua u odnosu na različite okolišne uvjete.

#### **4.3.4. Devijantni oblici kariotipa**

Spontane hromosomske translokacije su već uočene kod nekih vrsta roda *Narcissus* (Fernandes, 1952; Karihaloo, 1987). U ovoj studiji prisustvo rijetkih individua sa translokacijama ili inverzijama je primjećeno u populacijama na subalpinskim livadama i na serpentinskoj podlozi. Individua iz serpentinske populacije je posjedovala dodatni subterminalni 18S rDNK lokus na samo jednom homologu para 3. Porijeklo ovog prekobrojnog rDNK lokusa se može objasniti spontanom A-B translokacijom, već primjećenom kod nekih vrsta (Jones, 1995; Camacho *et al.*, 2000; Jones i Houben, 2003; Ribeiro *et al.*, 2004). Taj tip translokacije je vrlo rijedak, s obzirom da vrlo mali dio B specifičnog hromatina može probiti jaku barijeru između A i B hromosoma (Ribeiro *et al.*, 2004). Ovaj specifični slučaj je najvjerojatnije prisutan kod individue sa serpentinskog supstrata, naročito zbog dva uočena fenomena u ovoj populaciji: B hromosomi su se karakterizirali prisustvom aktivnih rRNA gena, i ova individua je posjedovala veću količinu DNK od individua bez B hromosoma. U stvari, primjećeno povećanje količine DNK može reflektirati prisustvo B hromosoma u kariotipu.

Posmatrani mutacioni događaj na ovim specifičnim habitatima može biti frekventniji, ali teško ustanovljiv ako invertirani regioni ne posjeduju bilo koji od vidljivih markera.

#### **4.3.5. Količina DNK se povećava usljed prisustva triploidije i**

##### **B hromosoma**

Količina nuklearne DNK je kod vrsta općenito konstantna, mada su uočene i intraspecijske varijacije. Veličina genoma se uvijek povećava usljed ploidije i prisustva B hromosoma (Jones, 1995; Leitch i Bennett, 2004; Jones *et al.*, 2008).



U ovoj studiji, intraspecijska varijacija u količini DNK je uočena između individua sa i bez B hromosoma. Dobiveni rezultat je u saglasnosti sa zaključcima Jones *et al.* (2008) da su B hromosomi glavni izvor intraspecijske varijacije količine nuklearne DNK. Srednja vrijednost za diploidne individue bez B hromosoma (25.81 pg) je vrlo slična srednjoj vrijednosti (26.0 pg; Zonneveld, 2008). Ove vrijednosti su signifikantno manje od vrijednosti (27.5 pg) date od strane Olszewska i Osiecka (1982). U poređenju naših podataka sa Zonneveldovim (2008), može se pretpostaviti da njegova četiri diploidna uzorka, sa veličinom genoma većom od 26.0 pg, najvjerovatnije posjeduju najmanje jedan B hromosom. Zonneveld (2008) je, uostalom, primjetio da B hromosomi vjerovatno učestvuju u određenom procentu u ukupnoj veličini genoma kod nekih vrsta u okviru sekcija *Narcissus* i *Pseudonarcissus*.

Srednja vrijednost veličine genoma prirodnih Balkanskih triploidnih individua je iznosila 34.55 pg, što je za otprilike 4 pg manje u odnosu na kultivirane triploide (Zonneveld, 2008). Ipak, veličina genoma triploidne individue sa 3 B hromosoma, u ovoj studiji, je vrlo bliska vrijednostima Zonneveldovih (2008) uzoraka. Bilo bi vrlo interesantno uporediti kariotipove i banding obrasce Zonneveldovih uzoraka sa kariotipovima i bandingom triploida istraživanim u ovoj studiji u cilju otkrivanja uzroka ove razlike u veličini genoma.

Također bi bilo korisno istražiti odnose između ukupne veličine nuklearne DNK i broja B hromosoma i/ili količine heterohromatina, što je jedan od ciljeva u tekućoj citogenetičkoj studiji roda *Narcissus*.

## Synthèse de la thèse :

### *Réponse du génome aux stress abiotiques: le cas des plantes serpentinoxytes en Bosnie centrale*

Les habitats sur le substrat de serpentine présentent un environnement hostile pour le développement de plantes. Il s'agit des roches à lente érosion dont les sols sont principalement caractérisés par un faible rapport Ca/Mg, de faibles concentrations de macronutriments, de haute teneur en métaux lourds (Ni, Cr, Co, Fe, Al), et par des valeurs de pH allant de basique jusqu'à ultrabasique. La spécialisation édaphique des plantes subissant ces conditions résulte dans leur adaptation spécifique qui a été décrite comme le «syndrome de la serpentine». Les végétaux adaptés aux conditions des sols sur serpentine sont classés comme des serpentinoxytes. Ces plantes sont souvent morphologiquement et physiologiquement adaptées à cet environnement extrême face à une forte concentration de métaux lourds, et des stress hydrique, thermique et nutritionnel. Les habitats sur serpentine sont caractérisés par un faible nombre d'espèces mais un haut niveau d'endémisme.

Dans les Balkans les serpentines se présentent en grands blocs ou de petits affleurements allant de Centre Nord de la Bosnie, vers Ouest et Centre de la Serbie, Centre Nord et Sud-Est de l'Albanie, Nord de la Grèce. La péninsule balkanique, la plus grande zone européenne de serpentine, abrite 334 à 350 espèces (15-16% du total des taxons endémiques) qui sont endémiques de la serpentine. Le nombre de taxons endémiques sur serpentine dans les Balkans augmente progressivement du Nord de la Bosnie, à travers Ouest et Centre de la Serbie, puis vers la partie centrale de la péninsule (SW Serbie, l'Albanie et N & NW Grèce).

Quoique la flore des Balkans soit bien étudiée du point de vue floristique, phytogéographique et taxinomique, divers aspects sont encore mal connus. Par exemple, la taille du génome (la quantité d'ADN nucléaire), caractère important dans l'évaluation de la biodiversité, n'est pas, jusqu'à présent, étudiée chez les espèces végétales qui poussent sur serpentine. Pour cette raison, dans cette étude, nous avons évalué la teneur en ADN chez les espèces végétales serpentinoxytes en Bosnie-Herzégovine centrale et orientale, en Serbie occidentale et en Ancienne République Yougoslave de Macédoine (ARY Macédoine). Ainsi, cette étude apporte pour la première fois des données sur la taille du génome des serpentinoxytes, leur nombre chromosomique et le niveau de ploïdie en relation avec leur affinité avec le substrat, le type de cycle de vie et la forme de croissance.

Les objectifs principaux de la première partie de la thèse ont été de déterminer la taille du génome, le nombre chromosomique et le niveau de ploïdie d'un grand nombre de serpentinophytes strictes et facultatives sur serpentine en Bosnie-Herzégovine centrale et orientale avec un accent particulier sur l'établissement de la relation entre la taille du génome et les conditions de stress subies par les plantes sur ce substrat. Dans ce contexte, une des principales questions posées est : Existe-il une catégorie de taille du génome qui serait plus favorisée dans de tels habitats?

La deuxième partie de la thèse porte sur l'analyse des métaux lourds et des macronutriments dans les sols et sur la propriété de bioaccumulation de l'espèce *Narcissus poeticus* dans les populations poussant sur différents types de substrats dont la serpentine et le calcaire. Ces analyses comportent la mesure des concentrations en métaux lourds (Ni, Co, Mn, Fe) et en macronutriments Mg et Ca dans les diverses parties de la plante et l'observation d'éventuelles modifications chez le *N. poeticus* causée par l'influence des métaux lourds contenus dans les sols de serpentine.

La troisième partie concerne l'étude cytogénétique, à savoir la structure des chromosomes du *N. poeticus* dans différentes populations de la partie occidentale de la péninsule des Balkans. La question posée dans cette partie est la suivante : Quelle est la réponse du génome aux conditions de stress abiotique ? Ainsi tous les changements dans l'organisation du génome concernant l'ADN total, le nombre chromosomique, la présence de chromosomes B et des translocations chromosomiques recensés ont été étudiés.

### ***La taille du génome chez les serpentinophytes dans la partie extrême nord-ouest de la zone de serpentine dans les Balkans***

Le contenu de l'ADN (valeur 2C) a été estimé par cytométrie en flux et le nombre chromosomique par des méthodes standard. Le statut systématique, la préférence au substrat géologique, le type du cycle de vie et la forme de croissance de chaque taxon ont été déterminés selon les données bibliographiques disponibles.

Dans cette étude nous avons présenté des données sur la taille du génome de 308 taxons appartenant à 213 genres, récoltés sur substrat de serpentine. Selon les bases de données disponibles, nous avons obtenu les premiers résultats sur la taille du génome de 28 genres (2 appartenant aux Ptéridophytes, 3 aux monocotylédones et 23 aux eudicots), et 97 espèces et deux taxons au niveau intraspécifique. La taille du génome haploïde des espèces étudiées varient de 0,14 pg (*Selaginella helvetica*) à 41,59 pg (*Lilium martagon*), se qui fait un rapport de ~300 fois.

Selon l'échelle proposée pour la taille du génome par Leitch et coll. (1998), plus de la moitié des taxons estimée (55,63%) ont un très petit génome, 22,18% ont de petit génome et 18,75% un génome intermédiaire. Les taxons avec de grandes et très grandes

tailles de génome sont principalement des gymnospermes et des monocotylédones, et représentent un faible pourcentage (respectivement 3,13% et 0,31%).

Plus des 2/3 de taxons analysés présentent un génome de petite ou très petite taille ( $1C < 3,5$  pg), ce qui est en accord avec les résultats précédemment rapportés et avec l'opinion selon laquelle les espèces dont les génomes sont petits sont répandues dans tous les environnements, tandis que les espèces à grands génomes sont plus sensibles aux conditions environnementales extrêmes. Environ 90% des espèces à courte durée de vie, au sein de notre échantillonnage, possèdent de petits et très petits génomes, ce qui correspond au fait que le temps minimum de génération et le type de cycle de vie sont des caractéristiques limitées par la taille du génome. Comme on pouvait s'y attendre, dans notre échantillon, les espèces dont les génomes sont grands ou très grands ( $1C > 14$  pg), appartiennent aux géophytes monocotylédones et aux phanérophytes gymnospermes. Les taxons à grand génome sont représentés par 11 espèces (3,44%), toutes vivaces et serpentinoxytes facultatives. Dans cette catégorie, toutes les espèces herbacées complètent leur cycle de vie au début du printemps, à l'exception de l'octoploïde du *Leucanthemum vulgare*. Ces résultats appuient l'hypothèse de Knight concernant la contrainte du grand génome (Knight et al., 2005), sur lequel le stress hydrique, la température élevée et la présence de métaux lourds exercent une pression sélective qui a plutôt favorisé les plantes avec de petits génomes.

Une forte corrélation positive ( $r = 0,96$ ,  $p < 0,05$ ) a été observée entre nos résultats et les 331 données concernant les 209 taxons déjà publiés et dont certaines ont été mesurées plus qu'une fois. La comparaison par paire entre nos résultats et ceux précédemment publiés montre des différences dans presque la moitié des valeurs obtenues. Ces différences allant de 0 à 5% ont été enregistrées pour 140 valeurs, 5-10% pour 48 valeurs et supérieures à 10% pour 143 valeurs.

La variation de la taille du génome pour une espèce donnée est considérée comme acceptable jusqu'à 5%. Elle est la conséquence des différences méthodologiques et de l'utilisation des différents instruments de mesure. Dans les cas où cette différence était plus importante, elle a été due à la présence de différents niveaux de ploïdie, éventuellement à la présence d'aneuploïdie et de B-chromosomes. D'autre part, les différences observées dans la fourchette de 5 à 10% ne peuvent pas être toutes expliquées par les phénomènes déjà mentionnés. Très probablement, la plupart de ces différences est le résultat de différentes approches et méthodes dans la détermination de la taille du génome. Plus précisément, ces différences peuvent provenir de l'utilisation de différents standards, de la méthode de préparation des échantillons, de la composition du tampon et du type de matériel végétal (feuilles fraîches, lyophilisées, séchées dans silica gel, ou provenant d'herbier, etc.). Des facteurs incontournables sont aussi la possibilité d'erreur humaine dans la détermination des espèces, dans la manipulation, ainsi que dans la lecture des pics.

Dans plusieurs taxons la présence de polyploïdie et des chromosomes B a conduit à des variations significatives de la taille du génome au niveau intraspécifique. Dans cette étude, 10 taxons avec au moins deux niveaux de ploïdie différents ont été détectés: *Centaurea micranthos*, *Convolvulus arvensis*, *Coronilla varia*, *Daphne mezereum*, *Helianthemum nummularium*, *Leucanthemum vulgare*, *Narcissus poeticus*, *Solidago virgaurea*, *Tanacetum corymbosum*, et *Veronica urticifolia*. La découverte des individus avec des niveaux de ploïdie différents dans la même population a confirmé la bonne pratique d'estimation de la taille du génome sur au moins cinq ou plus d'individus de la même localité. En fait, la cytométrie en flux facilite l'estimation rapide de la taille du génome et favorise la détection de tous les événements de polyploïdie au niveau intra- et inter-populations.

Grâce à la cytométrie en flux, il est également possible de détecter les individus avec un ou plusieurs chromosomes B, en particulier chez les espèces avec des grands et très grands chromosomes, comme dans le cas de *Lilium bosniacum*, *L. martagon*, et *Narcissus poeticus*. L'identification des chromosomes B par cytométrie en flux chez les espèces dont les génomes sont très petits ou petits n'a pas été convaincante, comme nous l'avons montré pour le taxon *Stachys recta* var *chrysophea*.

Dans l'ensemble des plantes analysées, le très petit génome a été la catégorie la plus fréquente dans les familles suivantes: Rosaceae (19 taxons), Fabaceae (18), des Lamiacées (12), Brassicacées (10), et Scrophulariaceae (10). Seule la famille des Asteraceae était représentée par 10 ou plus de taxons appartenant aux catégories de petits génomes et de génomes à taille intermédiaires. En ce qui concerne l'affinité avec le substrat, un très petit nombre de serpentinoxytes obligatoires (24 au total) a été enregistré. Leur taille du génome varie de 0,50 à 5,07 pg, mais la plupart ont de très petits génomes. L'abondance des serpentinoxytes obligatoires endémiques dans des habitats sur serpentine pourrait être expliquée par l'isolement édaphique à long terme, sans interruption ou perturbation de la spéciation. Il est intéressant de noter que la majorité des serpentinoxytes obligatoires possèdent une très petite taille du génome, ce qui est en accord avec l'hypothèse de Knight.

Le plus grand nombre de taxons, distribué dans toutes les catégories de taille du génome, appartiennent aux groupes des espèces indifférentes (55%) et à des serpentinoxytes facultatives (33%). Selon le type de cycle de vie, même 272 taxons (88,31%) sont vivaces. Plus de la moitié d'entre eux, soit 57%, possèdent un très petit génome tandis que 20% ont de petit génome et de génomes intermédiaires. Les autres types de cycle de vie sont représentés par moins de 2,5% dans chaque catégorie de taille du génome. L'absence ou le faible nombre de plantes annuelles observées peut être expliquée par l'incompatibilité entre le court cycle de vie et la nature extrêmement xérophile des habitats sur serpentine, ce qui peut empêcher les plantes de terminer leur développement.

Indépendamment de la catégorie de taille du génome au sein de notre échantillonnage, les Hémicryptophytes sont dominants (48,38%), suivis par les phanérophytes (17%), les chaméphytes (15%), les thérophytes (9%) et les géophytes (9%). La dominance des Hémicryptophytes est probablement le reflet de l'interaction entre des conditions de grande sécheresse et de haute température sur les habitats de serpentine. Par conséquent, il est probable que l'eau, la température et les métaux lourds soient les acteurs principaux exerçant une haute pression sélective sur la flore de serpentine et favorisant les espèces pérennes dont les génomes sont de très petite taille.

***Narcissus poeticus*, serpentinophyte facultative, et certains éléments biogènes (Ni, Co, Mn, Fe, Ca et Mg)**

Le Narcisse du poète (*Narcissus poeticus* L., Amaryllidaceae) est originaire d'Europe centrale et de la région méditerranéenne de l'Europe et de l'Afrique du Nord, seulement une espèce est en Asie, avec un centre de diversité dans la péninsule ibérique. En Bosnie-Herzégovine, le *N. poeticus* forme de très grandes populations avec de nombreux individus surtout dans les champs karstiques. Cette espèce se trouve aussi dans de petites populations à faible nombre d'individus dispersés dans des crevasses rocheuses, dans des prairies de la zone montagnarde et subalpine sur calcaire, et sur substrat de serpentine (comme des serpentinophytes facultatives), à des altitudes de 700 à 1750m. Cette espèce a besoin de sols humides bien drainés, basiques ou légèrement acides, en plein soleil ou à mi-ombre. Elle fleurit de la fin avril à juin et possède un parfum caractéristique et fort. Malgré son importance dans le développement de variétés cultivées, un nombre relativement restreint d'études a été réalisé sur des populations naturelles.

Les espèces qui sont tolérantes au stress nutritif multiple sur les sols de serpentine ont une croissance faible, la tolérance manifeste à faible accessibilité de N, P, K, et Ca, ainsi que la tolérance à la toxicité de Mg et des métaux lourds.

C'est la première fois, et sans doute l'unique étude de population naturelles concernant la relation du narcisse du poète avec le sol contenant certains métaux lourds. Cinq individus de narcisse avec leur rhizosphère associée (le sol autour des bulbes et des racines) ont été échantillonnés dans 11 populations de Bosnie-Herzégovine, de Croatie et de Serbie. La quantité totale de Ni, Co, Mn, Fe, Mg et Ca dans des échantillons du sol et dans le matériel végétal a été analysée par spectrophotométrie d'absorption atomique (AAS). Les valeurs du pH du sol ont été déterminées par le pH-mètre dans une solution saturée de boue = sol / eau déminéralisée.

L'acidité ou l'alcalinité du sol est un facteur majeur dans la détermination de l'accessibilité des nutriments du sol, car elle affecte l'état d'oxydation et la solubilité des éléments, les processus biologiques, et donc la concentration en nutriments dans les

plantes. Sur la base des résultats obtenus par l'analyse des populations naturelles de *Narcissus poeticus* dans les Balkans, il est possible de dire que cette espèce supporte des changements relativement importants de pH du sol, mais qu'elle évite le sol basique. Plus précisément, on a observé que le narcisse du poète montre une gamme relativement large des valeurs de pH de sa rhizosphère (pH 4,64 narcisse du poète à 7,85), ce qui est probablement l'une des raisons de sa réussite en culture pendant plusieurs siècles. Les rhizosphères des individus sur serpentine ont une réaction légèrement acide ou à pH neutre, ceci probablement causé par un excédent de magnésium. D'autre part, le pH de la rhizosphère dans les populations sur calcaire a une plus large gamme, sans toutefois une régularité dans la distribution, à la fois au sein et entre les populations. Il n'existe pas de corrélations entre le pH du sol et la teneur en métaux lourds dans les sols analysés.

Le manganèse est principalement stocké dans les parties aériennes, et non dans le système racinaire, qui dépendent principalement du pH du sol et de la concentration en matière organique dans le sol. Au cours de cette étude les concentrations en Mn mesurées ont été plusieurs fois plus élevées dans le sol que dans les parties de la plante. Les valeurs de Mn dans les sols calcaires ont été plus variables que dans les sols sur serpentine. Les parties aériennes des plantes avaient presque toujours de plus grandes quantités de Mn que les parties souterraines, sauf pour les individus d'une population sur serpentine (Mokra Gora, Serbie), ce qui est probablement la conséquence des rapports spécifiques des ions dans des sols plus profonds et plus humides dans cet habitat. Il est intéressant de noter que les individus dans une population sur serpentine (Zepce, B & H) contenaient une faible valeur de Mn, mais des symptômes de carence n'ont pas pu être observés. On peut dire que tous les individus analysés avaient un régime relativement satisfaisant en Mn.

Le nickel s'accumule dans les végétaux, en fonction de sa disponibilité dans le sol, de l'espèce, des différentes parties de la plante, et de la saison. Les concentrations de nickel dans les sols sur serpentine ont été beaucoup plus élevées que dans les sols calcaires. Dans la plupart des individus analysés, les concentrations de Ni dans les parties souterraines ont été inférieures à celles des parties aériennes, avec, comme attendu des valeurs plus élevées pour les individus issus des populations sur serpentine. Puisque le nickel est principalement accumulé dans les cellules de l'épiderme, les résultats des concentrations plus élevées dans les parties aériennes ne sont pas surprenants. Toutefois, pour un certain nombre d'individus analysés dans de deux populations sur serpentine (Zepce, B & H; Mokra Gora, Serbie) on a enregistré dans les pousses souterraines des concentrations élevées de nickel, ce qui ne pouvait pas être corrélé avec d'autres facteurs testés dans cette étude. Bien que la quantité totale de nickel dans les tissus des individus étudiés dans les populations sur serpentine soit extrêmement élevé par rapport à la concentration de Ni généralement exprimée dans les

autres populations, narcisse du poète ne peut pas être considéré comme son hyperaccumulateur.

Le cobalt est distribué dans l'organisme végétal selon les espèces. Dans des concentrations très élevées il peut provoquer des anomalies chez les plantes. Dans cette étude, les concentrations de cobalt dans les sols sur serpentine ont été significativement plus élevées que dans les sols calcaires. La caractéristique des individus poussant sur le substrat de serpentine se traduit par une plus faible concentration en Co que celle de Ni, ce qui n'est pas toujours le cas chez les individus provenant de substrat calcaire. Les plantes analysées ont montré une concentration en Co relativement faible et uniforme dans toutes les parties de plante. Très probablement, les différents organes du narcisse du poète ont des exigences similaires en Co, de sorte que sa concentration dans le sol n'affecte pas significativement son entrée, sa translocation et son accumulation dans les plantes.

Le fer est accumulé principalement dans les organes actifs du point de vue photosynthétique, bien qu'il soit noté que certaines serpentinophytes le déposent également dans les racines. Bien que le fer soit présent en grandes quantités dans le sol, sa disponibilité est généralement très faible, ce qui provoque souvent une carence. Les concentrations en fer dans les sols sur serpentine sont plus élevées que sur le calcaire, ce qui n'est pas toujours le cas dans les tissus végétaux. Les concentrations en fer ont été en général plus élevées dans les bulbes que dans les parties aériennes (sauf dans les populations Peulje et Kladanj, B & H), mais toujours beaucoup moins élevées que les concentrations dans le sol. Si la plupart des plantes accumulent le fer dans les feuilles, le narcisse du poète le dépose essentiellement dans les organes souterrains. Un autre résultat intéressant est la concentration relativement élevée du Fe dans la plante complète, pour la majorité des individus étudiés. Ces résultats suggèrent que les rhizosphères analysées, en raison de valeurs inférieures de pH, ont été relativement riches en forme de fer accessible pour les plantes.

La translocation du magnésium est facile dans les plantes et sa concentration varie dans les différentes parties de la plante en fonction de l'âge de l'individu et des nutriments accessibles dans le sol. Les sols analysés sur serpentine sont caractérisés par une valeur de magnésium presque deux fois plus grande que sur sol calcaire. Les concentrations de Mg dans les feuilles des individus étudiés sont presque identiques, quel que soit le substrat géologique, ce qui indique la régularité du processus de la photosynthèse. Les individus sur sols calcaire avaient des concentrations de Mg dans les parties aériennes presque deux fois plus importantes que dans les organes souterrains. D'autre part, des concentrations légèrement supérieures de Mg chez les individus sur serpentine, à celles des individus sur calcaire (en particulier dans les organes souterrains), indiquent leur capacité à s'adapter et à survivre dans des conditions plus stressantes. C'est justement cette capacité que possède le *Narcissus*



*poeticus* à répondre aux conditions de déficit hydrique par l'apport accru de magnésium et son accumulation dans les parties souterraines, afin de protéger l'appareil photosynthétique, qui probablement lui donne la possibilité de survivre dans un habitat aussi hostile que celui sur serpentine.

Le calcium est toujours présent dans des concentrations plus élevées dans la tige et les feuilles des plantes que dans le sol, bien que les espèces endémiques serpentinophytes soient mieux adaptées à de faibles concentrations en Ca. La rhizosphère des individus provenant des populations sur serpentine avaient généralement des concentrations plus élevées de calcium que les individus des populations en calcaire. Cependant, presque tous les individus analysés, indépendamment du substrat géologique, ont accumulé plus de Ca dans les organes souterrains. Afin de déterminer les raisons qui ont conduit à une telle distribution du calcium il est nécessaire d'effectuer des recherches supplémentaires, étant donné que cette propriété peut être une caractéristique du narcisse du poète, ou une conséquence des relations antagonistes du calcium avec d'autres cations, et de sa faible mobilité. Comme prévu, les individus sur serpentine avaient bien moins du calcium accumulé que les individus provenant des populations sur calcaire. En outre, les concentrations de Ca dans les feuilles ont presque toujours été inférieures à celles des organes souterrains, ce qui est probablement dû à la présence de magnésium en concentrations très élevées, tant dans le sol que dans les tissus.

Le rapport molaire Ca / Mg dans les feuilles est considéré comme la plus grande spécificité de paires congénères de serpentine par rapport au nonserpentine. Fondamentalement, les espèces sur serpentine ont un rapport molaire de Ca / Mg de les feuilles inférieur à celui de leur paires congénères nonserpentine, mais supérieur à leur sol correspondant. On considère que la croissance normale de la plupart des plantes nécessite un rapport  $Ca/Mg > 1$ . Cependant, les plantes sur serpentine se sont adaptées aux niveaux bas de Ca et au faible rapport de Ca / Mg dans leurs substrats. Dans tous les sols étudiés, le magnésium a été en excès par rapport au Ca, alors que dans les sols calcaires, l'intervalle de variation du rapport Ca / Mg a été plus élevée que dans les sols sur serpentine. Les plantes des populations sur serpentine ont, dans la plupart des cas, contenus des niveaux plus élevés de Mg que de Ca, et le rapport Ca / Mg dans les tissus végétaux a été  $< 1$ , et beaucoup plus variable que dans le sol. Le narcisse du poète se caractérise par un rapport molaire Ca / Mg plus grand dans les parties souterraines qu'aériennes. Ceci peut être corrélé avec la forme de vie (géophyte) et le besoin de protéger davantage le tissu du bulbe dont les parois cellulaires sont plus épaisses et plus rigides. Plus précisément, cette espèce a une dormance en été caractéristique, au cours de laquelle se déroule le processus de la méiose, qui suit immédiatement une exposition de la plante à de très hautes températures et forte sécheresse pendant l'été.

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'espèce *Narcissus poeticus*, bien que généralement accumule de grandes quantités de métaux (Mn, Ni, Co, Fe), n'est pas leur hyperaccumulateur. En outre, cette espèce possède des mécanismes physiologiques qui lui permettent de s'adapter et de survivre dans différentes conditions stressantes, en particulier à l'exposition au déficit hydrique et aux températures élevées.

### ***Caractères cytogénétiques et un système particulier des chromosomes B chez N. poeticus dans différentes conditions environnementales dans les Dinarides***

Cette partie de la thèse concerne la variabilité de la structure chromosomique, polyploïdie, présence de chromosomes B (Bs) et taille du génome dans des populations naturelles de *Narcissus poeticus* dans les Balkans occidentaux. Les individus de treize populations se trouvant dans des conditions environnementales et sur des sols différents ont été analysés à l'aide de la cytométrie en flux pour l'estimation de la taille du génome nucléaire, de l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) pour la cartographie physique des gènes ribosomiques, de fluorochrome banding (chromomycine et Hoechst) pour l'organisation de l'hétérochromatine et de coloration au nitrate d'argent pour l'activité des gènes ribosomiques.

Des études antérieures ont montré que *N. poeticus* et *N. radiiflorus* représentent une seule espèce avec quelques différences morphologiques. Nos résultats confirment également que *N. poeticus* représente une espèce polymorphe au niveau morphologique et cytogénétique.

#### *Caryotype de Narcissus poeticus*

Dans toutes les populations étudiées, *N. poeticus* présente un nombre chromosomique diploïde  $2n = 2x = 14$ , sauf dans deux populations où il existe aussi quelques individus triploïdes,  $2n = 3x = 21$ . Tous les individus triploïdes ont le même caryotype standard que les diploïdes. Des variations interindividuelles ont été observées dans les deux niveaux de ploïdie et concernent la présence de chromosomes B en nombre et en morphologie variable.

Le caryotype standard de *N. poeticus* décrite dans ce travail correspond aux données précédemment publiées. La formule chromosomique commune de *N. poeticus* est  $2n = 8 sm + 2 m + 2 m-sm + 2 sm-st^{sat}$ . Les chromosomes B sont principalement de type submétacentrique, mais ils peuvent être aussi métacentriques ou subtélocentriques.

Le caryotype standard de *N. poeticus* possède 22-24 bandes chromomycine positives, selon sa présence ou non d'une bande sur les satellites de la paire 7, réparties sur tous les chromosomes. La coloration de Hoechst a montré qu'une seule paire de chromosomes (paire 2) possédait des régions AT riches. Après l'application de la technique de FISH, les signaux intercalaires DAPI<sup>+</sup>, correspondant à des régions d'hétérochromatine constitutive, ont été observés seulement sur deux paires de chromosomes (2 et 4).

Les résultats concernant l'hybridation in situ des gènes ribosomiques chez *N. poeticus* sont présentés pour la première fois dans cette étude. Le caryotype standard montre un locus d'ADNr 5S (colocalisé avec la bande DAPI<sup>+</sup> sur la paire 4), tandis que le locus d'ADNr 18S-5.8S-26S a été visible comme un très fort signal sur la partie terminale du bras court ou sur les deux côtés de la constriction secondaire (CS) de la paire satellifère 7. Ces résultats montrent la constance du caryotype et de l'organisation de l'hétérochromatine et de l'ADNr au niveau spécifique, malgré l'éloignement géographique des populations et des différents types d'habitats dans lesquels elles se développent.

La polyploïdie, comme un des mécanismes majeurs de l'adaptation et de la spéciation chez les plantes, est présente dans 47 à 70% des angiospermes. Les polyploïdes nouvellement apparus possèdent souvent de nouvelles caractéristiques physiologiques, écologiques ou phénologiques, et peuvent représenter un moyen rapide d'adaptation et de spéciation.

Le genre *Narcissus* est caractérisé par une polyploïdisation sporadique, avec une plus grande fréquence des tétraploïdes. La polyploïdie est fréquente dans la création de variétés de jardin, où les triploïdes sont formés en premier, puis les tétraploïdes. La présence de triploïdes avec une origine incertaine a été remarquée chez plusieurs espèces de Narcisses. Jusqu'à présent, des populations sauvages triploïdes ne sont pas connues, bien qu'elles aient été décrites en Grèce et en Suisse. Il a été supposé que ces triploïdes se seraient échappés d'une culture ou bien auraient été sélectionnés à partir d'une population naturelle pour leur vigueur.

Dans cette étude, l'apparition spontanée de triploïdes chez *N. poeticus* dans certaines populations des Balkans a été observée pour la première fois. Morphologiquement, il était impossible de distinguer ces individus triploïdes. Ils possèdent trois garnitures chromosomiques identiques, ce qui suggère leur origine autotriploïde. Il est intéressant de noter que ces triploïdes: 1) existent dans deux habitats écologiquement presque totalement contrastés (populations sur serpentine et sur calcaire), et 2) possèdent 0-3 chromosomes B, avec des types variables dans la population karstique. Des conditions environnementales défavorables affectent à la fois la présence et la dynamique évolutive des polyploïdes. Il est très difficile de déterminer quels sont les facteurs environnementaux qui ont une action stressante sur les plantes,

bien que des nombreux et rapides changements de la température dans des environnements humides soient le plus souvent suggérés. Etant donné que la présence de plus grand nombre de triploïdes a été observée dans la population karstique, on peut supposer que dans cette population la production de diplo-pollen (fréquemment observé, mais données non présentées) serait l'une des conséquences particulières aux conditions écologiques extrêmes. D'autres recherches sont nécessaires dans ces populations afin d'estimer la fréquence des individus triploïdes spontanés dans différentes conditions environnementales.

### Chromosome B

Même s'ils ne sont pas nécessaires à la survie des individus, des chromosomes B sont présents dans 10-15% des angiospermes. Chromosome B est un système dynamique et sa fréquence dépend de deux forces opposées: l'accumulation et leur effets sur le « fitness » des individus. Dans les populations naturelles les individus ne possèdent pas plus de trois à quatre chromosomes B, sauf pour *Allium schoenoprasum* ou il a été signalé 20 chromosomes B.

La présence de chromosomes B dans le genre *Narcissus* a été rapportée chez plusieurs espèces. Le nombre de chromosomes B, principalement dans les variétés de narcisses horticoles, varie généralement de un à cinq maximum. Toutes les descriptions des chromosomes B dans ce genre indiquent que sa taille correspond environ aux deux tiers de celle du chromosome satellifère, avec un centromère subterminale, morphologiquement très similaires ou variables, hétérochromatiques ou pas. La bibliographie mentionne seulement quelques remarques sur la présence de chromosomes B chez *N. poeticus*.

Un à trois chromosomes B ont été observés dans la majorité des populations étudiées (dans 9 sur 13 populations). La présence de polymorphisme structural de ces chromosomes (trois types) a été observée dans les populations avec plus grande fréquence des chromosomes B. Tous les types de chromosomes B sont similaires en taille, environ 2/3 de la taille de la plus petite paire de chromosomes. L'origine du polymorphisme structural des Bs peut être expliquée par misdivision du centromère pendant la méiose. Les chromosomes B de types II et III peuvent être des produits éphémères des différents événements de macromutations du type I. En effet, le type standard de Bs est bien conservé et répandu dans toutes les populations étudiées. Le plus grand polymorphisme des chromosomes B a été observé dans la population karstique qui est caractérisée par les conditions environnementales les plus stressantes, notamment par la combinaison des régimes hydriques et thermiques extrêmes (un été très sec et l'inondation le reste de l'année).

Le type le plus fréquent de Bs (submétacentrique), possède quatre patterns différents dans l'organisation de l'hétérochromatine et des gènes ribosomiques. La

coloration au nitrate d'argent a montré que le nombre de nucléoles formés augmente en présence des chromosomes B portant des gènes ribosomiques, dont l'activité est ainsi prouvée.

#### Taille du génome chez *Narcissus poeticus*

Jusqu'à aujourd'hui, le contenu en ADN nucléaire a été estimé pour 36 espèces du genre *Narcissus*. Selon les données disponibles, la taille du génome de *N. poeticus* varie de 24,33 à 27,50 pg pour les individus diploïdes, de 34,55 pg à 38,70 pg pour les triploïdes, et 52,70 pg pour le cultivar tétraploïde.

Dans les populations de *N. poeticus* des Balkans, on a constaté une variation intraspécifique de la quantité d'ADN selon les individus avec ou sans chromosomes B, ce qui confirme l'opinion que ces chromosomes accessoires constituent une source majeure de variation intraspécifique dans la quantité d'ADN nucléaire. Ainsi la taille du génome des diploïdes sans chromosomes B variait de 23,97 à 25,84 pg, pour les diploïdes avec des Bs de 24,31 à 26,86 pg, pour les triploïdes sans Bs de 34,51 à 35,32 pg, et pour l'individu triploïde avec 3 chromosomes B, 38,80 pg. Chaque chromosome B porte environ 0,6 pg d'ADN, et représente près de 5% de la valeur C du génome standard.

Les résultats obtenus dans ce travail démontrent que *Narcissus poeticus* possède un génome dynamique de taille variable en raison de la polyploïdie, de la présence de B-chromosomes et des réarrangements chromosomiques. Il est fort probable que ces modifications du génome soient le reflet de la réponse du génome à différentes conditions environnementales, où les individus portant les chromosomes B pourraient avoir certains avantages sélectifs.

Pour toutes ces raisons, le *N. poeticus* pourrait être un modèle naturel approprié pour étudier l'organisation du génome dans différentes conditions environnementales.

#### *Conclusions*

Cette étude est la première qui se rapporte à l'étude de la taille du génome d'espèces provenant de zones de serpentine et, aussi, un complément de la collecte de données pour la base sur la taille du génome des espèces de la flore des Balkans.

A partir des résultats obtenus dans ce travail les conclusions suivantes ont pu être formulées :

1. La taille du génome a été déterminée pour 308 espèces appartenant aux 213 genres en Bosnie-Herzégovine, dans l'ouest de la Serbie et de l'ARY Macédoine. Les données sont

nouvelles pour 28 genres (2 genres de Ptéridophytes, trois de monocotylédones et 23 eudicotylédones), soit 97 espèces et 2 sous-espèces. Plus de la moitié des taxons étudiés (55,63%) possède un très petit génome, 22,19% un petit, 18,75% moyenne, 3,13% grand, et seulement 0,31% un très grand génome haploïde.

2. Dix taxons avec différents niveaux de ploïdie ont été détectés: *Centaurea micranthos*, *Convolvulus arvensis*, *Coronilla varia*, *Daphne mezereum*, *Helianthemum nummularium*, *Leucanthemum vulgare*, *Narcissus poeticus*, *Solidago virgaurea*, *Tanacetum corymbosum*, et *Veronica urticifolia*.

3. Chez certaines espèces dont les génomes sont grands et très grands, il a été observé une augmentation de 1C-valeurs de l'ADN dans des individus qui possédaient des chromosomes B (*Lilium bosniacum*, *L. martagon* et *Narcissus poeticus*). La présence des chromosomes B, observée par les méthodes de cytogénétique classique chez *Stachys recta* var. *chrysophea* qui possède un très petit génome, n'était pas possible en utilisant la cytométrie en flux.

4. Un échantillonnage plus important dans l'estimation de la quantité d'ADN (nombre de populations et d'individus par population) permet la détection de la variabilité au niveau interspécifique. Ainsi dans le cas de l'espèce *Leucanthemum vulgare* sur substrat de serpentine en Bosnie, il a été noté la présence de trois niveaux de ploïdie (2x, 4x et 6x) et une population où les diploïdes et les tétraploïdes sont en sympatrie.

5. Dans l'ensemble des plantes analysées, les familles représentées par le plus grand nombre de taxons à très petits génomes sont : les Rosacées (avec 19 taxons), les Fabaceae (12), les Brassicacées (10) et les Scrophulariaceae (10). La famille des Asteraceae est la seule à présenter plus de 10 taxons dans les catégories des petits (15) et des moyens (10) génomes.

6. Par rapport à la préférence au substrat géologique, la plupart des espèces sont indifférentes (171), ou facultatives (103) lesquelles, à part sur le serpentine peuvent, peuvent se rencontrer sur le calcaire, mais plus rarement. Dans le présent échantillon, seulement 11 serpentinophytes obligatoires strictes et 13 espèces obligatoires ont été, en plus de serpentine, très rarement trouvées sur substrat de calcaire.

7. Selon le type de cycle de vie, 272 taxons (88,31%) sont pérennes. Plus de la moitié des plantes vivaces (57%) ont de très petits génomes, 20% de petits et 20% de moyens génomes. Il a été noté relativement peu (~ 4%) de plantes annuelles. Les Hémicryptophytes représentent une forme de vie dominante avec 48.38%, tandis que

les Phanérophytes sont à 17%, les Chaméphytes 15%, les Thérophyte 9% et les Géophytes 9%.

8. Le stress hydrique, la température élevée et la présence de métaux lourds dans les habitats sur serpentine, exercent une forte pression sélective favorisant les espèces pérennes à petits génomes.

9. C'est la première étude sur l'interaction entre le narcisse du poète et les sols dans des populations naturelles, avec une référence spéciale à certains métaux lourds (Mn, Ni, Co, Fe). *Narcissus poeticus* tolère le changement du pH du sol dans la gamme de 4.64 à 7.85, ce qui est probablement l'une des raisons de sa culture réussie pendant des siècles.

10. Par comparaison aux sols calcaires, les sols analysés sur la serpentine sont beaucoup plus riches en quantité totale de nickel, de cobalt et de magnésium, tandis que les concentrations de manganèse, de fer et de calcium sont assez uniformes. Les concentrations de manganèse, de nickel et de magnésium ont été généralement plus élevées dans les parties aériennes du narcisse du poète, contrairement au fer et au calcium. Des valeurs cohérentes et similaires concernant le cobalt ont été mesurées dans toutes les parties des plantes. Bien que généralement accumule de grandes quantités des métaux analysés (Mn, Ni, Co, Fe), le narcisse du poète n'est pas un hyperaccumulateur.

11. Le rapport molaire Ca / Mg dans les différentes parties des individus du narcisse du poète est conforme aux valeurs attendues: > 1 dans les populations calcaires et <1 dans les populations sur serpentine. La particularité du narcisse du poète se reflète dans le fait que son rapport molaire Ca / Mg dans sa partie souterraine est plus grand que dans la partie aérienne, ce qui peut être corrélé avec sa forme de vie (géophyte) et sa dormance pendant l'été.

12. La répartition naturelle du narcisse du poète est probablement surtout influencée par la combinaison spécifique des régimes thermique et hydrique, et de manière secondaire par la concentration des éléments nutritifs dans le sol.

13. Il n'existe pas de corrélation entre les caractéristiques morphologiques et cytogénétiques des individus analysés du narcisse du poète. On observe les mêmes caractéristiques du caryotype standard et la même organisation de l'hétérochromatine chez *Narcissus poeticus* au niveau spécifique, indépendamment de la distance géographique entre les populations et les différents types d'habitats dans lesquels il se trouve.

14. La variation de la quantité d'ADN nucléaire chez le *Narcissus poeticus* est causée par la présence de la polyploïdie (des individus triploïdes ont été observés dans deux populations) et de chromosomes B (dans 9 sur 13 populations). C'est la première confirmation de la présence de triploïdes naturels du narcisse du poète dans la péninsule des Balkans.

15. Dans les populations naturelles du narcisse du poète, un système unique de chromosomes B, avec trois morphotypes différents, a été observé. Le type submetacentrique, le plus fréquent, montre quatre modèles différents selon l'organisation de l'hétérochromatine et des gènes ribosomiques, en général actifs. Les individus qui possèdent des chromosomes B avec des gènes ribosomiques (18S-5.8S-26S) actifs, montre également une augmentation du nombre total de nucléoles formés.

16. Il a été noté la présence de translocations et d'inversions chez certains individus qui poussent dans des habitats spécifiques (avec la présence de métaux lourds ou d'humidité pendant l'été).

17. Les modifications observées au niveau de la structure chromosomique et de la quantité d'ADN chez *N. poeticus* probablement reflètent la réponse du génome aux conditions de stress, où les individus possédant des chromosomes B pourraient avoir un avantage sélectif. On peut supposer que les populations du narcisse du poète dans les prés humides subalpins et submontagnards se développent dans des conditions optimales et montre l'organisation du génome la plus stable.



## 7. ZAKLJUČCI

Habitati na serpentinskim substratima predstavljaju nepovoljne uvjete za razvoj biljaka. Karakteriziraju se sa malim brojem vrsta, ali prisustvom velikog broja endema. U ovoj studiji se po prvi put prezentira serija podataka o veličini genoma serpentinofiti, njihovom hromosomskom broju, nivou ploidije, sklonosti ka supstratu, tipu životnog ciklusa i životne forme na krajnjem sjeverozapadnom dijelu serpentinskog područja Balkanskog poluostrva. Uzorak je obuhvatao 308 svojti iz 213 rodova, sa novim vrijednostima za 28 rodova i 99 vrsta. Prema Leitch-evim kriterijima, više od polovine analiziranih svojti (55.63%) pripadale su grupi vrlo malih genoma, 22.19% malim, 18.75% srednjim, 3.13% velikim i samo 0.31% vrlo velikim genomima. U odnosu na sklonost ka supstratu, glavnina vrsta (171) su bile indiferentne ili fakultativne serpentinofite (103). U zavisnosti od životnog ciklusa, ~ 4% vrsta su bile jednogodišnje, a 88.31% višegodišnje, od kojih je 57% imalo vrlo male genome. Hemikriptofite su predstavljale dominantnu životnu formu (48.38%), koju slijede fanerofite (17%), hamefite (15%), terofite (9%) i geofite (9%). Iz dobivenih rezultata proizilazi da vodni stres, visoke temperature i prisustvo teških metala u serpentinskim habitatima imaju visok selektivni pritisak i favoriziraju višegodišnje vrste sa vrlo malim genomom.

*Narcissus poeticus* (Amaryllidaceae), fakultativna serpentinofita, je predak kultiviranih narcisa. Ovo je prva studija o *N. poeticus* i njegovoj rizosferi u prirodnim populacijama. Ova vrsta pokazuje toleranciju na promjene pH vrijednosti u dijapazonu od 4.64 do 7.85. Totalne koncentracije nikla, kobalta i magnezija u serpenitnskim tlima su bile veće nego u krečnjačkim. *Narcissus poeticus* se karakterizirao većom akumulacijom mangana, nikla i magnezija u nadzemnim dijelovima biljke. Suprotno, kobalt je imao skoro istu totalnu koncentraciju u svim dijelovima biljke. Druga neuobičajena karakteristika *N. poeticus* je najveći iskazani molarni odnos Ca/Mg u podzemnim dijelovima, vjerovatno zbog njegove životne forme (geofita) i ljetne dormancije. Očito je da iako *N. poeticus* akumulira određene količine istraživanih teških metala (Mn, Ni, Co, Fe) on se ne može smatrati nije njihovim hiperakumulatorom.

Važan dio ove studije se odnosi na varijabilnost hromosomske strukture, veličine genoma, nivoa ploidije i prisustva B-hromosoma u 13 prirodnih populacija *N. poeticus* koje rastu na različitim geološkim supstratima i pod različitim okolišnim uslovima. Korištena je tehnika protočne citometrije za određivanje veličine genoma, fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) za fizicko mapiranje rDNK, fluorohrom banding za organizaciju heterohromatina i bojenje srebrenim nitratom za utvrđivanje aktivnosti ribozomalnih gena. Organizacija ribosomalnih gena i prisustvo prirodnih triploida su u ovoj studiji saopćeni po prvi put. Uočeno je prisustvo individua koje nose B-hromosome (u 9 od 13 populacija) i hromosomske translokacije. Poseban sistem B-hromosoma je predstavljen sa tri različita morfotipa. Najčešći submetacentrični tip pokazuje četiri različita obrasca u organizaciji heterohromatina i rDNK. Bojenje s AgNO<sub>3</sub> je pokazalo da se formirani broj nukleolusa povećava u prisustvu B-hromosoma koji nose ribosomalne gene, što potvrđuje njihovu aktivnost. Dobiveni rezultati pokazuju da *N. poeticus* ima dinamičan genom sa različitom količinom DNK usljed prisustva poliploidije, B-hromosoma i hromosomskih rearanžmana. Uočene promjene najvjerovatnije odražavaju odgovor genoma na različite okolišne uslove u kojima individue koje posjeduju B-hromosome imaju izvjesnu selektivnu prednost.

## 8. RÉSUMÉ

Les habitats sur le substrat de serpentine représentent un environnement hostile pour le développement des plantes. Ils sont caractérisés par un faible nombre d'espèces mais un haut niveau d'endémisme. Cette étude présente pour la première fois une série des données sur la taille du génome, du nombre chromosomique, du niveau de ploïdie, de l'affinité pour le substrat, du cycle de vie, du type et de la forme de croissance des serpentinophytes dans l'extrême nord-ouest de la zone de serpentine dans les Balkans. Les 308 taxons des plantes étudiées comprennent appartenant à 213 genres, dont la taille du génome est donnée pour la première fois pour 28 genres et 99 espèces. En utilisant les critères de Leitch, plus de la moitié des taxons (55.63%) appartiennent au groupe des très petits génomes, 22.19% aux petits, 18.75% aux moyens, 3.13% aux grands, et seulement 0.31% aux très grands génomes. Concernant l'affinité au substrat, la majorité d'espèces (171) sont indifférentes ou des serpentinophytes facultatives (103). Selon le type de cycle de vie, ~ 4% des espèces sont annuelles, 88.31% pérennes, dont 57% possèdent de très petits génomes. Les hémicryptophytes représentent une forme de vie dominante (48.38%), tandis que les phanérophytes représentent 17%, les chaméphytes 15%, les thérophyte 9% et les géophytes 9%. Il est évident que le stress hydrique, les températures élevées et la présence de métaux lourds dans les habitats sur la serpentine jouent une haute pression sélective et favorisent des espèces pérennes à très petits génomes.

Le *Narcissus poeticus* (Amaryllidaceae), serpentinophyte facultative, est l'ancêtre des narcisses cultivés. C'est la première étude de *N. poeticus* et de sa rhizosphère dans les populations naturelles. Il montre une tolérance au pH du sol qui varie du 4.64 à 7.85. Les concentrations totales de nickel, de cobalt et de magnésium sont plus élevées dans les sols sur serpentine que dans ceux sur calcaires. *Narcissus poeticus* est caractérisé par une plus grande accumulation de manganèse, de nickel et de magnésium dans ses parties aériennes. Le cobalt, par contre, a une concentration totale uniforme dans toutes les parties de la plante. Une autre caractéristique inhabituelle de *N. poeticus* est son plus grand rapport molaire Ca/Mg dans les parties souterraines, probablement dû à sa forme de vie (géophytes) et une dormance estivale. Il est évident que, même si *N. poeticus* accumule certaines quantités de métaux lourds estimés (Mn, Ni, Co, Fe), il n'est pas pour autant un hyperaccumulateur.

Une partie importante de ce travail concerne la variabilité de la structure chromosomique, la taille du génome, le niveau de ploïdie et la présence de chromosomes B dans 13 populations naturelles de *N. poeticus* poussant sur différents substrats géologiques et dans différentes conditions environnementales. La technique de la cytométrie en flux a été utilisée pour estimer la taille du génome, l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) pour la cartographie physique de l'ADNr, le fluorochrome banding pour l'organisation de l'hétérochromatine et la coloration au nitrate d'argent pour estimer l'activité des gènes ribosomiques. L'organisation des gènes ribosomiques et l'existence des triploïdes naturels ont été rapportés ici pour la première fois. Présence des individus portant de chromosomes B (dans 9 populations sur 13) et de translocations chromosomiques a été détectée. Un système particulier de chromosomes B présente trois différents morphotypes. Le submétacentrique type, le plus fréquent, possède quatre patrons différents dans l'organisation de l'hétérochromatine et de l'ADNr. La coloration à l'AgNO<sub>3</sub> a montré que le nombre de nucléoles formés augmente en présence des chromosomes B portant des gènes ribosomiques, dont l'activité est ainsi prouvée. Les résultats obtenus démontrent que *N. poeticus* possède un génome dynamique avec la quantité d'ADN variable en raison de la présence de polyploïdie, de chromosomes B et de réarrangements chromosomiques. Il semble que les modifications observées reflètent la réponse du génome à différentes conditions environnementales où les individus portant les chromosomes B pourraient avoir des avantages sélectifs.

## 9. SUMMARY

Habitats on serpentine substrate present a hostile environment for the plants development. They are characterized by a small number of species, but high levels of endemism. This study shows for the first time a series of data on genome size, chromosome number, ploidy level, the affinity to the substrate, the life cycle, the type and form of growth in the extreme northwest region of serpentine area in the Balkans. The sample includes 308 taxa belonging to 213 genera, with new values recorded for 28 genera and 99 species. Using Leitch's criteria, more than half of estimated taxa (55.63%) belong to the group of very small genomes, 22.19% small, 18.75% intermediary, 3.13% large and only 0.31% to very large genomes. Regarding the affinity to the substrate, the majority of species (171) were indifferent or facultative serpentinophytes (103). Concerning the life cycle, ~ 4% of species are annuals and 88.31% perennials, and 57% had very small genomes. Hemicryptophytes represent a dominant life form (48.38%), phanerophytes 17%, Ichamaephytes 5%, therophytes 9% and geophytes 9%. It is clear that the water stress, high temperatures and presence of heavy metals in serpentine habitats have the high selective pressure and favor perennial species with very small genome.

The *Narcissus poeticus* (Amaryllidaceae), facultative serpentinophyte, is the ancestor of cultivated daffodils. This is the first study of *N. poeticus* and its rhizosphere in natural populations. It shows tolerance to soil pH ranging from 4.64 to 7.85. Serpentine soils have total concentrations of nickel, cobalt and magnesium highest, compared with calcareous soils. *Narcissus poeticus* is characterized by the greater accumulation of manganese, nickel and magnesium in the aerial parts of plant. Against the cobalt has a uniform total concentration in all parts of the plant. Another unusual feature of *N. poeticus* is the highest molar ratio Ca / Mg in the underground parts, probably due to his life form (geophytes) and summer dormancy. It is obvious that although *N. poeticus* accumulate certain amounts of estimated heavy metals (Mn, Ni, Co, Fe), it does not a hyperaccumulator.

An important part of this work concerns the variability of the chromosome structure, genome size, the ploidy level and the presence of B chromosomes in 13 natural populations growing on different soils and under different environmental conditions. The technique of flow cytometry was used to estimate the genome size, fluorescent in situ hybridization (FISH) for the physical mapping of rDNA, the fluorochrome banding for the organization of heterochromatin and silver staining to estimate the activity of ribosomal genes. Organization of ribosomal genes and natural triploids have been reported here for the first time. Presence of individuals carrying B chromosomes (in 9 / 13 populations) and chromosomal translocations were detected. A particular system of B chromosomes presents three different morphotypes. The most common submetacentric type shows four different patterns in the organization of heterochromatin and rDNA. The AgNO<sub>3</sub> staining showed that the number of nucleoli formed increases in the presence of B chromosomes carrying ribosomal genes, which proved their activity. The obtained results show that *N. poeticus* has a dynamic genome with the variable amount of DNA due to the presence of polyploidy, B chromosomes and chromosomal rearrangements. It seems that the observed changes reflect the response of the genome to different environmental conditions in which individuals carrying B chromosomes may have some selective advantages.

## 10. LITERATURA

1. **Abdeddaim-Boughanmi KK. 2010.** Etude de deux cytotypes de *Lygeum spartum* L. par approches pluridisciplinaires: Palynologie, Cytogénétique classique et moléculaire, doktorska disertacija, Oran.
2. **Angelone M, Vaselli O, Bini C, Coradossi N. 1993.** Pedogeochemical evolution and trace elements availability to plants in ophiolitic soils. *Science of the Total Environment* **129**: 291–309.
3. **Arano H, Saito H. 1980.** Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in subtribe Seselinae. *La Kromosomo* **II 17**: 471–480.
4. **Asemaneh T, Ghaderian SM, Baker AJM. 2007.** Responses to Mg/Ca balance in an Iranian serpentine endemic plant, *Cleome heratensis* (Capparaceae) and a related non-serpentine species, *C. foliolosa*. *Plant Soil* **293**: 49–59.
5. **Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L, Kizek R. 2008.** Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* **6**: 189–213.
6. **Baker AJM. 1981.** Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* **3**: 643–654.
7. **Baker AJM. 1987.** Metal tolerance. *New Phytologist* **106** (suppl.): 93-111.
8. **Baker AJM, Brooks RR. 1989.** Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81–126.
9. **Baker AJM, Proctor J, Reeves RD (eds). 1992.** The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils. Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology, University of California, Davis, 19-22 June 1991. Intercept, Hampshire, UK.
10. **Baker AJM, Proctor J, Reeves RD. (Eds.). 1993.** The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils. Intercept Ltd., Andover, UK, 509.
11. **Bancheva S, Greilhuber J. 2006.** Genome size in Bulgarian *Centaurea* s.l. (Asteraceae). *Plant Systematic and Evolution* **257**: 95-117.

12. **Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, Fauth M, Ganguli A, Kotak S, Mishra SK, Nover L, Port M, Scharf K-D, Tripp J, Weber C, Zielinski D, Von Koskull-Döring P. 2004.** Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of Bioscience* **29(4)**: 471–487.
13. **Barceloux DG. 1999.** Nickel. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* **37**: 239–242.
14. **Bazylev BA, Popević A, Karamata S, Kononkova NN, Simakin SG, Olujić J, Vujnović L, Memović E. 2009.** Mantle peridotites from the Dinaridic ophiolite belt and the Vardar zone western belt, central Balkan: A petrological comparison. *Lithos* **108**: 37–71.
15. **Beck MG. 1903.** Flora Bosne, Hercegovine i Novopazarskog Sandžaka. 1. Gymnospermae i Monocotyledones, Sarajevo.
16. **Beck MG. 1916.** Flora Bosne, Hercegovine i Novopazarskog Sandžaka, II (7). Glasnik Zemaljskog Muzeja u BiH, XXVIII, Sarajevo.
17. **Beck MG. 1927.** Flora Bosne, Hercegovine i Oblasti Novog Pazara, III choripetalae, Srpska Kraljevska Akademija, Beograd-Sarajevo.
18. **Beck MG, Malý K. 1950.** Flora Bosnae et Hercegovinae, IV sympetalae, pars 1, Biološki Institut Sarajevo, Svjetlost Sarajevo.
19. **Beck MG, Malý K, Bjelčić Ž. 1967-1983.** Flora Bosnae et Hercegovinae, IV sympetalae, pars 2-4, Zem. Muzej Bosne i Hercegovine, Sarajevo.
20. **Bennett MD, Smith JB, Lewis Smith RI. 1982.** DNA amounts of angiosperms from the Antarctic and South Georgia. *Environmental and Experimental Botany* **22**: 307–318.
21. **Bennett MD. 1987.** Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist* **106(Suppl)**: 177–200.
22. **Bennet MD, Leitch IJ. 2005.** Angiosperm DNA C-values database (release 4.0), Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>.
23. **Beus V. 1980.** Zajednica bukovo-jelove šume na peridotitu i serpentinitu Bosne. *Radovi Šumarskog fakulteta i Instituta za šumarstvo u Sarajevu*, XXIV, 24(6).
24. **Beus V. 1986.** Fitocenoze bukve i jele na bazičnim i ultrabazičnim eruptivima ofiolitske zone u Bosni. Šumarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, doktorska disertacija, Sarajevo.

25. **Bhatia NP, Baker AJM, Walsh KB, Midmore DJ. 2005.** A role for nickel in osmotic adjustment in drought- stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *Planta* **223**: 134-139.
26. **Bogunic F, Muratovic E, Brown S, Siljak-Yakovlev S. 2003.** Genome size and base composition of five *Pinus* species from Balkan region. *Plant Cell Reports* **22**: 59-63.
27. **Bogunic F, Muratovic E, Ballian D, Siljak-Yakovlev S, Brown S. 2007.** Genome size stability among five subspecies of *Pinus nigra* Arnold s.l. *Environmentally and Experimental Botany* **59**: 345-360.
28. **Bougourd SM, Parker JS. 1979.** The B–chromosome system of *Allium schoenoprasum*. III. An abrupt change in B–frequency. *Chromosoma* **75**: 385–392.
29. **Brady KU, Kruckeberg AR, Bradshaw JrHD. 2005.** Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 243-266.
30. **Brandham PE, Kirton PR. 1987.** The chromosomes of species, hybrids and cultivars of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). *Kew Bulletin* **42(1)**: 65–102.
31. **Brandham PE, West JP. 1993.** Correlation between nuclear DNA values and differing optimal ploidy levels in *Narcissus*, *Hyacinthus* and *Tulipa* cultivars. *Genetica* **90**: 1–8.
32. **Brooks RR. 1987.** Serpentine and its vegetation: a multidisciplinary approach. Dioscorides Press, Oregon.
33. **Brooks RR. 1998.** Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks RR (Ed.), Plants that Hyperaccumulate Heavy Metal. CAB International, Wallingford, UK, 55–94.
34. **Brown PH, Welch RM, Cary EE. 1987.** Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiology* **85**: 801-803.
35. **Brown PH, Dunemann L, Schultz R, Marschner H. 1989.** Influence of redox potential and plant species on the uptake of nickel and cadmium from soils. *Zh. Pflanzenernahr. Bodenkd.* **152**: 85–91.
36. **Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2000.** Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA.
37. **Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW. 2000.** B–chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **355**: 163–178.

38. **Carchilan M, Houben A. 2007.** Transcription analysis of rye B-chromosomes. *Chromosome Research* **15**(Suppl. 2): 72.
39. **Cerbah M, Coulaud J, Brown SC, Siljak-Yakovlev S. 1999.** Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochaeris*. *Heredity* **82**: 261-266.
40. **Cerbah M, Montreau E, Brown S, Siljak-Yakovlev S, Bertrand H, Lambert C. 2001.** Genome size variation and species relationships in the genus *Hydrangea*. *Theoretical and Applied Genetics* **103**: 45-51.
41. **Cesca G. 1972.** Numeri cromosomici per la Flora Italiana: 98-107. *Informatore Botanico Italiano* **4**: 45-66.
42. **Chaney RL, Chen KY, Li YM, Angle JS, Baker AJM. 2008.** Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in *Alyssum* species and cabbage grown in nutrient solution. *Plant Soil* **311**: 131-140.
43. **Chiarucci A, Baker AJM. 2007.** Advances in the ecology of serpentine soils. *Plant Soil* **293**: 1-2.
44. **Chiarucci A, Bonini I, Fattorini L. 2003.** Community dynamics of serpentine vegetation in relation to nutrient addition and climatic variability. *Journal of Mediterranean Ecology* **4**(1): 23-30.
45. **Chiarucci A, Riccucci M, Celesti C, De Dominicis V. 1998a.** Vegetation-environment relationship in the ultramafic area of onte Ferrato, Italy. *Israel journal of Plant Sciences* **46**: 213-221.
46. **Chiarucci A, Robinson H, Bonini I, Petit D, Brooks RR, De Dominicis V. 1998b.** Vegetation of Tuscan ultramafic soils in relation to edafic and physical factors. *Folia Geobotanica* **33**: 113-131.
47. **Chiarucci A, Rocchini D, Leonzio C, De Dominicis V. 2001.** A test of vegetation-environment relationship in serpentine soils of Tuscany, Italy. *Ecological Research* **16**: 627-639.
48. **Chiarucci A. 2004.** Vegetation ecology and conservation on Tuscan ultramafic soils. *The Botanical Review* **69**(3): 252-268.

49. **Coleman RG, Jove C. 1992.** Geological origin of serpentinites. *In* The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils. Baker AJM, Proctor J, Reeves RD (Eds). Intercept, Andover, 1–18.
50. **Conger AD, Fairchild LM. 1953.** A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain technology* **28**: 281–283.
51. **Ćirić M. 1984.** Pedologija, Svjetlost, Sarajevo.
52. **D'Amato G. 2004.** Karyotype and heterochromatin characterization in some species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Caryologia* **57(1)**: 99–105.
53. **De Dominicis RI, D'Amato G, Tucci GF. 2002.** On the hybrid origin of *Narcissus biflorus* (Amaryllidaceae): analysis of C-banding and rDNA structure. *Caryologia* **55(2)**: 129–134.
54. **Dimitrova D, Greilhuber J. 2000.** Karyotype and DNA-content evolution in ten species of *Crepis* (Asteraceae) distributed in Bulgaria. *Botanical Journal of the Linnean Society* **132(3)**: 281–297.
55. **Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003.** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* **51**: 127–128.
56. **Drušković B. 1984.** Uticaj zagađenja sredine na genetske promene u biljnim populacijama. Thesis. University of Novi Sad, Novi Sad, Vojvodina, Republic of Serbia.
57. **Dudić B, Rakić T, Šinžar-Sekulić J, Atanacković V, Stevanović B. 2007.** Differences of metal concentrations and morpho-anatomical adaptations between obligate and facultative serpentrophytes from Western Serbia. *Archives of Biological Sciences* **59(4)**: 341–349.
58. **El-Jaoual T, Cox DA. 1998.** Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition* **21**: 353–386.
59. **Epstein EE. 1972.** Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. John Wiley and Sons, New York.
60. **Fedorov AA (ed.). 1969.** Chromosome Numbers Of Flowering Plants, Academy of Sciences of the USSR, V. L. Komarov Botanical Institute, Nauka, Leningrad.
61. **Fernandes A. 1952.** Sur le rôle probable des heterochromatinosomes dans l'évolution des nombres chromosomiques. *Scientia Genetica* **4**: 168–181.



62. **Fernandes A. 1968.** Keys to the identification of native and naturalized taxa of the genus *Narcissus* L.. RHS Daffodil and Tulip Yearbook: 37–66.
63. **Fernandes A. 1975.** L'evolution chez le genre *Narcissus* L.. *Anales del Instituto Botánico A.J. Cavanilles* **32 (2)**: 843–872.
64. **Freitas H, Prasad MNV, Pratas J. 2004.** Analysis of serpentinophytes from north–east of Portugal for trace metal accumulation—relevance to the management of mine environment. *Chemosphere* **54**: 1625–1642.
65. **Feulgen R, Rossenbeck H. 1924.** Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nukleinsäure von typus der thymonukleinsäure und die darauf beruhende selektive färbung von zellkernen in mikroskopischen präparaten. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* **135**: 203–248.
66. **Gabrielli R, Pandolfini T, Vergnano O, Palandri MR. 1990.** Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant and Soil* **122**: 271–277.
67. **Galbraith D, Harkins K, Maddoks J, Ayres N, Sharma D, Firoozabady E. 1983.** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**: 1049–1051.
68. **Geber G, Schweizer D. 1988.** Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Systematics and Evolution* **158**: 97–106.
69. **Gerlach WT, Dyer TA. 1980.** Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Research* **8(21)**: 4851–4865.
70. **Godelle B, Cartier D, Marie D, Brown SC, Siljak-Yakovlev S. 1993.** Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry* **14**: 618–626.
71. **Graham SW, Barrett SCH. 2004.** Phylogenetic reconstruction of the evolution of stilar polymorphism in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* **91**: 1007–1021.
72. **Gregory TR. 2001.** Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews* **76**: 65–101.
73. **Greilhuber J, Borsch T, Müller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W. 2006.** Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. *Plant Biology* **8**: 770–777.

74. **Greilhuber J, Doležel J, Lysak MA, Bennett MD. 2005.** The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* **95**: 255-260.
75. **Grime JP, Mowforth MA. 1982.** Variation in genome size – an ecological interpretation. *Nature* **299**: 151-153.
76. **Gruner A, Hoverter N, Smith T, Knight CA. 2010.** Genome size is a strong predictor of rootmeristem growth rate. *Journal of Botany*, doi:10.1155/2010/390414.
77. **Guha MM, Mitchell RL. 1966.** Trace and major element composition of the leaves of some deciduous trees. II. Seasonal changes. *Plant Soil* **24**: 90–112.
78. **Hadač E. 1989.** Ecological significance of polyploidy in high mountain plants and plant communities. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **24**: 51–56.
79. **Hall KJ, Parker JS. 1995.** Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Research* **3**: 417–422.
80. **Hanks GR. 2002.** *Narcissus and daffodil*, 1st edn. London: Taylor and Francis.
81. **Harrison S. 1999.** Local and regional diversity in a patchy landscape: native, alien, and endemic herbs on serpentine. *Ecology* **80**: 70–80.
82. **Hayek A. 1970.** Prodrromus Florae Peninsulae Balkanicae 1-3. Berlin–Dahlem, reprint Kenigstein.
83. **Heslop–Harrison LS, Schwarzacher T, Anamthawat–Jonsson K, Leitch IJ. 1991.** *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation techniques. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **3**: 109–116.
84. **Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T. 1996.** Flow cytometry and chromosome sorting. In: Fukui K, Nakayama S, eds. *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*. Boca Raton: CRC Press, 85-108.
85. **Heslop-Harrison JS (Pat). 2000.** RNA, genes, genomes and chromosomes: repetitive DNA sequences in plants. Birkhauser Verlag, Switzerland.
86. **Hoffmann MH, Schmuths H, Koch C, Meister A, Fritsch RM. 2010.** Comparative analysis of growth, genome size, chromosome numbers and phylogeny of *Arabidopsis thaliana* and three cooccurring species of the Brassicaceae from Uzbekistan. *Journal of Botany*, doi:10.1155/2010/504613.

87. **Holmes DS, Bougourd SM. 1991.** B–chromosome selection in *Allium schoenoprasum*. II. Experimental populations. *Heredity* **67**: 117–122.
88. **Hovmand MF. 1984.** Cycling of Pb, Cd, Cu, Zn and Ni in Danish agriculture. In: Berglund S, Davis RD, Hermite PL (eds). *Utilisation of Sewage Sludge on Land: Rates of Application and Long-Term Effects of Metals*. Dordrecht: D. Reidel.
89. **IPCN, Index to Plant Chromosome Numbers Data Base, Missouri Botanical Garden**w3TROPICOS. <http://mobot.mobot.org/W3T/search/ipcn.html>.
90. **Jenny H. 1980.** The soil resource: Origin and behaviour. *Ecological studies* 37, New York: Springer-Verlag, 256–259.
91. **Jones RN. 1995.** Tansley review no. 85: B-chromosomes in plants. *New Phytologist* **131**: 411–434.
92. **Jones RN, Houben A. 2003.** B-chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science* 8(9): 417–423.
93. **Jones RN, Viegas W, Houben A. 2008.** A century of B-chromosomes in plants: So what? *Annals of Botany* 101: 767–775.
94. **Josifović M (ed). 1970-1977.** Flora SR Srbije 1-9, Srpska Akademija Nauka i Umetnosti.
95. **Kalendar J, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E, Schulman AH. 2000.** Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **97(12)**: 6603-6607.
96. **Karihaloo JL. 1987.** Variation in the karyotype of three cultivars of *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae). *Genetica* 73: 217–221.
97. **Kazakou E, Dimitrakopoulos PG, Baker AJM, Reeves RD, Troumbis AY. 2008.** Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews* **83**: 495–508.
98. **Kington S. 1989.** *The international daffodil checklist*. London: Royal Horticultural Society.
99. **Kišpatić M. 1897.** Kristalinsko kamenje serpentinske zone u Bosni. *Rad Jugoslovenske akademije znanosti i umjetnosti, Matematičko-prirodoslovni razred, Zagreb*, **24**: 95-231.

100. **Knight CA, Ackerly DD. 2002.** Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. *Ecology Letters* **5**: 66–76.
101. **Knight CA, Molinari NA, Petrov DA. 2005.** The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Annals of Botany* **95**: 177–190.
102. **Knight CA, Beaulieu JM. 2008.** Genome size scaling through phenotype space. *Annals of Botany* **101(6)**: 759–766.
103. **Koenigs RL, Williams WA, Jones MB, Wallace A. 1982.** Factors affecting vegetation on a serpentine soil. II. Chemical composition of foliage and soil. *Hilgardia* **50**: 15–26.
104. **Kondo T, Hizume M. 1982.** Banding for the chromosomes of *Cryptomeria japonica* D. Don. *The Journal of Japanese Forest Society* **64**: 356–358.
105. **Kozlowski TT, Pallardy SG. 1997.** Physiology of woody plants. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, San Diego, USA.
106. **Kruckeberg AR. 1950.** An experimental inquiry into the nature of endemism on serpentine soils. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley, California, USA.
107. **Kruckeberg AR. 1979.** Plants that grow on serpentine: A hard life. *Davidsonia* **10**: 21–29.
108. **Kruckeberg AR. 1984.** California Serpentine: Flora, Vegetation, Geology, Soils and Management Problems. University of California Press, Berkeley.
109. **Krystufek B, Reed JM. 2004.** Balkan Biodiversity—Pattern and Process in European Hotspot. Griffitts HI, Krystufek B, and Reed JM (eds), Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, 1–9.
110. **Kubešová M, Moravcová L, Suda J, Jarošík V, Pyšek P. 2010.** Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora. *Preslia* **82**: 81–96.
111. **Kukier U, Chaney RL. 2004.** In situ remediation of Ni phytotoxicity for different plant species. *Journal of Plant Nutrition* **27**: 465–495.
112. **Larcher W. 1995.** Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

113. **Lasat MM, Kochian LV. 2000.** Physiology of Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. In: Terry N, Banuelos G (eds). Phytoremediation of contaminated soils and waters. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
114. **Le Thierry d'Ennequin M, Panaud O, Siljak-Yakovlev S, Sarr A. 1998.** First evaluation of nuclear DNA content in *Setaria* genus by flow cytometry. *The Journal of Heredity* **89**: 556-559.
115. **Leitch I J, Chase MW, Bennett MD. 1998.** Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany* **82 (Suppl. A)**: 85-94.
116. **Leitch IJ, Bennett MD. 2004.** Genome downsizing in polyploidy plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 651-663.
117. **Leitch AR, Leitch IJ. 2008.** Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* **320**: 481-483.
118. **Lombini A, Dinelli E, Ferrari C, Simoni A. 1998.** Plant-soil relationships in the serpentinite screes of Mt. Prinzera (Northern Apennines, Italy). *Journal of Geochemical Exploration* **64(1-3)**: 19-33.
119. **Loureiro J, Rodriguez E, Santos C, Doležal J, Suda J. 2008.** FLOWer: A Plant DNA Flow Cytometry Database (release 1.0, May 2008). <http://flower.web.ua.pt/>.
120. **Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964.** Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**: 201-220.
121. **Lugović B, Altherr R, Raczek I, Hofmann AW, Majer V. 1991.** Geochemistry of peridotites and mafic igneous rocks from the Central Dinaric Ophiolite Belt, Yugoslavia. *Contributions to Mineralogy and Petrology* **106**: 201-216.
122. **Lyon GL, Peterson PJ, Brooks RR, Butler GW. 1971.** Calcium, magnesium, and trace elements in a New Zealand serpentine flora. *Journal of Ecology* **59**: 421-429.
123. **Main JL. 1981.** Magnesium and calcium nutrition of a serpentine endemic grass. *The American Midland Naturalist Journal* **105**: 196-199.
124. **Marie D, Brown SC. 1993.** A cytometric exercise in plant DNA histograms with 2C values for 70 species. *Biology of Cell* **78**: 41-51.

125. **Marschner H, Kalish A, Romheld V. 1974.** Mechanism of iron uptake in different plant species. In: Whermann J (ed). 7<sup>th</sup> International Colloquium on Plant Analysis and Fertilizer Problems, Hannover, 273-281.
126. **Marschner H. 2002.** Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, New York.
127. **Martel E, De Nay D, Siljak-Yakovlev S, Brown S, Sarr A. 1997.** Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related Pennisetum species. *The Journal of Heredity* **88**: 139-143.
128. **Martin J, Hesemann CU. 1988.** Evaluation of improved Giemsa C – and fluorochrome banding–techniques in rye chromosome. *Heredity* **6**: 459–467.
129. **Maugini E. 1962.** Ricerche citosistematiche su *Narcissus puccinellii* Parl. (*N. jonquilla* L. x *N. poeticus* L.). *Caryologia* **15(3)**: 485–506.
130. **Millaleo R, Reyes-Díaz M, Ivanov AG, Mora ML, Alberdi M. 2010.** Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of Soil Sciences and Plant Nutrition* **10(4)**: 476-494.
131. **Mišić Lj, Lakušić R. 1990.** Livadske biljke. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd.
132. **Muratović E. 2007.** Molekularno-citogenetička diferencijacija i filogenija turskokapih ljljana Balkanskog poluostrva. Ph.D. thesis, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo.
133. **Nagy L, Proctor J. 1997.** Plant growth and reproduction on a toxic alpine ultramafic soil: Adaptation to nutrient limitation. *New Phytologist* **137**: 267–274.
134. **Nikolić T (ed). 1994-2000.** Flora Croatica, Index Florae Croaticae Suppl. 1–3, Natura Croatica.
135. **Nikolić T, Topić J. 2005.** Crvena Knjiga Vaskularne Flore Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode R H, Zagreb.
136. **Oberdorfer E. 1994.** Pflanzensoziozoologische Exkursionsflora, 7th edn., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
137. **O'Dell RE, James JJ., Richards JH. 2006.** Congeneric serpentine and nonserpentine shrubs differ more in leaf Ca:Mg than in tolerance of low N, low P, or heavy metals. *Plant and Soil* **280**:49–64.

138. **Ohri D. 1998.** Genome size variation and plant systematic. *Annals of Botany* **82**: 75-83.
139. **Olszewska MJ, Osiecka R. 1982.** The relationship between 2C DNA content, life-cycle type, systematic position, and the level of DNA endoreplication in nuclei of parenchyma cells during growth and differentiation of roots in some monocotyledonous species. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **177**: 319–336.
140. **Otto SP. 2007.** The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* **131**: 452–462.
141. **Palit S, Sharma A, Talukder G. 1994.** Effects of cobalt on plants. *The botanical review* **60(2)**: 150-181.
142. **Pamić J. 1964.** Magmatske i tektonske strukture u ultramafitima bosanske serpentinske zone. Geološki glasnik, knjiga II, posebna izdanja, Geološki Zavod u Sarajevu, Sarajevo, 5-77.
143. **Pamić J, Tomljenović B, Balen D. 2002.** Geodynamic and petrogenetic evolution of Alpine ophiolites from the central and NW Dinarides: an overview. *Lithos* **65**: 113–142.
144. **Pavlova DK. 2010.** A survey of the serpentine flora in the West Bulgarian Frontier Mts (Mt Vlahina and Mt Ograzhden). *Phytologia Balcanica* **16(1)**: 97–107.
145. **Peralta-Videa JR, Lopez ML, Narayan M, Saupe G, Gardea-Torresdey J. 2009.** The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41(8-9)**: 1665-1677.
146. **Perkin-Elmer Manual. 1996.** Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy, Perkin-Elmer, USA.
147. **Petit RJ, Brewer S, Bordács S, Burg K, Cheddadi R, Coart E, Cottrell J, Csaikl UM, Van Dam BC, Deans JD, Fineschi S, Finkeldey R, Glaz I, Goicoechea PG, Jensen JS, König AO, Lowe AJ, Madsen SF, Mátyás G, Munro RC, Popescu F, Slade D, Tabbener H, De Vries SMG, Ziegenhagen B, De Beaulieu JL, Kremer A. 2002.** Identification of refugia and postglacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest ecology and Management* **156**: 49–74.
148. **Petz B. 1981.** Osnovne statističke metode za nematematičare. OSM, Zagreb.
149. **Pichi-Sermolli R. 1948.** Flora e vegetazione delle serpentine e delle alter ofioliti del'alta valle del Trevere (Toscana). *Webbia* **6**: 1-380.

150. **Price HJ, Johnston JS. 1996.** Analysis of plant DNA content by Fuelgen micro-spectrophotometry and flow cytometry. In: Jauhur P. (ed), *Methods of Genome Analysis in Plants: Their merits and Pitfalls*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 7: 115-132.
151. **Proctor J, Nagy L. 1992.** Ultramafic rocks and their vegetation: an overview. In: The vegetation of ultramafic (serpentine) soils. Baker AJM, Proctor J, Reeves RD. (Eds), Intercept Ltd, Andover, U.K., 469–494.
152. **Proctor J, Woodell SRJ. 1975.** The ecology of serpentine soils. *Advances in Ecological Research* **9**: 255-365.
153. **Proctor J. 1999.** Toxins, nutrient shortages and droughts: The serpentine challenge. *Tree* **14**: 334–335.
154. **Rajakaruna N, Bohm BA. 1999.** The edaphic factor and patterns of variation in *Lasthenia californica* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **86**: 1576-1596.
155. **Rajakaruna N, Whitton J. 2004.** Trends in the evolution of edaphic specialists with an example of parallel evolution in the *Lasthenia californica* complex. In: Plant adaptation: Molecular Biology and Ecology. Cronk QCB, Taylor IEP, Ree R and Whitton J (eds). NRC Canada Research Press Vancouver, BC, University of British Columbia.
156. **Ramsey J, Schemske DW. 1998.** Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467–501.
157. **Redžić S. 1988.** Šumske fitocenoze i njihova staništa u uvjetima totalnih sječa. *Godišnjak Biološkog Instituta, Posebno izdanje* **41**, Sarajevo.
158. **Reeves RD. 1992.** The hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. In: Baker, AJM, Proctor J, Reeves RD (eds). *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils*. Intercept Ltd, Andover, UK, 253–278.
159. **Reeves RD, Baker AJM, Borhidi A, Berazain R. 1996.** Nickel-accumulating plants from the ancient serpentine soils of Cuba. *New Phytologist* **133**: 217–224.
160. **Reeves RD, Baker AJM, Borhidi A, Berazaín R. 1999.** Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany* **83**: 29–38.
161. **Resulović H, Čustović H. 2002.** Pedologija – opći dio. Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo.



162. **Ribeiro T, Pires B, Delgado M, Viegas W, Jones N, Morais–Cecílio L. 2004.** Evidence for ‘cross–talk’ between A and B-chromosomes of rye. *Proceedings of the Royal Society London B (Suppl.)* **271**: S482–S484.
163. **Rieseberg LH, Willis JH. 2007.** Plant speciation. *Science* **317**: 910–914.
164. **Riter-Studnička H. 1963.** Biljni pokrov na serpentinama u Bosni. *Godišnjak Biološkog Instituta Univerziteta Sarajevo* **14(1–2)**: 91–204.
165. **Robert T, Khalfallah N, Martel E, Lamy F, Poncet V, Allinne C, Remigereau MS, Rekima S, Leveugle M, Lakis G, Siljak-Yakovlev S, Sarr A. 2011.** *Pennisetum*. In: Chittaranjan K, ed. *Wild crop relatives: genomic and breeding resources*. Heilderberg, Dordrecht, London, New York: Springer, 217-255.
166. **Roberts BA, Proctor J. 1992.** *The Ecology of Areas with Serpentinized Rocks. A World View*. Kluwer Academic Publications, Dordrecht, The Netherlands.
167. **Robertson A. 2004.** Development of concepts concerning the genesis and emplacement of Tethyan ophiolites in the Eastern Mediterranean and Oman regions. *Earth-Science Reviews* **66**: 331–387.
168. **Robinson HB, Brooks RR, Kirkman HJ, Gregg HEP, Gremigni P. 1996.** Plant-available elements in soils and their influence on the vegetation over ultramafic („serpentine“) rocks in New Zeland. *Journal of the Royal Society of New Zeland* **26(4)**: 457-468.
169. **Robinson BH, Brooks RR, Kirkman JH, Gregg PEH, Alvarez HV. 1997.** Edaphic influences on a New Zealand ultramafic (“serpentine“) flora: a statistical approach. *Plant and Soil* **188**: 11–20.
170. **Sarić MR (ed). 1986.** Flora SR Srbije 10, Srpska Akademija Nauka i Umetnosti.
171. **Schweiser D. 1976.** Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58**: 307-324.
172. **Selvi F. 2007.** Diversity, geographic variation and conservation of the serpentine flora of Tuscany (Italy). *Biodiversity and Conservation* **16**: 1423–1439.
173. **Sequeira EMD, Pinto da Silva AR. 1991.** The ecology of serpentinized areas of north–east Portugal. In: Roberts BA, Proctor J. (Eds.), *The Ecology of Areas with Serpentinized Rocks. A World Review*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 169–197.

174. **Shah K, Nongkynrih JM. 2007.** Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia plantarum* **51(4)**: 618-634.
175. **Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Couland J, Stoian V, Brown SC, Zoldos V, Jelenic S, Papes D. 2002.** Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 505–512.
176. **Siljak-Yakovlev S, Solic E-M, Catrice O, Brown SC, Papes D. 2005.** Genome size and chromosome number in some *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae) from Dalmatia region. *Plant Biology* **7**: 397-404.
177. **Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Šolić EM, Bogunić F, Muratović E, Bašić N, Catrice O, Brown C. 2010.** Towards a genome size and chromosome number database of Balkan flora: C-values in 343 taxa with novel values for 242. *Advanced Science Letters* **3(2)**: 190-224.
178. **Slovak M, Vit P, Urfus T, Suda J. 2009.** Complex pattern of genome size variation in a polymorphic member of the Asteraceae. *Journal of Biogeography* **36**: 372-384.
179. **Soltis DE, Soltis PS. 1999.** Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution* **14**: 348–352.
180. **Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. 2003.** Advances in the study of polyploidy since *plant speciation*. *New Phytologist* **161**: 173–191.
181. **Stavreva-Veselinovska S, Živanović J, Đokić M. 2008.** Toxic influence of excessive concentrations of some heavy metals upon anthocyanins, flavonoids, and phenols in pepper (*Capsicum annuum*) as a vegetable. *Natura montenegrina* **7(2)**: 527-534.
182. **Stelzer R, Lehmann H, Krammer D, Luttge U. 1990.** X-Ray microprobe analysis of vacuoles of spruce needle mesophyll, endodermis and transfusion parenchyma cells at different seasons of the year. *Botanica Acta* **103**: 415-423.
183. **Steubing L. 1965.** Pflanzenökologisches Praktikum. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
184. **Stevanović V (ed). 1999.** Crvena Knjiga Flore Srbije 1. Išezli i Krajnje Ugroženi Taksoni, Grafički centar Etiketa, Beograd.
185. **Stevanović V, Tan K, Iatrou G. 2003.** Distribution of the endemic Balkan flora on serpentine I. – obligate serpentinic endemics. *Plant Systematics and Evolution* **242**: 149-170.

186. **Sumner A.T. 1990.** *Chromosome banding*. Unwin Hyman, London.
187. **Šilić Č. 1996.** Spisak biljnih vrsta (Pterydophyta i Spermatophyta) za Crvenu knjigu Bosne i Hercegovine. *Glasnik Zemaljskog Muzeja Bosne i Hercegovine (PN)* **31**: 323-367.
188. **Šugar I (ed). 1994.** Crvena Knjiga Biljnih Vrsta Republike Hrvatske. Ministarstvo graditeljstva i zaštite okoliša i Zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
189. **Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.
190. **Taiz L, Zeiger E. 1998.** Plant physiology (2<sup>nd</sup> ed.), Sinauer, Sunderland, MA.
191. **Takhtajan A. 1990.** *Numeri chromosomatum magnoliophytorum florum URSS, Aceraceae–Menyanthaceae*, 1st edition. Leningrad, Nauka, 47.
192. **Temsch EM, Temsch W, Ehrendorfer-Schratt L, Greilhuber J. 2010.** Heavy metal pollution, selection, and genome size: the species of the Žerjav study revisited with flow cytometry. *Journal of Botany*, doi:10.1155/2010/596542.
193. **Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. 2007.** Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B-chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Research* **15(6)**: 755–765.
194. **Thompson JD. 2005.** Plant Evolution in the Mediterranean. Oxford University Press.
195. **Tisdale S, Nelson WL, Beaton JD, Havlin JL. 1993.** Soil fertility and fertilizers, 5th edn. Macmillan, New York.
196. **Tucci GF, Winfield MO, D'Amato GF, Gregori C, Trombetta B, De Dominicis RI. 2004.** Genetic diversity in *Narcissus poeticus* L. and *N. radiiflorus* Salisb. (Amaryllidaceae) in two different populations: AFLP and karyological studies. *Caryologia* **57(4)**: 405–411.
197. **Tutin GT, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds.). 1992-1996.** Flora Europaea: Rosaceae to Umbelliferae 2-5, 2nd edn., Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne.
198. **Tutin TG, Burges NA, Chater AO, Edmondson JR, Heywood VH, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds). 1996.** Flora Europaea: Psilotaceae to Plantanaceae 1, 2nd edn., Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne.

199. **Uren NC. 1992.** Forms, reactions, and availability of nickel in soils. *Advances in Agronomy* **48**: 141–203.
200. **Van Tuyl JM. 1997.** Interspecific hybridization of flower bulbs: a review. In: Lilen–Kipnis H, Halevy AH, Borochoy A, eds. ISHS. Proceedings of International Symposium On Flowers Bulbs, *Acta Horticulturae* **430**, 465–476.
201. **Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C. 2002.** IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14(6)**: 1223–1233.
202. **Vidic T, Greilhuber J, Vilhar B, Dermastia M. 2009.** Selective significance of genome size in a plant community with heavy metal pollution. *Ecological Applications* **19(6)**: 1515–1521.
203. **Vinogradov AE. 2003.** “Selfish DNA is maladaptive: evidence from the plant Red List”. *Trends in Genetics* **19(11)**: 609–614.
204. **Vitosh MN, Warncke DD, Lucas RE. 1994.** Secondary and micronutrients for vegetables and field crops. Extension Bulletin E-486, Revised August 1994, Department of Crop and Soil Sciences, Michigan State University Extension. U.S.A.
205. **Vojniković S. 2006.** Sdinamske karakteristike fitocenoza kitnjaka i jele na zemljištima ofiolitske zone i perm-karbonskih formacija u Bosni. Šumarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, doktorska disertacija, Sarajevo.
206. **Wenzel WW, Bunkowski M, Puschenreiter M, Horak O. 2003.** Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution* **123(1)**: 131-138.
207. **Whittaker RH. 1954.** The vegetational responses to serpentine soils. *Ecology* **35**: 275–288.
208. **Webb DA. 1980.** *Narcissus* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds). *Flora Europaea*, Vol. 5, Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones). Cambridge: Cambridge University Press, 78–84.
209. **Wylie AP. 1952.** The history of garden narcissi. *Heredity* **6**: 137–156.
210. **Zonneveld BJM. 2008.** The systematic value of nuclear DNA content for all species of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **275**: 109–132.

**PRILOG 1.** Alfabetaska lista svojti analiziranih pomoću protočne citometrije: pripadnost porodici, lokalitet, sklonost ka supstratu (SA), tip životnog ciklusa (LCT), životna forma (LGF), broj hromosoma iz literature (2n lit), pridružen broj hromosoma (2n: \*, brojevi su determinirani u ovoj studiji), nivo ploidiije (x), 2C DNK vrijednosti u pg (standardna devijacija), 1C DNK vrijednosti u pg (u Mbp), monoploidna veličina genoma u pg (1Cx), broj analiziranih individua (N), i vrste standardi (S).

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Abies alba</i> Mill.	Pinaceae	B&H, Kladanj	I	P	P scap semp acic	24	24*	2*	35.14 (0.39)	17.57 (17183)	17.57	3	D
<i>Acer campestre</i> L.	Aceraceae	B&H, Žepče	I	P	P scap dec	26	26*	2*	1.41 (0.01)	0.71 (689)	0.71	3	A
<i>Acer monspessulanum</i> L.	Aceraceae	B&H, Rudo	F(C)	P	P scap dec	26,52	26*	2*	1.47	0.74 (719)	0.74	1	B
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	Aceraceae	B&H, Žepče	I	P	P scap dec	52	52*	4*	2.73 (0.01)	1.37 (1335)	0.68	3	A
<i>Acer tataricum</i> L.	Aceraceae	B&H, Šeher	I	P	P scap dec	26	26*	2*	1.19 (0.02)	0.60 (582)	0.60	6	B
<i>Achillea crithmifolia</i> Waldst. & Kit.	Asteraceae	B&H, Rudo	I	P	H scap	18,26,28,36	18	2	4.96 (0.08)	2.48 (2425)	2.48	3	B
<i>Achillea millefolium</i> L.	Asteraceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	18,27,36,45, 54,63,72	36	4	9.75 (0.13)	4.88 (4768)	2.44	5	C
<i>Aconitum vulparia</i> Reichb.	Ranunculaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	16	16	2	10.88 (0.10)	5.44 (5320)	5.44	5	B
<i>Aethionema saxatile</i> (L.) R.Br.	Brassicaceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	P	Ch suffrut	16,24,48			1.24 (0.01)	0.62 (606)		3	B
<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	Rosaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	28,56			2.97 (0.02)	1.49 (1452)		2	A
<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle	Simaroubaceae	B&H, Žepče	I	P	P scap dec	28,56,80			2.08 (0.01)	1.04 (1017)		3	B
<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.	Betulaceae	B&H, Žepče	F(S)	P	P scap dec	28,56	56*	4*	2.04 (0.01)	1.02 (998)	0.51	3	B

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Alnus incana</i> (L.) Moench	Betulaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	P scap dec	28	28*	2*	1.26 (0.01)	0.63 (616)	0.63	3	A
<i>Alyssum markgrafii</i> Schulz	Brassicaceae	Srb, Divčibare	O	P	Ch suffrut				1.08 (0.04)	0.54 (528)		2	B
<i>Alyssum murale</i> Waldst. et Kit.	Brassicaceae	B&H, Žepče	O(C)	P	Ch suffrut	16	16	2	1.16 (0.01)	0.58 (567)	0.58	5	A
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	Asteraceae	B&H, Žepče	I	A	T scap	36	36	2	2.35 (0.02)	1.18 (1149)	1.18	3	B
<i>Anagallis arvensis</i> L.	Myrsinaceae	Srb, Mokra Gora	I	A-B	T rept	28,40			2.46	1.23 (1203)		1	B
<i>Anchusa arvensis</i> (L.) M. Bieb.	Boraginaceae	B&H, Kladanj	I	A	T scap	48-54			9.10 (0.16)	4.55 (4450)		5	E
<i>Anchusa officinalis</i> L.	Boraginaceae	B&H, Žepče	I	P-B	H scap/H scap bienn	16	16	2	14.61 (0.33)	7.31 (7144)	7.31	3	C
<i>Andropogon ischaemum</i> L.	Poaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H caesp	40,45,50			2.41 (0.08)	1.21 (1178)		3	B
<i>Anemone nemorosa</i> L.	Ranunculaceae	B&H, Kladanj	I	P	G rhiz	16,24,30,32, 46			35.98 (0.51)	17.99 (17594)		5	E
<i>Anthemis tinctoria</i> L.	Asteraceae	B&H, Rudo	I	P	H scap	18,20			8.37 (0.04)	4.19 (4093)		3	B
<i>Anthericum liliago</i> L.	Agavaceae	B&H, Višegrad	F(C)	P	G tub	30,32,60,64			13.22 (0.10)	6.61 (6465)		3	F
<i>Aquilegia vulgaris</i> L.	Ranunculaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	H semiros	14,28	14		0.78 (0.01)	0.39 (381)		3	A
<i>Aremonia agrimonoides</i> (L.) DC	Rosaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	H ros	42	42		3.34 (0.04)	1.67 (1633)		3	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LC T	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Artemisia abrotanum</i> L.	Asteraceae	Srb, Mokra Gora	I	P	Ch suffrut	18,20,36			6.64 (0.11)	3.32 (3247)		3	D
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Asteraceae	B&H, Rudo	F(C)	P	Ch suffrut	18,36			9.42 (0.08)	4.71 (4606)		3	C
<i>Aruncus dioicus</i> (Walter) Fernald	Rosaceae	B&H, Žepče	F(S)	P	H scap	18	18	2	0.39 (0.01)	0.20 (191)	0.20	3	A
<i>Asarum europaeum</i> L.	Aristolochiaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	G rhiz/H rept semp	24,26,40			13.15 (0.23)	6.58 (6430)		5	C
<i>Asplenium adulterinum</i> Milde	Aspleniaceae	B&H, Kladanj	O	P	H ros semp/G rhiz	144	144		8.87 (0.04)	4.44 (4337)		5	B
<i>Asplenium cuneifolium</i> Viv.	Aspleniaceae	B&H, Kladanj	O	P	H ros semp/G rhiz	72,144			10.14 (0.22)	5.07 (4958)		5	F
<i>Asplenium scolopendrium</i> L.	Aspleniaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	H ros semp/G rhiz	72	72		15.93 (0.32)	7.97 (7790)		3	C
<i>Asplenium trichomanes</i> L.	Aspleniaceae	B&H, Žepče	I	P	H ros semp/G rhiz	72,144,216			8.54 (0.09)	4.27 (4176)		3	B
<i>Aster bellidiastrum</i> (L.) Scop.	Asteraceae	B&H, Mokra Gora	F(C)	P	H ros	18	18		3.50 (0.05)	1.75 (1712)		3	A
<i>Astragalus onobrychis</i> L.	Fabaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap	16,32,64	16		1.66 (0.02)	0.83 (812)		3	B
<i>Berteroa incana</i> (L.) DC	Brassicaceae	B&H, Rudo	I	P	H scap	16	16		1.29	0.65 (631)		1	A
<i>Betula pendula</i> Roth	Betulaceae	B&H, Žepče	I	P	P scap dec	28-38,42,56			0.96 (0.02)	0.48 (469)		5	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Blechnum spicant</i> (L.) Roth.	Blechnaceae	B&H, Kladanj	F(S)	P	H ros semp/G rhiz	68			12.87 (0.23)	6.44 (6293)		3	C
<i>Bromus pannonicus</i> Kumm. & Sendtn.	Poaceae	Srb, Divčibare	F(C)	P	H caesp		28*	4*	10.52 (0.23)	5.26 (5144)	2.63	5	C
<i>Bromus sterilis</i> L.	Poaceae	B&H, Višegrad	I	A-B	T caesp	14,28	14		5.96 (0.03)	2.98 (2914)		3	B
<i>Calamagrostis arundinacea</i> (L.) Roth.	Poaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H caesp	28,42,56			5.42 (0.02)	2.71 (2650)		3	A
<i>Calamintha alpina</i> ssp. <i>hungarica</i> Hayek	Lamiaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	Ch suffrut rept	18	18		1.31 (0.2)	0.66 (641)		4	B
<i>Calamintha officinalis</i> Moench.	Lamiaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap	48			0.99 (0.02)	0.50 (484)		3	A
<i>Campanula glomerata</i> L.	Campanulaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap	30,31,34,68, 90			3.61 (0.09)	1.81 (1765)		5	B
<i>Campanula patula</i> L.	Campanulaceae	B&H, Žepče	I	B	H scap bienn	20,40			2.75 (1.00)	1.38 (1345)		5	A
<i>Campanula rapunculoides</i> L.	Campanulaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	H scap	68,102			7.95 (0.04)	3.98 (3888)		2	B
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik.	Brassicaceae	B&H, Žepče	I	A	T scap semiros	16,32	32	4	0.87 (0.01)	0.44 (425)	0.22	2	A
<i>Cardamine glauca</i> Spreng.	Brassicaceae	B&H, Kladanj	F(C)	A-P	T scap/Ch herb rept	16	16	2	0.55 (0.01)	0.28 (269)	0.28	5	A
<i>Carpinus betulus</i> L.	Betulaceae	B&H, Kladanj	I	P	P scap dec	16,32,64			2.06 (0.82)	1.03 (1007)		4	B



Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Centaurea dubia</i> Suter subsp. <i>nigerscens</i> (Willd.) Hayek	Asteraceae	B&H, Kladanj	O	P	H scap	44	44	2	2.82 (0.09)	1.41 (1379)	1.41	3	A
<i>Centaurea jacea</i> L.	Asteraceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	22,44	44	4	3.80 (0.07)	1.90 (1858)	0.95	3	C
<i>Centaurea micranthos</i> Gmel. ex Hayek	Asteraceae	Srb, Divčibare	F(C)	P	H scap	36	36	4	3.04 (0.02)	1.52 (1487)	0.76	5	A
<i>Centaurea micranthos</i> Gmel. ex Hayek	Asteraceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap	36	36	4	3.01	1.51 (1472)	0.76	1	A
<i>Centaurea micranthos</i> Gmel. ex Hayek	Asteraceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap	36	18	2	1.63 (0.05)	0.82 (797)	0.82	3	A
<i>Centaurea montana</i> L.	Asteraceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H semiros	24,44,45			3.96 (0.01)	1.98 (1936)		2	A
<i>Centaureum erythraea</i> Rafn	Gentianaceae	Srb, Divčibare	I	B	H scap bienn	20,40,42			2.12 (0.01)	1.06 (1037)		2	B
<i>Cephalanthera rubra</i> (L.) Rich.	Orchidaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	G tub	36,44,48			31.28 (0.30)	15.64 (15296)		2	E
<i>Cerastium malyi</i> (Georgiev) Niketic subsp. <i>serpentina</i> (Novak) Niketic	Caryophyllaceae	B&H, Kladanj	O(C)	P	Ch herb caesp	144	144*	8*	8.57 (0.14)	4.29 (4191)	1.07	5	B
<i>Chamaecytisus hirsutus</i> (L.) Link.	Fabaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	Ch frut	96			4.09 (0.04)	2.05 (2000)		4	B
<i>Chamaenerion dodonaei</i> (Vill.) Schur ex Fuss	Onagraceae	B&H, Višegrad	I	P	H scap	36	36		1.20 (0.02)	0.60 (587)		3	A
<i>Cheilanthes marantae</i> (L.) Domin.	Sinopteridaceae	Srb, Divčibare	O	P	G rhiz/H rept semp				7.19 (0.06)	3.60 (3516)		5	C

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Chelidonium majus</i> L.	Papaveraceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	10,12,16,36			2.26 (0.02)	1.13 (1105)		3	B
<i>Chenopodium album</i> L.	Chenopodiaceae	B&H, Rudo	I	A-B	T scap	18,36,54, 108			3.52 (0.03)	1.76 (1721)		3	B
<i>Cichorium intybus</i> L.	Asteraceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	16,18,20			2.65 (0.12)	1.33 (12956)		5	B
<i>Circaea lutetiana</i> L.	Onagraceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	22	22	2	1.16 (0.02)	0.58 (567)	0.58	3	A
<i>Clematis recta</i> L.	Ranunculaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap	16	16	2	16.47 (0.16)	8.24 (8054)	8.24	5	C
<i>Clematis vitalba</i> L.	Ranunculaceae	B&H, Žepče	I	P	S lig dec	16	16	2	16.81 (0.13)	8.41 (8220)	8.41	3	C
<i>Clinopodium vulgare</i> L.	Lamiaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	20,21,26,27			0.89 (0.01)	0.45 (435)		3	A
<i>Colchicum autumnale</i> L.	Colchicaceae	B&H, Rudo	I	P	G bulb	24,36,38,42			10.44 (0.23)	5.22 (5105)		5	C
<i>Conocephalum conicum</i> (L.) Underw.	Conocephalaceae	B&H, Žepče	X	P	X	16,18			0.78 (0.01)	0.39 (381)		5	A
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Convolvulaceae	B&H, Žepče	I	P	G rhiz/H rept	24,48,50,78			1.33 (0.04)	0.67 (650)		3	B
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Convolvulaceae	B&H, Žepče	I	P	G rhiz/H rept	24,48,50,78			2.92 (0.03)	1.46 (1428)		3	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Convolvulus cantabricus</i> L.	Convolvulaceae	B&H, Višegrad	F(C)	P	H scap	22,30			2.21 (0.03)	1.11 (1081)		3	B
<i>Cornus sanguinea</i> L.	Cornaceae	B&H, Žepče	I	P	P caesp dec	22	22	2	2.31 (0.01)	1.16 (1130)	1.16	3	B
<i>Coronilla varia</i> L.	Fabaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	H scap	24,48	24	2	1.62	0.81 (792)	0.81	1	B
<i>Coronilla varia</i> L.	Fabaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	24,48	48	4	3.36 (0.01)	1.68 (1643)	0.84	5	A
<i>Corylus avellana</i> L.	Betulaceae	B&H, Kladanj	I	P	P caesp dec	22,44	22	2	0.85 (0.02)	0.43 (416)	0.43	3	A
<i>Cotinus coggygria</i> Scop.	Anacardiaceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	P	P caesp dec	30	30		0.66 (0.02)	0.33 (323)		3	A
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	Rosaceae	B&H, Žepče	I	P	P caesp dec	32,34,51	34	2	1.52 (0.04)	0.76 (743)	0.76	1 0	B
<i>Crocus vernus</i> (L.) Hill.	Iridaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	G bulb	8,15,16,17, 18,19,20			9.42 (0.09)	4.71 (4606)		3	B
<i>Cruciata glabra</i> (L.) Ehrend	Rubiaceae	B&H, Žepče	F(S)	P	H scap	22,44	22	2	1.44 (0.02)	0.72 (704)	0.72	5	A
<i>Cytisus ciliatus</i> Wahlenb.	Fabaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	Ch frut				4.14 (0.03)	2.07 (2024)		5	B
<i>Cytisus heuffelii</i> Wierzb. ex Griseb. & Schenk	Fabaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	Ch frut				2.25 (0.02)	1.13 (1100)		5	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Dactylis glomerata</i> L.	Poaceae	B&H, Višegrad	I	P	H caesp	14,28,40-42			8.44 (0.20)	8.44 (4127)		4	B
<i>Dactylorhiza maculata</i> (L.) Soó	Orchidaceae	B&H, Kladanj	I	P	G tub	40,41,60,78, 80	40*	2*	6.80 (0.16)	3.40 (3325)	3.4	5	C
<i>Daphne blagayana</i> Freyer	Thymelaeaceae	B&H, Kladanj	O(C)	P	Ch frut rept	18	18	2	4.70 (0.04)	2.35 (2298)	2.35	5	B
<i>Daphne mezereum</i> L.	Thymelaeaceae	B&H, Kladanj	I	P	NP caesp dec	18	18	2	6.05 (0.07)	3.03 (2958)	3.03	5	B
<i>Daphne mezereum</i> L.	Thymelaeaceae	B&H, Kladanj	I	P	NP caesp dec	18			8.8	4.40 (4303)		1	B
<i>Daucus carota</i> L.	Apiaceae	B&H, Žepče	I	P-B	H scap/H scap bienn	18,22			1.04 (0.01)	0.52 (509)		3	A
<i>Dianthus armeria</i> L.	Caryophyllaceae	B&H, Rudo	I	A-B	T scap/H scap bienn	30	30		1.10 (0.02)	0.55 (538)		3	A
<i>Dianthus carthusianorum</i> L.	Caryophyllaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap	30,60	30	2	1.01 (0.01)	0.51 (494)	0.51	5	A
<i>Dianthus petraeus</i> Waldst. & Kit.	Caryophyllaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	Ch suffrut caesp	30,60,90	60	4	2.17 (0.04)	1.09 (1061)	0.54	5	A
<i>Dictamnus albus</i> L.	Rutaceae	B&H, Višegrad	F(C)	P	H scap	30,36,72			6.14 (0.07)	3.07 (3002)		2	A
<i>Digitalis grandiflora</i> Mill.	Scrophulariaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	56	56*		2.56 (0.03)	1.28 (1252)		3	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.	Scrophulariaceae	B&H, Rudo	I	P	H scap	48,56	56		2.85 (0.05)	1.43 (1394)		3	A
<i>Doronicum germanicum</i> (Greml.) Rouy	Asteraceae	B&H, Rudo	F(C)	P	Ch suffrut				2.11 (0.05)	1.06 (1032)		2	B
<i>Dorycnium herbaceum</i> Vill.	Fabaceae	Srb, Divčibare	F(C)	P	Ch suffrut	14	14	2	2.04 (0.02)	1.02 (998)	1.02	5	B
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop. <i>germanicum</i> (Greml.) Rikli	Fabaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	Ch suffrut	14	14	2	2.06 (0.02)	1.03 (1007)	1.03	5	B
<i>Echinops sphaerocephalus</i> L.	Asteraceae	B&H, Rudo	I	P	H scap	30,32	30	2	7.48 (0.23)	3.74 (3658)	3.74	3	B
<i>Echium italicum</i> L.	Boraginaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap ros	16,32			2.01 (0.05)	1.01 (983)		3	B
<i>Echium rubrum</i> Jacq.	Boraginaceae	B&H, Žepče	O(C)	P	H scap	12,24			3.03 (0.08)	1.52 (1482)		4	A
<i>Echium vulgare</i> L.	Boraginaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap ros	16,32,34			1.65 (0.03)	0.81 (807)		3	B
<i>Epimedium alpinum</i> L.	Berberidaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	G rhiz/H semitros semp	12	12	2	8.19 (0.12)	4.10 (4005)	4.10	5	B
<i>Equisetum pratense</i> Ehrh.	Equisetaceae	B&H, Žepče	F(S)	P	G rhiz/H scap				25.56 (0.02)	12.78 (12499)		3	F
<i>Erica herbacea</i> L.	Ericaceae	B&H, Žepče	O(C)	P	Ch frut caesp	24	24	2	1.34 (0.03)	0.67 (655)	0.67	5	B

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér. ex Aiton	Geraniaceae	B&H, Žepče	I	A-B	T ros/H ros bienn	20-40			2.39 (0.02)	1.20 (1169)		3	B
<i>Erysimum diffusum</i> Ehrh.	Brassicaceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	P	H scap	14,28,32,42, 56,70			1.75 (0.02)	0.88 (856)		3	A
<i>Euonymus europaeus</i> L.	Celastraceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	P caesp dec	64	64	4	1.88 (0.02)	0.94 (919)	0.47	5	B
<i>Euonymus verrucosus</i> Scop.	Celastraceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	P caesp dec	32	32	2	0.67 (0.01)	0.34 (328)	0.34	5	A
<i>Euphorbia cyparissias</i> L.	Euphorbiaceae	Srb, Divčibare	I	P	H scap	20,36,40,42, 50			3.31 (0.02)	1.66 (1619)		5	A
<i>Euphorbia glabriflora</i> Vis.	Euphorbiaceae	B&H, Rudo	O(C)	P	Ch frut	14			2.78 (0.02)	1.39 (1359)		2	A
<i>Euphorbia montenegrina</i> (Bald.) K. Maly ex Rohlena	Euphorbiaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	H scap				1.56 (0.03)	0.78 (763)		5	A
<i>Euphrasia illyrica</i> Wettst.	Orobanchaceae	B&H, Rudo	I	A	T scap				2.10 (0.02)	1.05 (1027)		3	B
<i>Fagus sylvatica</i> L.	Fagaceae	B&H, Žepče	I	P	P scap dec	22,24	24	2	1.08 (0.02)	0.54 (528)	0.54	3	A
<i>Fallopia dumetorum</i> (L.) Holub.	Polygonaceae	B&H, Rudo	I	A-B	T scand	20			1.53 (0.01)	0.77 (748)		3	A
<i>Filipendula hexapetala</i> Gilib. ex Maxim.	Rosaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	14	14	2	0.79 (0.01)	0.40 (386)	0.40	4	A
<i>Fragaria vesca</i> L.	Rosaceae	B&H, Žepče	I	P	H rept	14,35			0.54 (0.01)	0.27 (264)		3	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Frangula alnus</i> Mill.	Rhamnaceae	B&H, Maglaj	I	P	P caesp dec	20,22,26	20	2	0.66 (0.01)	0.33 (323)	0.33	5	A
<i>Fraxinus ornus</i> L.	Oleaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	P scap dec	46	46*	2*	1.95 (0.02)	0.98 (954)	0.98	3	B
<i>Fumana bonapartei</i> Maire & Petitm.	Cistaceae	B&H, Rudo	O	P	Ch suffrut				2.42 (0.03)	1.21 (1183)		3	B
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	Asteraceae	B&H, Žepče	I	A	T scap	16,24,32,36	16	2	1.51 (0.02)	0.76 (738)	0.76	3	A
<i>Galium austriacum</i> Jacq.	Rubiaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	22,44			3.58 (0.03)	1.79 (1750)		5	A
<i>Galium mollugo</i> L.	Rubiaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	22,44,66,88			1.98 (0.02)	0.99 (968)		5	B
<i>Genista januensis</i> Viv.	Fabaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	Ch frut rept	48	48	2	1.71 (0.38)	0.86 (836)	0.86	5	B
<i>Genista ovata</i> Waldst. & Kit.	Fabaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	Ch frut	48	48	2	2.13 (0.02)	1.07 (1042)	1.07	5	B
<i>Genista pilosa</i> L.	Fabaceae	B&H, Kladanj	I	P	Ch frut rept	20-24,43-45			2.07 (0.01)	1.04 (1012)		5	B
<i>Genista tinctoria</i> L.	Fabaceae	B&H, Kladanj	I	P	Ch frut	48,96	96	4	3.34 (0.06)	1.67 (1633)	0.84	5	B
<i>Gentiana asclepiadea</i> L.	Gentianaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap	32,36,44			6.16 (0.02)	3.08 (3012)		5	C
<i>Geranium sanguineum</i> L.	Geraniaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	H semiros	56,82,84			8.38 (0.19)	4.19 (4098)		3	E

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Geum urbanum</i> L.	Rosaceae	B&H, Žepče	I	P	H ros	21,42	42		3.01 (0.01)	1.51 (1472)		3	A
<i>Gypsophila spergulifolia</i> Griseb.	Caryophyllaceae	Srb, Divčibare	O	P	Ch herb rept				0.99 (0.01)	0.50 (484)		5	B
<i>Halacsya sendtneri</i> (Boiss.) Dorfl	Boraginaceae	B&H, Žepče	O	P	H caesp		22*	2	2.60 (0.03)	1.30 (1271)	1.30	5	A
<i>Hedera helix</i> L.	Araliaceae	B&H, Žepče	I	P	S lig semp	48-96	48	4	2.95 (0.01)	1.48 (1443)	0.74	3	A
<i>Helianthemum nummularium</i> Mill.	Cistaceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	P	Ch suffrut	20,22,32			6.31 (0.10)	3.16 (3086)		3	D
<i>Helianthemum nummularium</i> Mill.	Cistaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	Ch suffrut	20,22,32			1.78 (0.02)	0.89 (870)		3	B
<i>Helleborus odorus</i> W. et K.	Ranunculaceae	B&H, Žepče	I	P	G rhiz	32	32	2	27.20 (0.46)	13.60 (13301)	13.6	3	F
<i>Heracleum sphondylium</i> L.	Apiaceae	B&H, Žepče	I	P	H semiros	22	22	2	4.28 (0.11)	2.14 (2093)	2.14	2	B
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Poaceae	B&H, Višegrad	I	P	T caesp	14,28,70	28	4	18.31 (0.42)	9.16 (8954)	4.58	3	E
<i>Humulus lupulus</i> L.	Cannabaceae	B&H, Rudo	I	P	H scand	20,21,40			5.39 (0.05)	2.70 (2636)		3	B
<i>Hypericum barbatum</i> Jacq.	Clusiaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap	14	14	2	1.21 (0.05)	0.61 (592)	0.61	5	A
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Clusiaceae	B&H, Rudo	I	P	H scap	16,32,36,48			0.78 (0.01)	0.39 (381)		3	A



Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Iris bosniaca</i> (Beck) Dörfl.	Iridaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	G rhiz	24	24*	2*	12.04 (0.23)	6.02 (5888)	6.02	5	F
<i>Iris rubromarginata</i> Baker	Iridaceae	FYROM, Pčinja canyon	F(C)	P	G rhiz	16,24	24*	2*	13.21 (0.55)	6.61 (6460)	6.61	5	F
<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	B&H, Rudo	I	P	P scap dec	32,36,64			1.28 (0.01)	0.64 (626)		3	A
<i>Juniperus communis</i> L.	Cupressaceae	B&H, Kladanj	I	P	P caesp acic semp	22	22	2	20.49 (0.06)	10.25 (10020)	10.25	3	E
<i>Juniperus excelsa</i> Wild.	Cupressaceae	FYROM, Pčinja canyon	F(C)	P	P scap semp	22	22	2	22.46	11.23 (10983)	11.23	1	F
<i>Knautia dinarica</i> (Murb.) Borbas	Dipsacaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap semiros	20,40	20	2	1.27 (0.02)	0.64 (621)	0.64	3	B
<i>Lactuca perennis</i> L.	Asteraceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H semiros	18	18	2	4.61 (0.01)	2.31 (2254)	2.31	3	E
<i>Lamium orvala</i> L.	Lamiaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	18	18	2	2.65 (0.01)	1.33 (1296)	1.33	3	A
<i>Laserpitium marginatum</i> W.K.	Apiaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap				3.94 (0.05)	1.97 (1927)		5	A
<i>Lasiagrostis calamagrostis</i> (L.) Link	Poaceae	B&H, Višegrad	F(C)	P	H caesp				1.74 (0.06)	0.87 (851)		2	B
<i>Lathyrus latifolius</i> L.	Fabaceae	B&H, Kladanj	I	P	H rept	14	14	2	17.12 (0.03)	8.56 (8372)	8.56	3	C
<i>Lathyrus megalanthus</i> Stud.	Fabaceae	B&H, Rudo	I	P	H rept	14	14	2	17.57 (0.43)	8.79 (8592)	8.79	3	D

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Lathyrus pannonicus</i> (Jacq.) Garcke	Fabaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	H scap/G tub	14	14	2	20.80 (0.31)	10.40 (1017)	10.40	3	D
<i>Lathyrus pratensis</i> L.	Fabaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	9,14,16,21, 28			11.32 (0.09)	5.66 (5535)		3	C
<i>Lavatera thuringiaca</i> L.	Malvaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	40,42,44,46			6.80 (0.10)	3.40 (3325)		3	C
<i>Leontodon crispus</i> Vill.	Asteraceae	Srb, Divčibare	F(C)	P	H ros	8,14			2.06 (0.03)	1.03 (1007)		5	B
<i>Leucanthemum vulgare</i> Lam.	Asteraceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	18,36,72,90	72*	8*	32.69 (0.46)	16.35 (15985)	4.09	5	B
<i>Leucanthemum vulgare</i> Lam.	Asteraceae	B&H, Rudo	I	P	H scap	18,36,72,90	18*	2*	10.54 (0.02)	5.27 (5154)	5.27	2	B
<i>Leucanthemum vulgare</i> Lam.	Asteraceae	B&H, Rudo	I	P	H scap	18,36,72,90	36*	4*	20.20 (0.03)	10.10 (9878)	5.50	2	B
<i>Ligustrum vulgare</i> L.	Oleaceae	B&H, Kladanj	I	P	P caesp dec	46,72	72		3.05 (0.02)	1.53 (1491)		3	A
<i>Lilium bosniacum</i> (G. Beck) G. Beck ex Fritsch	Liliaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	G bulb	24	24+1-4 B hr.*	2*	67.85 (1.23)	33.93 (33179)	33.93	5	F
<i>Lilium martagon</i> L.	Liliaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	G bulb	24	24+1-4 B hr.*	2*	83.71 (1.00)	41.59 (4067)	41.59	5	F
<i>Linaria concolor</i> Gris. var. <i>rubioides</i> (Vis. et Panč.) Maly	Scrophulariaceae	Srb, Mokra Gora	O(C)	P	Ch suffrut				1.72 (0.02)	0.86 (841)		3	B

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Linaria vulgaris</i> Mill.	Scrophulariaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	12	12	2	1.74 (0.01)	0.87 (851)	0.87	3	B
<i>Linum bienne</i> Miller	Linaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	18,30,32			1.17 (0.01)	0.59 (572)		5	A
<i>Linum tenuifolium</i> L.	Linaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap	16,18,36			5.21 (0.09)	2.61 (2548)		3	B
<i>Lithospermum officinale</i> L.	Boraginaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap	28,30,56			1.52 (0.05)	0.76 (743)		3	B
<i>Lonicera caprifolia</i> L.	Caprifoliaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	S lig dec	18	18	2	0.99 (0.01)	0.50 (484)	0.50	2	A
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Fabaceae	Srb, Divčibare	I	P	H scap	12,24,36	24	4	2.37 (0.04)	1.19 (1159)	0.60	5	B
<i>Lunaria rediviva</i> L.	Brassicaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	H scap	28,30			0.73 (0.01)	0.37 (357)		3	A
<i>Luzula nemorosa</i> (Pollich) E.Mey.	Juncaceae	B&H, Kladanj	I	P	H caesp	12,24			1.80 (0.01)	0.90 (880)		4	B
<i>Lychmis flos-cuculi</i> L.	Caryophyllaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	24	24	2	5.46 (0.03)	2.73 (2670)	2.73	4	B
<i>Lysimachia nummularia</i> L.	Myrsinaceae	B&H, Rudo	I	P	Ch herb rept	30,32,36,43, 44,45			3.18 (0.02)	1.59 (1555)		3	B
<i>Malus sylvestris</i> Mill.	Rosaceae	B&H, Kladanj	I	P	P scap dec	34,51			1.55 (0.04)	0.78 (758)		3	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Malva alcea</i> L.	Malvaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	H scap	78,84			2.65 (0.03)	1.33 (1296)		3	C
<i>Malva moschata</i> L.	Malvaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	H scap	40,42,44			2.71 (0.07)	1.36 (1325)		3	A
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Asteraceae	Srb, Mokra Gora	I	A-B	T scap	18, 35,36,37			5.48 (0.03)	2.92 (1856)		3	D
<i>Medicago sativa</i> L.	Fabaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	16,32,48,64	32	4	3.44 (0.10)	1.72 (1682)	0.86	3	B
<i>Melampyrum pratense</i> L.	Orobanchaceae	B&H, Rudo	I	A-B	T scap	18	18	2	14.87 (0.12)	7.44 (7271)	7.44	3	D
<i>Melica ciliata</i> L.	Poaceae	Srb, Divčibare	F(C)	P	H caesp	18,20,30,36			4.66 (0.17)	2.33 (2279)		4	C
<i>Melilotus albus</i> Medik.	Fabaceae	B&H, Žepče	I	A	T scap	16,24,36	16	2	2.47 (0.02)	1.24 (1208)	1.24	3	B
<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Lam.	Fabaceae	B&H, Kladanj	I	B	H scap bienn	16	16	2	2.35 (0.01)	1.18 (1149)	1.18	3	B
<i>Melittis melissophyllum</i> L.	Lamiaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap	24,30,31,32	30*	2*	0.95 (0.03)	0.48 (465)	0.48	2	B
<i>Mentha arvensis</i> L.	Lamiaceae	B&H, Višegrad	I	P	H scap	36,64,72,84, 90,98,108			0.90	0.45 (440)		1	A
<i>Mercurialis perennis</i> L.	Euphorbiaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	G rhiz/H scap semp	42-112			3.05 (0.03)	1.53 (1491)		3	A
<i>Minuartia verna</i> (L.) Hiern ssp. <i>collina</i> (Neilr.) Domin	Caryophyllaceae	B&H, Žepče	I	P	Ch herb caesp rept				1.79 (0.01)	0.90 (875)		5	B

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Narcissus poeticus</i> L.	Amaryllidaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	G bulb	14,21	14+B*	2*	24.33 (0.14)	12.17 (11897)	12.17	5	F
<i>Narcissus poeticus</i> L.	Amaryllidaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	G bulb	14,21	21*	3*	34.55	17.28 (16895)	11.52	1	C
<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop.	Fabaceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	P	H scap	22,28			2.62 (0.04)	1.31 (1281)		3	A
<i>Ononis spinosa</i> L.	Fabaceae	B&H, Višegrad	I	P	Ch suffrut	30,32,60			2.85 (0.03)	1.43 (1394)		2	A
<i>Onosma arenaria</i> Waldst. & Kit.	Boraginaceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	P	H scap	12,20			5.61 (0.08)	2.81 (2743)		3	F
<i>Orchis purpurea</i> Huds.	Orchidaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	G tub	40,42			11.59 (0.15)	5.80 (5668)		2	A
<i>Orlaya grandiflora</i> (L.) Hoffm.	Apiaceae	B&H, Rudo	I	A	T scap	20,22			2.10 (0.02)	1.05 (1027)		3	B
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop.	Betulaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	P scap dec	16	16	2	0.85 (0.03)	0.43 (416)	0.43	3	A
<i>Oxalis acetosella</i> L.	Oxalidaceae	B&H, Žepče	I	P	G rhiz	22,24,28,30			5.31 (0.04)	2.66 (2597)		3	B
<i>Papaver rhoeas</i> L.	Papaveraceae	B&H, Višegrad	I	A	T scap	14,15,21,28	14	2	4.81 (0.03)	2.41 (2352)	2.41	3	B
<i>Parnassia palustris</i> L.	Parnassiaceae	B&H, Kladanj	I	P	H ros	18,27,36,45, 54			2.35 (0.04)	1.18 (1149)		5	B

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Petrorhagia saxifraga</i> (L.) Link	Caryophyllaceae	Srb, Divčibare	F(C)	P	Ch herb caesp	30,60	30		0.89 (0.01)	0.45 (435)		5	A
<i>Peucedanum oreoselinum</i> (L.) Moench	Apiaceae	B&H, Kladanj	F(S)	P	H scap	22	22	2	6.48 (0.05)	3.24 (3169)	3.24	5	B
<i>Physalis alkekengi</i> L.	Solanaceae	B&H, Višegrad	I	P	H scap	24	24	2	5.10 (0.06)	2.55 (2494)	2.55	3	B
<i>Phyteuma spicatum</i> L.	Campanulaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap	22,24,36			2.54 (0.02)	1.27 (1242)		4	B
<i>Picea abies</i> (L.) Karst.	Pinaceae	B&H, Kladanj	I	P	P scap acic semp	24,36	24*	2*	37.69 (0.23)	18.85 (18430)	18.85	3	E
<i>Pinus nigra</i> Arnold subsp. <i>nigra</i> Arnold	Pinaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	P scap acic semp	24	24*	2*	43.91 (0.52)	21.96 (21472)	21.96	3	F
<i>Pinus sylvestris</i> L.	Pinaceae	B&H, Kladanj	I	P	P scap acic semp	24,36,48	24*	2*	43.68 (1.03)	21.84 (21360)	21.84	5	F
<i>Plantago holosteum</i> Scop.	Plantaginaceae	Srb, Divčibare	O(C)	P	H caesp	12			2.68 (0.02)	1.34 (1310)		5	A
<i>Plantago lanceolata</i> L.	Plantaginaceae	B&H, Žepče	I	P	H ros	12,13,14,24, 96			2.65 (0.01)	1.33 (1296)		3	A
<i>Plantago major</i> L.	Plantaginaceae	B&H, Žepče	I	P	H ros	12,18,24,32	12*	2*	1.51 (0.01)	0.76 (738)	0.76	3	A
<i>Platanthera bifolia</i> (L.) Rich.	Orchidaceae	B&H, Kladanj	I	P	G tub	16,40,42	42*	2*	13.74 (0.10)	6.87 (6719)	6.87	5	C

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Polygala major</i> Jacq.	Polygalaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	34			1.07 (0.03)	0.54 (523)		5	B
<i>Polygala supina</i> Schreb.	Polygalaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	Ch suffrut rept				1.79 (0.04)	0.90 (875)		2	B
<i>Polygonatum odoratum</i> (Mill.) Druce	Convallariaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	G rhiz	16,18,20,22, 24,30,40	18*	2*	19.66 (0.84)	9.83 (9614)	9.83	5	F
<i>Polygonum aviculare</i> L.	Polygonaceae	B&H, Kladanj	I	A	T rept	20,22,30,40, 50,60	40	4	1.61 (0.01)	0.81 (787)	0.40	4	B
<i>Polypodium vulgare</i> L.	Polypodiaceae	B&H, Žepče	I	P	H ros semp/G rhiz	74,148			39.73 (0.74)	19.87 (19428)		5	F
<i>Populus nigra</i> L.	Salicaceae	B&H, Rudo	I	P	P scap dec	38,57	38	2	0.97 (0.01)	0.49 (474)	0.49	3	A
<i>Populus tremula</i> L.	Salicaceae	B&H, Žepče	I	P	P scap dec	38,56	38	2	0.90 (0.02)	0.45 (440)	0.45	5	A
<i>Potentilla alba</i> L.	Rosaceae	B&H, Kladanj	O(C)	P	H ros	28	28*	4*	1.44 (0.06)	0.72 (704)	0.36	5	B
<i>Potentilla erecta</i> (L.) Raeusch.	Rosaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	14,18,21,28, 35,38			1.48 (0.03)	0.74 (724)		5	A
<i>Potentilla malyana</i> Borbas	Rosaceae	B&H, Kladanj	O	P	H scap				1.13 (0.07)	0.57 (553)		5	B
<i>Potentilla reptans</i> L.	Rosaceae	B&H, Žepče	I	P	Ch herb rept/H rept	20,28,42			2.85 (0.03)	1.43 (1394)		3	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Primula veris</i> L. subsp. <i>columnnae</i> (Ten.) Ludi	Primulaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H ros	22,24			0.98 (0.02)	0.49 (479)		5	A
<i>Primula vulgaris</i> Huds.	Primulaceae	B&H, Žepče	I	P	H ros	22	22	2	0.99 (0.02)	0.50 (484)	0.50	3	A
<i>Prunella vulgaris</i> L.	Lamiaceae	B&H, Žepče	I	P	H semiros	28,32			1.39 (0.01)	0.70 (680)		3	A
<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Rosaceae	B&H, Kladanj	I	P	P scap dec	16,24,32			0.86 (0.03)	0.43 (421)		3	A
<i>Prunus mahaleb</i> L.	Rosaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	P scap dec	16	16	2	0.70 (0.03)	0.35 (342)	0.35	4	A
<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn	Dennstaedtiaceae	B&H, Žepče	F(S)	P	G rhiz	104			14.82 (0.08)	7.41 (7247)		2	E
<i>Pulmonaria officinalis</i> L.	Boraginaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	H scap semiros	14,16,24			3.07 (0.02)	1.54 (1501)		3	A
<i>Pyrus communis</i> L.	Rosaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	P scap dec	34,51	34	2	1.24 (0.01)	0.62 (606)	0.62	3	A
<i>Pyrus piraster</i> Burgsd.	Rosaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	P scap dec	34	34	2	1.24	0.62 (606)	0.62	1	A
<i>Quercus cerris</i> L.	Fagaceae	B&H, Rudo	I	P	P scap dec	22,24	24	2	1.72 (0.05)	0.86 (841)	0.86	3	B
<i>Quercus frainetto</i> Ten.	Fagaceae	B&H, Rudo	I	P	P scap dec	24	24	2	1.79 (0.02)	0.90 (875)	0.90	3	B



Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.	Fagaceae	CRO, Đakovo	I	P	P scap dec	24,25,27	24*	2*	1.81 (0.02)	0.91 (885)	0.91	3	B
<i>Quercus robur</i> L.	Fagaceae	B&H, Rudo	I	P	P scap dec	24,36	24*	2*	1.78 (0.02)	0.89 (870)	0.89	3	B
<i>Ramonda nathaliae</i> Pancic et Petrovic	Gesneriaceae	FYROM, Pčinja canyon	F(C)	P	H ros semp	48	48*	2*	2.26 (0.01)	1.13 (1105)	1.13	5	C
<i>Reseda lutea</i> L.	Resedaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	H scap	24,48			1.98 (0.03)	0.99 (968)		3	B
<i>Rhamnus cathartica</i> L.	Rhamnaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	P caesp dec	24			1.15 (0.01)	0.58 (562)		3	A
<i>Rhinanthus rumelicus</i> Vel.	Scrophulariaceae	B&H, Rudo	I	A-B	T scap				2.71 (0.03)	1.36 (1325)		3	A
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Fabaceae	B&H, Žepče	I	P	P scap dec	20,22			1.48 (0.03)	0.74 (724)		3	B
<i>Rorippa sylvestris</i> (L.) Bess.	Brassicaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap semiros	32,40,48			0.95 (0.01)	0.48 (465)		3	B
<i>Rosa pendulina</i> L.	Rosaceae	B&H, Kladanj	I	P	Ch frut	28			2.05 (0.04)	1.03 (1002)		5	B
<i>Rubus hirtus</i> Waldst. & Kit.	Rosaceae	B&H, Žepče	I	P	Ch frut rept	28			1.33 (0.02)	0.67 (650)		5	A
<i>Rubus idaeus</i> L.	Rosaceae	B&H, Kladanj	I	P	Ch frut	14,21,28,35, 42			0.63	0.32 (308)		1	B

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Rumex acetosella</i> L.	Polygonaceae	B&H, Rudo	F(S)	P	H scap	14,21,28,35, 42			1.60 (0.04)	0.80 (782)		3	A
<i>Ruscus hypoglossum</i> L.	Ruscaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	Ch frut semp	40	40	2	17.20 (0.17)	8.60 (8411)	8.60	3	E
<i>Salix caprea</i> L.	Salicaceae	B&H, Žepče	I	P	P caesp dec/P scap dec	38,57,76	38	2	0.90 (0.03)	0.45 (440)	0.45	3	A
<i>Salix elaeagnos</i> Scop.	Salicaceae	B&H, Višegrad	I	P	P caesp dec	38	38	2	0.87 (0.03)	0.44 (425)	0.44	3	A
<i>Salix purpurea</i> L.	Salicaceae	B&H, Rudo	I	P	P caesp dec	38	38	2	0.86 (0.03)	0.43 (421)	0.43	3	A
<i>Salvia glutinosa</i> L.	Lamiaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap semiros	16,18,32	32*	4*	2.24 (0.03)	1.12 (1095)	0.56	3	B
<i>Sambucus ebulus</i> L.	Caprifoliaceae	B&H, Kladanj	I	P	G rhiz	36	36	2	21.67	10.84 (10597)	10.84	1	E
<i>Sambucus nigra</i> L.	Caprifoliaceae	B&H, Žepče	I	P	P caesp dec	36,38	36	2	26.36 (0.36)	13.18 (12890)	13.18	3	E
<i>Sambucus racemosa</i> L.	Caprifoliaceae	B&H, Kladanj	I	P	P caesp dec	36,38			23.02 (0.46)	11.51 (11257)		3	F
<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	Rosaceae	Srb, Divčibare	I	P	H semiros	28,54	28	4	1.12 (0.03)	0.56 (548)	0.28	5	B
<i>Sanicula europaea</i> L.	Apiaceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	P	H semiros	16	16	2	2.44	1.22 (1193)	1.22	1	B

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Saponaria officinalis</i> L.	Caryophyllaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	H scap	28	28	2	4.51 (0.01)	2.26 (2205)	2.26	3	B
<i>Scabiosa columbaria</i> L.	Dipsacaceae	Srb, Divčibare	F(C)	P	H scap semiros	16	16	2	1.87 (0.02)	0.94 (914)	0.94	5	B
<i>Scabiosa fumarioides</i> Vis. et Pančić	Dipsacaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap semiros	16	16	2	1.52 (0.02)	0.76 (743)	0.76	3	A
<i>Scabiosa leuchopylla</i> Borb.	Dipsacaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap semiros	16	16	2	1.93 (0.06)	0.97 (944)	0.97	5	B
<i>Scorzonera austriaca</i> Willd.	Asteraceae	FYROM, Pčinja canyon	F(C)	P	H ros	14	14*	2*	10.68 (0.16)	5.34 (5223)	5.34	5	B
<i>Scorzonera cana</i> (C.A. May.) Dom.	Asteraceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H ros	14,28			5.04 (0.05)	2.52 (2465)		3	B
<i>Scrophularia tristis</i> Malý	Scrophulariaceae	Srb, Mokra Gora	O	P	H scap				1.45 (0.02)	0.73 (709)		3	A
<i>Sedum acre</i> L.	Crassulaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	Ch succ	16,40,48,56, 60,80,100			1.51 (0.03)	0.76 (38)		3	A
<i>Sedum album</i> L.	Crassulaceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	P	Ch succ	32,34,51,64, 68,102,136			0.92 (0.03)	0.46 (450)		3	A
<i>Sedum maximum</i> Hoffm.	Crassulaceae	B&H, Višegrad	I	P	H scap succ	24,36,48			2.23 (0.03)	1.12 (1090)		3	E
<i>Sedum urovillei</i> DC	Crassulaceae	Srb, Divčibare	F(C)	P	Ch caesp succ	32,48,64,72, 80,96,112, 128			1.50 (0.01)	0.75 (734)		5	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Selaginella helvetica</i> (L.) Spring	Selaginellaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	Ch herb rept	18	18	2	0.28 (0.04)	0.14 (137)	0.14	5	B
<i>Sesleria latifolia</i> (Adamovic) Degen	Poaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H caesp	28	28	2	7.55 (0.66)	3.78 (3692)	3.78	5	F
<i>Silene nutans</i> L.	Caryophyllaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	H scap semiros	24	24	2	4.41 (0.05)	2.21 (2156)	2.21	3	B
<i>Silene paradoxa</i> L.	Caryophyllaceae	Srb, Divčibare	O	P	Ch suffrut	24	24	2	4.96 (0.03)	2.48 (2425)	2.48	5	B
<i>Solanum dulcamara</i> L.	Solanaceae	B&H, Žepče	I	P	S lig dec	20,22,24,26, 48,72			2.20 (0.03)	1.10 (1076)		3	B
<i>Solanum nigrum</i> L.	Solanaceae	B&H, Višegrad	I	A	T scap	24,36,48,60, 72			6.2	3.10 (3032)		1	B
<i>Solidago virgaurea</i> L.	Asteraceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	18,44	90?	10?	9.93 (0.15)	4.97 (4856)	2.49?	3	B
<i>Selaginella helvetica</i> (L.) Spring	Selaginellaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	Ch herb rept	18	18	2	0.28 (0.04)	0.14 (137)	0.14	5	B
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	Rosaceae	B&H, Žepče	I	P	P scap dec	30,33,34	34	2	1.42 (0.01)	0.71 (694)	0.71	4	A
<i>Sorbus torminalis</i> (L.) Crantz	Rosaceae	B&H, Žepče	F(C)	P	P scap dec	34	34	2	1.49 (0.02)	0.75 (729)	0.75	5	B
<i>Spiraea chamaedryfolia</i> L.	Rosaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	P caesp dec	18,32,36			0.90 (0.03)	0.45 (440)		5	B

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Spiranthes spiralis</i> (L.) Chevall.	Orchidaceae	B&H, Višegrad	F(C)	P	G tub	30	30	2	7.73	3.87 (3780)	3.87	1	A
<i>Stachys officinalis</i> (L.) Trevisian	Lamiaceae	Srb, Mokra Gora	I	P	H scap	16	16	2	9.39 (0.24)	4.70 (4592)	4.7	3	C
<i>Stachys recta</i> L. var. <i>chrysophea</i>	Lamiaceae	B&H, Kladanj	O(C)	P	H scap rept		32+B*	4*	1.83 (0.01)	0.92 (895)	0.46	5	B
<i>Stachys sylvatica</i> L.	Lamiaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	48,54,64,66			2.56 (0.03)	1.28 (1252)		5	A
<i>Stellaria graminea</i> L.	Caryophyllaceae	B&H, Rudo	I	P	H scap	26,39,40,42,5 2			1.92 (0.02)	0.96 (939)		2	B
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	Caryophyllaceae	B&H, Žepče	I	A	T rept	28,40,42,44			4.23 (0.02)	2.12 (2068)		3	B
<i>Stenactis annua</i> (L.) Cass. ex Less.	Asteraceae	B&H, Žepče	I	A	T scap	26,27			4.31 (0.01)	2.16 (2108)		3	B
<i>Symphyandra hofmannii</i> Pant.	Boraginaceae	B&H, Žepče	F(C)	A-B	H scap semiros/H scap	34	34*	2*	3.94 (0.02)	1.97 (1927)	1.97	3	A
<i>Symphytum tuberosum</i> L.	Boraginaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	G tub	32,64,96,120, 128,144			3.77 (0.04)	1.89 (1844)		5	A
<i>Tanacetum corymbosum</i> (L.) Sch. Bip.	Asteraceae	B&H, Žepče	F(C)	P	H scap	18,36,39			14.39 (0.03)	7.20 (7037)		3	E
<i>Tanacetum corymbosum</i> (L.) Sch. Bip.	Asteraceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	P	H scap	18,36,39			20.23 (0.32)	10.12 (9892)		3	D

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Taraxacum officinale</i> Wigg	Asteraceae	B&H, Žepče	I	P	H ros	8,16,24,26, 32			2.54 (0.01)	1.27 (1242)		3	B
<i>Teucrium montanum</i> L.	Lamiaceae	Srb, Divčibare	F(C)	P	Ch suffrut caesp	13,16,22,26, 28,30,35,60			0.99 (0.01)	0.50 (484)		5	B
<i>Thesium alpinum</i> L.	Santalaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	12,14			1.26 (0.01)	0.63 (616)		4	A
<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	Brassicaceae	B&H, Kladanj	O(C)	P	H scap semiros	56	14*	2*	0.99 (0.02)	0.50 (484)	0.50	5	B
<i>Thymus jankae</i> Čelak	Lamiaceae	Srb, Divčibare	O(C)	P	Ch suffrut rept	28	28	2	2.19 (0.02)	1.10 (1071)	1.10	5	B
<i>Tragopogon dubius</i> Scop.	Asteraceae	Srb, Mokra Gora	I	B	H scap bienn	12,24,36			4.55 (0.08)	2.28 (2225)		3	E
<i>Tragopogon porrifolius</i> L.	Asteraceae	Srb, Mokra Gora	F(C)	A-B	T scap/H scap bienn	12	12	2	4.33 (0.08)	2.17 (2117)	2.17	2	B
<i>Tragus racemosus</i> (L.) All.	Poaceae	B&H, Rudo	I	A-B	T caesp	20,40			1.75 (0.07)	0.88 (856)		3	B
<i>Trifolium alpestre</i> L.	Fabaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	16,20			1.56 (0.03)	0.78 (763)		5	B
<i>Trifolium dalmaticum</i> Vis.	Fabaceae	B&H, Rudo	F(C)	A	T rept	10			7.03 (0.03)	3.52 (3438)		3	B
<i>Trifolium incarnatum</i> L.	Fabaceae	B&H, Rudo	I	A	T scap	14,16			1.14	0.57 (557)		1	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Trifolium montanum</i> L.	Fabaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	16			2.54 (0.01)	1.27 (1242)		5	A
<i>Trifolium pannonicum</i> Jacq.	Fabaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	96,126,180			11.57 (0.34)	5.79 (5658)		5	B
<i>Trifolium pratense</i> L.	Fabaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	14,16,28,30	14	2	0.92 (0.01)	0.46 (450)	0.46	3	A
<i>Trifolium repens</i> L.	Fabaceae	B&H, Žepče	I	P	H rept	16,28,30,32, 48,64	32	4	2.12 (0.01)	1.06 (1037)	0.53	5	B
<i>Tussilago farfara</i> L.	Asteraceae	B&H, Žepče	I	P	G rhiz	60,72	60		3.33 (0.06)	1.67 (1628)		5	B
<i>Ulmus glabra</i> Huds.	Ulmaceae	B&H, Kladanj	I	P	P scap dec	28,42,56			3.98 (0.06)	1.99 (1946)		3	C
<i>Ulmus minor</i> Mill.	Ulmaceae	B&H, Rudo	I	P	P scap dec	28			3.71 (0.05)	1.86 (1814)		3	B
<i>Urtica dioica</i> L.	Urticaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	26,32,48,52			2.16 (0.01)	1.08 (1056)		5	B
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Ericaceae	B&H, Kladanj	I	P	Ch frut dec	20,24,48			1.17 (0.01)	0.59 (572)		3	A
<i>Valeriana montana</i> L.	Valerianaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	H scap semiros	32	64	4	2.39 (0.02)	1.20 (1169)	0.60	2	B
<i>Verbascum phoeniceum</i> Baumg.	Scrophulariaceae	B&H, Rudo	F(C)	A-B	H scap ros	32,35,36			0.81 (0.03)	0.41 (396)		3	A
<i>Veronica jacquini</i> Baumg.	Scrophulariaceae	B&H, Rudo	F(C)	P	H scap	16,48			3.40 (0.04)	1.70 (1663)		3	A

Infragenerički takson	Porodica	Lokalitet	SA	LCT	LGF	2n lit	2n	x	2C	1C	1Cx	N	S
<i>Veronica officinalis</i> L.	Scrophulariaceae	B&H, Žepče	I	P	Ch herb rept	18,34,36			2.02 (0.04)	1.01 (988)		5	B
<i>Veronica spicata</i> L.	Scrophulariaceae	Srb, Divčibare	I	P	H scap	34,36,56,68			1.44	0.72 (704)		1	B
<i>Veronica urticifolia</i> Jacq.	Scrophulariaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	18,64,128	36	4	1.23 (0.01)	0.62 (601)	0.31	5	A
<i>Veronica urticifolia</i> Jacq.	Scrophulariaceae	B&H, Kladanj	I	P	H scap	18,64,128	18	2	0.62 (0.01)	0.31 (303)	0.31	5	A
<i>Viburnum lantana</i> L.	Caprifoliaceae	B&H, Kladanj	F(C)	P	P caesp dec	18	18	2	8.17 (0.06)	4.09 (3995)	4.09	3	B
<i>Viburnum opulus</i> L.	Caprifoliaceae	B&H, Kladanj	I	P	P caesp dec	18	18	2	8.27 (0.10)	4.14 (4044)	4.14	5	B
<i>Vicia cracca</i> L.	Fabaceae	B&H, Žepče	I	P	H scap	12,14,21,22, 28,29	14	2	5.84 (0.02)	2.92 (2856)	2.92	3	C
<i>Vicia villosa</i> Roth	Fabaceae	Srb, Mokra Gora	I	A-B	T scap/H scap bienn	10,14			6.18 (0.18)	3.09 (3022)		3	A
<i>Viola beckiana</i> Fiala	Violaceae	B&H, Kladanj	O(C)	P	Ch herb caesp rept/H	20	20	2	2.69 (0.01)	1.35 (1315)	1.35	3	B
<i>Viola tricolor</i> L.	Violaceae	B&H, Kladanj	I	A-B	T scap/H scap bienn	26,28,34			3.99 (0.03)	2.00 (1951)		5	B
<i>Viscaria vulgaris</i> (Röhl.) Bernh.	Caryophyllaceae	B&H, Kladanj	F(S)	P	H scap	24	24	2	4.29 (0.06)	2.15 (2098)	2.15	4	B



---

**Napomena: Lokalitet:** B&H—Bosna i Hercegovina; FYROM—Bivša jugoslavenska republika Makedonija; SRB—Srbija. **SA—Sklonost ka supstratu:** F(C)—fakultativne vrste koje se pretežno mogu naći na krečnjaku; F(S)—fakultativne vrste koje se pretežno mogu naći na silikatima; I—indiferentne; O—obligatne; O(C)—obligatne vrste koje se veoma rijetko mogu naći i na krečnjačkoj podlozi; X—nepoznato. **LCT—Tip životnog ciklusa:** A—jednogodišnja; B—dvogodišnja; AB—jedno-dvogodišnja; AP—jedno-višegodišnja; P—višegodišnja. **LGF—Životna forma:** Ch—hamefite; G—geofite; H—hemikriptofite; P—fanerofite; T—terofite; X—nepoznato; bienn—dvogodišnji; bulb—bulbosus, sa lukovicama, lukovičast; caesp—caespitosus, busenast; dec—deciduous, listopadni; frut—fruticosus, nisko žbunast; herb—herbosus, zeljast; P caesp—žbunovi; P scap—drveće; rept—reptans, puzeći; rhiz—rhizomatosus, sa rizomima; ros—rosulatus, rozetast; scand—scandens, penjajući; scap—scaposus, s uspravnim stablom; semiros—semirosulatus, polurozetast; semp—sempervirens, vječnozeleni; succ—succulentus, mesnati; suffrut—suffruticosus, poluodrvljenjeli; tub—tuberosus, krtolast, gomoljast. **2n\***—Hromosomski brojevi su determinirani u ovom radu; svi ostali (bez zvjezdice) su preuzeti iz relevantne literature. **1 pg**—1 pg = 978 Mbp (Doležel *et al.* 2003). **S—Vrsta standard za kalibraciju:** A—*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 'Roma'; B—*Petunia hybrida* (Hook) Vilm. cv. 'PxPC6'; C—*Pisum sativum* L. cv. 'Long Express'; D—*Hordeum vulgare* L. cv. 'Sultan'; E—*Artemisia arborescens* L. cv. 'Crete'; F—*Triticum aestivum* L. cv. 'Chinese Spring'.