UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Katarina V. Hočevar

Evoluciono-ekološki odgovori prirodnih populacija *Iris pumila* L. na eksperimentalno povećanje temperature *in situ*

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Katarina V. Hočevar

Evolutionary-ecological responses of natural populations of *Iris pumila* L. to experimental warming *in situ*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026.

Mentori:

_____

dr Sanja Manitašević Jovanović, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”-
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

_____

dr Tijana Cvetić Antić, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

_____

dr Dragana Cvetković, vanredni profesor u penziji
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

_____

dr Aneta Sabovljević, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

_____

dr Ana Vuleta, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković“-
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ceci, Dulu, Ukiju i Simi

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratoriji Odeljenja za evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru projekta 173007 ''Evolucija u laboratoriji i adaptacije u prirodi'' (rukovodilac dr Branka Tucić) i plana rada Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, a na osnovu ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO (ev. broj 451-03-68/2020-14/200007; 451-03-9/2021-14/200007; 451-03-68/2022-14/200007; 451-03-47/2023-01/200007; 451-03-66/2024-03/200007; 451-03-136/2025-03/200007; 451-03-33/2026-03/200007).

* * *

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Sanji Manitašević Jovanović, koja je tokom gotovo deset godina zajedničkog rada imala neprocenjivu ulogu u mom naučnom i ličnom razvoju. Zahvalna sam joj na znanju i iskustvu koje je nesebično delila sa mnom, uloženom trudu, podršci, razumevanju i ogromnom strpljenju, naročito kada nije sve išlo po planu. Njena izuzetna pedantnost, preciznost, temeljnost i posvećenost nauci predstavljaju mi uzor u istraživačkom radu. Podjednako joj se divim i kao čoveku, zbog njene doslednosti, osećaja za pravdu, spremnosti da se zauzme za druge i integriteta. Posebno sam joj zahvalna na poverenju i slobodi koje mi je pružila da tokom poslednjih godina postepeno pronađem sopstveni način rada i steknem veću samostalnost, znajući da mogu da računam na njen savet i pomoć. Neizmerno sam srećna što sam imala priliku da tokom svih ovih godina učim od nje i što smo ovaj veliki posao privele kraju zajedno.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Tijani Cvetić Antić na znanju koje mi je prenela tokom studija, vremenu i pažnji koje je posvetila detaljnom pregledu ove disertacije. Njene sugestije i komentari doprineli su kvalitetu konačnog teksta, a posebno sam joj zahvalna na prijatnoj saradnji, razumevanju i podršci tokom završnih koraka ovog dugog procesa. Veoma mi je drago što sam imala priliku da sarađujem sa njom i u ovoj etapi mog obrazovanja.

Prof. dr Dragani Cvetković srdačno se zahvaljujem na znanju koje mi je prenela tokom studija, dragocenim savetima i razgovorima koji su podsticali moju radoznalost i produbili interesovanje za statistiku. Posebno sam joj zahvalna na strpljenju, razumevanju i ohrabrenju tokom završetka disertacije, a naročito na podsećanju da je za dobre stvari ponekad potrebno više vremena.

Prof. dr Aneti Sabovljević zahvaljujem se na znanju koje mi je prenela tokom studija, kao i na vremenu koje je izdvojila za pregled ove disertacije i korisnim sugestijama koje su doprinele njenoj konačnoj verziji.

Posebno se zahvaljujem dr Ani Vuleti na dugogodišnjoj saradnji, znanju i iskustvu koje je delila sa mnom, kao i na brojnim korisnim savetima i razgovorima tokom istraživačkog rada. Njena stručnost, temeljnost i kritički pristup naučnim pitanjima za mene predstavljaju dragocen primer odgovornog istraživačkog rada. Posebno sam joj zahvalna na vremenu, pažnji i trudu koje je uložila u detaljan pregled ove disertacije, kao i na sugestijama koje su doprinele njenoj jasnoći, preciznosti i kvalitetu.

Neizmerno se zahvaljujem dr Branki Tucić što mi je pružila poverenje i priliku da volontiram na Odeljenju za evolucionu biologiju, čime mi je omogućila da ostvarim svoje prve korake u naučnoistraživačkom radu.

Dr Sanji Đoković zahvaljujem se na pomoći i saradnji tokom terenskih istraživanja i posebno u praćenju oprašivanja cvetova *I. pumila*. Hvala joj na uloženom vremenu i trudu, kolegijalnosti i svim zajedničkim iskustvima koja su obeležila taj deo istraživanja.

Dr Nataši Nestorović zahvaljujem se na strpljenju, vremenu i znanju koje je uložila da me obuči za rad na svetlosnom mikroskopu i svim poslovnim i životnim savetima koje je podelila sa mnom.

Zahvaljujem se Veljku Vučkoviću na bezbrojnim satima provedenim za mikroskopom, strpljenju i ogromnom trudu koji je uložio u analizu stoma. Takođe, hvala mu na svim razgovorima, smehu i prijateljstvu koje se razvilo tokom naše saradnje.

Katarini Bobić i Maji Roljić zahvaljujem se na uloženom vremenu, trudu i pomoći u merenju čaura i semena, čime su doprinele realizaciji ovog dela istraživanja.

Svim koleginicama i kolegama sa Odeljenja za evolucionu biologiju zahvaljujem se na kolegijalnosti, saradnji i svakodnevnoj podršci tokom svih ovih godina. Posebno se zahvaljujem dr Tanji Vukov na savetima u rešavanju brojnih dilema vezanih za statističke analize i rad u R-u i dr Nataši Barišić Klisarić što je uvek imala pet minuta za razgovor i makar jedan za zagrljaj.

Posebno hvala mojim dragim saborcima iz ReFocuS tima: Jaci, Mari, Maji, Boki, Joci, Jeci, Mici, Ivani, Banetu i Milošu, sa kojima sam kroz organizaciju Noći istraživača podelila nebrojene sate rada, razmenjivanja ideja, improvizacije, stresa i smeha. Hvala vam na poverenju i prilici da iskačem iz zone konfora dok zajedno spajamo nauku i zabavu.

Mojoj dragoj „krovnoj grupi za plakanje i kukanje“, u najširem sastavu, hvala na svim razgovorima, smehu, podeljenim brigama i međusobnoj podršci, bez obzira na to da li smo se okupljali na krovu, u dvorištu ili po hodnicima. Posebno hvala Ljilji, Olgi i Bogdanu na svim sesijama *body doublinga*, a Kaći, Filipu, Nataliji i Neveni na onoj „samo još jednoj cigareti“, tokom koje se sve ispriča, a opet, uvek ostane još nešto.

Mojoj koleginici i prijateljici dr Lei Vlajnić hvala na svim savetima, podršci i pouzdanim informacijama kada su mi bile najpotrebnije.

Mojoj koleginici, prijateljici i neumoljivo iskrenoj sagovornici dr Ljiljani Radovanović hvala što je sasa mome raku. Mnogo mi je drago što naš fakultativni mutualizam već godinama pokazuje sinergističke efekte.

Mojoj prijateljici, koleginici i kumi dr Ani Radmilović hvala na podršci i razumevanju. Nekada je samo jedan zagrljaj na hodniku bio dovoljan da preživim dan.

Katarini Stanković sam neizmerno zahvalna što mi je pomogla da bolje upoznam i prihvatim sebe, kao i da pronađem načine da lakše sagledavam prepreke i savladavam izazove.

Mojoj mami Svetlani (Ceci), tati Viktoru (Dulu) i bratu Urošu hvala na neizmernoj ljubavi, strpljenju i podršci tokom svih ovih godina. Hvala vam što ste verovali u mene i na svom razumevanju, ohrabrenju i spremnosti da mi uvek priskočite u pomoć kada mi je to bilo potrebno. Posebno hvala mami što je godinama neumorno čuvala stražu nad mojom koncentracijom i što me je naučila da mislim i pamtim u asocijacijama, a tati što je bio moj “mobilni tim” za svaku misiju. Ukiju hvala što me ličnim primerom uči kako da budem svoja i pametnije trošim moždanu bateriju.

Zahvalnost na ljubavi i podršci dugujem i mojoj široj porodici, uključujući i sve one koji nažalost nisu dočekali završetak ovog dugogodišnjeg procesa. Među njima posebno mesto pripada mojoj baki Branki. Hvala joj za sve godine zajedničkog života, sekiranja, preslišavanja, poseta

prirodnjačkom muzeju, pita sa mesom i svih plesova nakon položenih ispita. Volela bih da je danas tu da zajedno proslavimo ovaj trenutak i znam koliko bi bila ponosna.

Mom Simi, hvala za svu ljubav, strpljenje, razumevanje i podršku tokom svih ovih godina. Hvala ti što si preuzeo bezbrojne svakodnevne obaveze, brinuo o meni i našem zajedničkom životu i nikada se nisi ljutio što sam često odlazila od kuće sa petlovima, a vraćala se sa slepim miševima. Bez tebe bi ovaj put bio neuporedivo teži (neke etape ne bi bile ni moguće) i neizmerno mi znači što smo kroz sve uspone i padove prolazili zajedno. Nadam se samo da završetak doktorata neće označiti i kraj tvoje uspešne karijere glavnog domaćina!

I na kraju, hvala svakom malom „ja“ koje je u mojoj moždanoj skupštini glasalo da nastavim, dok su ostali vrištali da odustanem.

U Beogradu 28.10.2026. Katarina Hočevar

"We have come as far as we have because we are
the cleverest creatures to have ever lived on Earth.
But if we are to continue to exist,
we will require more than intelligence.
We will require wisdom."

David Attenborough

Evoluciono-ekološki odgovori prirodnih populacija *Iris pumila* L. na eksperimentalno povećanje temperature *in situ*

Sažetak

Globalno zagrevanje menja temperaturne uslove kojima su prirodne populacije biljaka bile izložene tokom svoje evolucione istorije, pri čemu fenotipska plastičnost predstavlja jedan od ključnih mehanizama koji omogućava biljkama brz odgovor na takve promene. Cilj ove doktorske disertacije bio je da se tokom dvogodišnjeg *in situ* eksperimenta ispitaju fenotipski odgovori dve prirodne populacije *Iris pumila* na ~1,5 °C povećanje temperature, ostvareno pomoću komora sa otvorenim vrhom, pri čemu su klonalne jedinke istih genotipova istovremeno bile izložene ambijentalnoj i povišenoj temperaturi. Odgovor na zagrevanje procenjivan je promenama anatomsko-morfoloških (SLA, LDMC, SLWC, LT, SD i SI) i biohemijskih (Hsp17.6, Hsp70, Hsp101, APX, CAT i SOD) osobina lista, fenologije cvetanja, reproduktivnog uspeha, fenotipske selekcije i integracije osobina. Povišena temperatura povećala je SLA, a smanjila LDMC, SLWC i LT, a isti smer odgovora utvrđen je i u kontrolisanom *ex situ* eksperimentu. Relativne količine svih Hsp bile su veće na povišenoj temperaturi, dok se relativne količine antioksidativnih enzima nisu statistički značajno razlikovale između temperaturnih tretmana. Većina osobina pokazala je sezonsko i međugodišnje variranje, uz sličan obrazac u oba temperaturna tretmana. Populacione razlike bile su izraženije za biohemijske nego za anatomsko-morfološke osobine, ali se njihov prosečan odgovor na zagrevanje nije razlikovao. Najmanju plastičnost ispoljile su anatomsko-morfološke osobine, intermedijarnu antioksidativni enzimi, a najveću Hsp, uz sličnu hijerarhiju sezonske plastičnosti. Integracija osobina bila je najniža kod antioksidativnih enzima, viša kod Hsp, a najviša kod anatomsko-morfoloških osobina, bez značajne promene usled zagrevanja. Zagrevanje je dovelo do ranijeg početka cvetanja, bez značajne promene ukupne dinamike. Prosečna apsolutna adaptivna vrednost bila je niža pri povišenoj temperaturi, ali bez statističke značajnosti. Pri povišenoj temperaturi, negativni selekcioni gradijenti za APX i SOD utvrđeni su u jednoj populaciji, a pozitivan za CAT u drugoj, mada formalni testovi nisu potvrdili statistički značajne razlike u selekcionim gradijentima između populacija. U celini, rezultati ukazuju da se odgovor *I. pumila* na blago dugotrajno zagrevanje ispoljio kroz fenotipske promene, bez značajne promene apsolutne adaptivne vrednosti.

Ključne reči: *Iris pumila*, globalno zagrevanje, fenotipska plastičnost, anatomsko-morfološke osobine, Hsp, antioksidativni enzimi, fenologija cvetanja, fenotipska integracija, fenotipska selekcija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Evoluciona biologija

Evolutionary-ecological responses of natural populations of Iris pumila L. to experimental warming in situ

Abstract

Global warming has been altering the thermal conditions to which natural plant populations have been exposed throughout their evolutionary history. One of the key mechanisms enabling plants to respond rapidly to such changes is phenotypic plasticity. The aim of this doctoral dissertation was to examine, during a two-year *in situ* experiment, the phenotypic responses of two natural populations of *Iris pumila* to an approximately 1.5 °C temperature increase using open-top chambers, with clonal individuals of the same genotypes simultaneously exposed to ambient and elevated temperatures. Responses to warming were assessed through changes in morpho-anatomical (SLA, LDMC, SLWC, LT, SD and SI) and biochemical (Hsp17.6, Hsp70, Hsp101, APX, CAT and SOD) leaf traits, flowering phenology, reproductive success, phenotypic selection and trait integration. Elevated temperature increased SLA and decreased LDMC, SLWC and LT, and the same directions of response were observed in a controlled *ex situ* experiment. The relative abundances of all analysed Hsps were higher under elevated temperature, whereas those of antioxidant enzymes did not differ significantly between temperature treatments. Most traits exhibited seasonal and interannual variation, with similar patterns in both temperature treatments. Population differences were more pronounced for biochemical than for morpho-anatomical traits, but their average response to warming did not differ between populations. Morpho-anatomical traits exhibited the lowest plasticity, antioxidant enzymes an intermediate level and Hsps the highest plasticity, with a similar hierarchy observed for seasonal plasticity. Phenotypic integration was lowest for antioxidant enzymes, intermediate for Hsps and highest for morpho-anatomical traits, with no significant change in response to warming. Warming resulted in an earlier flowering onset, without significantly altered overall flowering dynamics. Mean absolute fitness was lower under elevated temperature, but the difference was not statistically significant. Under elevated temperature, negative selection gradients were detected for APX and SOD in one population and a positive gradient for CAT in the other, although formal tests did not detect statistically significant differences in selection gradients between populations. Overall, the results indicate that the response of *I. pumila* to mild, long-term warming was expressed through phenotypic changes without a significant change in absolute fitness.

Key words: *Iris pumila*, global warming, phenotypic plasticity, morpho-anatomical traits, Hsps, antioxidant enzymes, flowering phenology, phenotypic integration, phenotypic selection

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Evolutionary Biology

SKRAĆENICE

ADP	Adenozin difosfat
AJ	arbitrarna jedinica
AMPS	Amonijum-persulfat
ANOVA	analiza varijanse
ANOVAR	analiza varijanse sa ponovljenim merenjima (od engl. *ANalysis Of Variance with Repeated measures*)
ATP	adenozin trifosfat
APX	askorbat peroksidaza
BSA	goveđi serum albumin (od engl. *Bovine Serum Albumin*)
CAT	katalaza
CV%	koeficijent varijacije
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTT	ditiotreitol
ECD	gustina epidermalnih ćelija (od engl. *Epidermal Cell Density*)
EDTA	etilendiamino tetraacetat
ER	endoplazmatični retikulum
DHARM	analiza simuliranih reziduala (od engl. *residual Diagnostics for HierARchical Models)*
GAMM	generalizovani aditivni mešoviti model (od engl. *Generalized Additive Mixed Model*)
GLMM	generalizovani linearni mešoviti model (od engl. *Generalized Linear Mixed Model*)
HSE	element toplotnog stresa (od engl. *Heat Shock Element*)
HSF	transkripcioni faktor hsp gena (od engl. *heat shock transcription factor*)
Hsp	protein toplotnog stresa (od engl. *Heat shock protein*)
HSR	odgovor na toplotni šok (od engl. *Heat Shock Response*)
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
IRR	odnos očekivanih stopa (od engl. *Incidence Rate Ratio)*
LA	površina lista (od engl. *Leaf Area*)
LDM	suva masa lista (od engl. *Leaf Dry Mass*)
LDMC	sadržaj suve materije u listu (od engl. *Leaf Dry Mass content*)
LES	spektar ekonomije listova (od engl. *Leaf Economic Spectrum*)
LFM	sveža masa lista (od engl. *Leaf Fresh Mass*)
LMM	linearni mešoviti model (od engl. *Linear Mixed effect Model*)
LRT	test odnosa verodostojnosti (od engl. *Likelihood Ratio Test*)
LT	debljina lista (od engl. *Leaf Thickness*)
MANOVA	multivarijatna analiza
MANOVAR	multivarijatna analiza varijanse sa ponovljenim merenjima (od engl. *Multivariate ANalysis Of Variance with Repeated measures*)
ML	metoda maksimalne verodostojnosti (od engl. *Maximum Likelihood*)
OR	odnos šansi (od engl. *Odds Ratio*)
OTC	komora otvorenog vrha (od engl. *Open Top Chamber*)
PA	poliakrilamid

PAR	fotosintetski aktivna svetlost (od engl. *photosyntetically active radiation*)
PBS	fosfatni pufer (od engl. *Phosphate Buffer Saline*)
PI	Indeks plastičnosti (od engl. *Plasticity Index*)
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PVDF	polivinildifluorid
REML	Metoda ograničene maksimalne verodostojnosti (od engl. *REstricted Maximum Likelihood)*
ROS	reaktivne kiseonične vrste (od engl. *Reactive Oxygen Species*)
rRNK	ribozomalna ribonukleinska kiselina
SD	gustina stoma (od engl. *Stomatal density*)
SDS	natrijum dodecil sulfat (od engl. *sodium dodecyl sulphate*)
SE	standardna greška (od engl. *standard error*)
sHsp	mali proteini toplotnog stresa (engl. *small Heat Shock proteins*)
SI	indeks stoma (od engl. *Stomatal index*)
SLA	specifična površina lista (od engl. *Specific leaf area)*
SLWC	specifični sadržaj vode u listu (od engl. *Specific Leaf Water Content*)
SOD	superoksid dismutaza
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilendiamin
Tris	hidroksimetilaminometan

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Uticaj globalnog zagrevanja na biljni svet 1
1.2. Stres i odgovori biljaka na sredinski stres 3
1.2.1. Heterogenost životne sredine 3
1.2.2. Pojam i tipovi stresa 4
1.2.3. Termalno okruženje biljaka i temperaturni stres 6
1.2.4. Odgovori biljaka na abiotičke stresore 8
1.3. Fenotipska plastičnost 11
1.3.1. Definicija i osnovne karakteristike fenotipske plastičnosti 11
1.3.2. Genetička osnova fenotipske plastičnosti 13
1.3.3. Evolucija fenotipske plastičnosti 15
1.4. Fenotipska integracija 16
1.5. Eksperimentalni pristupi u izučavanju biljnih odgovora na povišenu temperaturu 17
1.6. Anatomsko-morfološko-fiziološke osobine lista 21
1.6.1. Specifična površina lista (SLA) 22
1.6.2. Sadržaj suve materije u listu (LDMC) 22
1.6.3. Specifični sadržaj vode u listu (SLWC) 23
1.6.4. Debljina lista (LT) 23
1.6.5. Gustina stoma (SD) i Indeks stoma (SI) 23
1.6.6. RGB Indeks procene sadržaja hlorofila (I_1) 24
1.7. Proteini toplotnog stresa 24
1.7.1. Opšte karakteristike, podela i pregled funkcija 24
1.7.2. Hsp101 26
1.7.3. Hsp70 26
1.7.4. Hsp17.6 27
1.8. Antioksidativna zaštita: enzimski mehanizmi 28
1.8.1. Reaktivne vrste kiseonika (ROS) i njihova uloga 28
1.8.2. Superoksid dismutaza (SOD) 29
1.8.3. Askorbat peroksidaza (APX) 30
1.8.4. Katalaza (CAT) 32
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 33
3. MATERIJAL I METODE 35
3.1. Opis staništa 35
3.2. Ispitivana vrsta 36
3.3. Eksperimentalni dizajn 38
3.3.1. Eksperiment I: Eksperimentalno povećanje temperature *in situ* 38

3.3.2. Eksperiment II: Eksperimentalno povećanje temperature *ex situ* 39
3.4. Merenje abiotičkih parametara staništa 40
3.5. Merenje anatomsko-morfoloških osobina lista 40
3.6. Biohemijske metode 42
3.6.1. Priprema tkivnih ekstrakata 42
3.6.2. Određivanje koncentracije proteina 42
3.6.3. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS- PAGE) 42
3.6.4. Western blot 43
3.6.5. Detekcija proteina na membrani 43
3.6.6. Analiza imunospecifičnih traka 44
3.7. Statističke metode za obradu podataka 44
3.7.1. Sezonska i godišnja dinamika anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u odgovoru na eksperimentalno povećanje temperature *in situ* (Eksperiment I) 45
3.7.2. Odgovori anatomsko-morfoloških osobina lista na eksperimentalno povećanje temperature *ex situ* (Eksperiment II) 47
3.7.3. Analiza fenologije cvetanja i reproduktivnog uspeha *I. pumila* u različitim temperaturnim sredinama (Eksperiment I) 47
3.7.4. Procena adaptivne vrednosti i analiza fenotipske selekcije na biohemijske osobine lista *I. pumila* u različitim temperaturnim sredinama (Eksperiment I) 52
3.7.5. Određivanje indeksa fenotipske plastičnosti 53
3.7.6. Određivanje indeksa integracije 54
3.7.7. Grafički prikaz podataka 55
4. REZULTATI 56
4.1. Vremenska dinamika fenotipskih odgovora anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* na povećanje temperature *in situ* 56
4.1.1. Abiotički uslovi staništa 56
4.1.2. Fenotipski odgovori funkcionalnih i mehaničkih osobina lista u različitim temperaturnim sredinama 58
4.1.3. Analiza profila odgovora funkcionalnih i mehaničkih osobina lista na povišenu temperaturu 74
4.1.4. Fenotipski odgovori količine proteina toplotnog stresa u različitim temperaturnim sredinama 80
4.1.5. Analiza profila odgovora proteina toplotnog stresa na povišenu temperaturu 87
4.1.6. Fenotipski odgovori količine antioksidativnih enzima u različitim temperaturnim sredinama 91
4.1.7. Analiza profila odgovora antioksidativnih enzima na povišenu temperaturu 103
4.1.8. Uticaj mikroklimatskih parametara na anatomsko-morfološke i biohemijske osobine lista *I. pumila* 110
4.2. Fenotipski odgovori funkcionalnih i mehaničkih osobina lista *I. pumila* na povećanje ambijentalne temperature *ex situ* 112

4.2.1. Variranje funkcionalnih i mehaničkih osobina lista u odnosu na temperaturu. 112
4.2.2. Fenotipska plastičnost funkcionalnih i mehaničkih osobina lista 116
4.2.3. Fenotipska integracija funkcionalnih i mehaničkih osobina lista *I. pumila* 116
4.3. Fenologija cvetanja, reproduktivni uspeh i adaptivna vrednost *I. pumila* u različitim temperaturnim sredinama *in situ* 118
4.3.1. Fenologija cvetanja 118
4.3.2. Reproduktivni uspeh 127
4.3.3. Adaptivna vrednost i fenotipska selekcija 129
4.4. Fenotipska plastičnost anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* 134
4.4.1. Fenotipska plastičnost u odgovoru na temperaturni tretman 134
4.4.2. Sezonska dinamika fenotipske plastičnosti 137
4.5. Fenotipska integracija anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* 142
5. DISKUSIJA 162
5.1. Anatomsko-morfološki i biohemijski aspekti odgovora biljaka na povećanje temperature 162
5.1.1. Anatomsko-morfološki odgovori lista na povećanje temperature 162
5.1.2. Vremenska dinamika koncentracije proteina toplotnog stresa u različitim temperaturnim sredinama 167
5.1.3. Vremenska dinamika koncentracije antioksidativnih enzima u različitim temperaturnim sredinama 171
5.2. Temperatura i fenotip 174
5.2.1. Fenotipsko variranje anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista u odgovoru na povećanje temperature 174
5.2.2. Uticaj eksperimentalnog povećanja temperature na fenologiju cvetanja i reproduktivni uspeh *I. pumila* 176
5.2.3. Integrisani fenotip 181
6. ZAKLJUČCI 186
7. LITERATURA 188

1. UVOD

Prirodna staništa organizama odlikuju se izraženom prostornom i vremenskom promenljivošću, pri čemu se pojedinačni abiotički i biotički faktori razlikuju po intenzitetu i dinamici delovanja. Ova sredinska heterogenost predstavlja okvir u kome se odvijaju životni procesi i oblikuju odgovori organizama na promene uslova sredine. Za organizme sa sesilnim načinom života, kao što su biljke, sposobnost odgovora na promene uslova sredine predstavlja jedan od osnovnih preduslova funkcionisanja i opstanka, budući da nepovoljne promene u neposrednom okruženju ne mogu izbeći aktivnim premeštanjem (Larcher, 2003; Sultan, 2000). Globalno zagrevanje predstavlja jedan od najznačajnih savremenih izvora promena uslova životne sredine, jer menja temperaturne uslove i povećava učestalost i intenzitet odstupanja od temperaturnog optimuma, a time i verovatnoću pojave temperaturnog stresa (IPCC, 2023; Jump i Peñuelas, 2005). Biljke na promene temperaturnih uslova odgovaraju nizom međusobno povezanih procesa koji se odvijaju na različitim nivoima biološke organizacije. Fenotipska plastičnost omogućava promene fenotipske ekspresije osobina u zavisnosti od uslova sredine, dok se na ćelijskom nivou aktiviraju različiti zaštitni mehanizmi, uključujući sintezu proteina toplotnog stresa i regulaciju redoks homeostaze putem antioksidativnog sistema (Feder i Hofmann, 1999; Wahid i sar., 2007; Suzuki i Mittler, 2006; Jagadish i sar., 2021). Odgovor biljaka na povećanje temperature može se ispoljiti na različitim nivoima fenotipa i ne mora biti jednak za sve osobine niti imati iste posledice po funkcionisanje i reproduktivni uspeh. Zbog toga razumevanje odgovora na globalno zagrevanje zahteva istovremeno razmatranje promena pojedinačnih osobina, njihove plastičnosti i međusobne povezanosti, kao i mogućih posledica tih promena po reprodukciju i adaptivnu vrednost.

1.1. Uticaj globalnog zagrevanja na biljni svet

Tokom istorije života na Zemlji klimatski uslovi su se prirodno menjali, ali se od početka industrijske ere tempo tih promena značajno ubrzao usled porasta antropogenog uticaja na životnu sredinu (IPCC, 2023). U tom kontekstu, globalno zagrevanje predstavlja jedan od ključnih činilaca koji danas oblikuju uslove života na Zemlji. Iako se pojmovi *klimatske promene* i *globalno zagrevanje* često koriste kao sinonimi, oni ne označavaju istu pojavu. Klimatske promene obuhvataju dugoročne promene prosečnih meteoroloških obrazaca koji određuju klimu na lokalnom, regionalnom i globalnom nivou, dok se globalno zagrevanje specifično odnosi na porast prosečne globalne površinske temperature Zemlje, prvenstveno usled povećanja koncentracije gasova sa efektom staklene bašte u atmosferi (NASA, 2024). U okviru klimatskih promena, globalno zagrevanje predstavlja jedan od najznačajnih faktora koji utiču na biljni svet, budući da povišene temperature menjaju ključne fiziološke procese i mogu imati stimulativne, ali i ograničavajuće efekte na rastenje i razviće biljaka, u zavisnosti od intenziteta i trajanja promena, kao i od karakteristika staništa (Chen i sar., 2025; Lippmann i sar., 2019; Pahadi i sar., 2025).

U odnosu na predindustrijski period, prosečna godišnja površinska temperatura Zemlje porasla je za 1,15 °C, pri čemu je zagrevanje izraženije na kopnu (1,65 °C) nego nad okeanima (0,93 °C) (IPCC, 2023). U pojedinim regionima porast temperature znatno premašuje globalni prosek, pri čemu se procenjuje da se Arktik u periodu od 1979. do 2021. godine zagrevao skoro četiri puta brže od ostatka planete (Rantanen i sar., 2022). Iako su globalni napori usmereni ka ograničavanju porasta temperature na manje od 1,5 °C, najnovije procene ukazuju na to da je ostvarenje tog cilja malo verovatno, dok je scenario porasta temperature za više od 3 °C do kraja veka izgledniji (Liu i Raftery, 2021; Ripple i sar., 2022; Suárez-Eiroa i sar., 2024). Dugoročne klimatske projekcije ukazuju na to da bi se globalno zagrevanje moglo nastaviti i nakon 2100. godine, čak i u scenarijima umerenog smanjenja emisije gasova sa efektom staklene bašte, pri

čemu se najveći porast temperature očekuje nad kopnom, naročito u polarnim regionima (Lyon i sar., 2021). Dalje povećanje temperature verovatno će dovesti do češćih i intenzivnijih toplotnih talasa, promena u raspodeli padavina i veće učestalosti prirodnih nepogoda, uključujući suše, poplave i oluje (IPCC, 2021; Jagadish i sar, 2021; IPCC, 2023). Pored toga, globalno zagrevanje menja temperaturni režim tokom vegetacione sezone, uključujući porast prosečnih temperatura, kao i promene u dnevnom i sezonskom variranju. U umerenim regionima, naročito na većim nadmorskim visinama, očekuje se produžavanje vegetacione sezone, dok će se u sušnim i tropskim oblastima ona skraćivati usled toplotnog stresa i suše (Jagadish i sar., 2021; IPCC, 2023).

Globalno zagrevanje predstavlja značajnu pretnju proizvodnji hrane. Utvrđeno je da se sa porastom globalne temperature za 1 °C, prosečni prinosi četiri glavne poljoprivredne kulture smanjuju: pšenice za 6 %, pirinča za 3,2 %, kukuruza za 7,4 % a soje za 3,1 % (Zhao i sar., 2017; Kan i sar., 2023).

Prirodni ekosistemi već trpe posledice antropogeno izazvanog globalnog zagrevanja, koje se ispoljavaju kroz promene u funkcionisanju ekosistema, smanjenje biodiverziteta i izumiranje vrsta (Catullo i sar., 2019). Zabeležena su pomeranja areala rasprostranjenja vrsta, promene u sastavu bioloških zajednica, kao i promene u fenologiji, morfologiji i fiziologiji brojnih grupa organizama, uključujući biljne i životinjske vrste u kopnenim, slatkovodnim i morskim ekosistemima (Parmesan, 2006; Franks i sar., 2014; Pecl i sar., 2017; Catullo i sar., 2019). Pored toga, narušavanje biotičkih interakcija, poput odnosa predator–plen i biljka–oprašivač, postaje sve izraženije usled različitih fizioloških i fenoloških odgovora vrsta na porast temperature (Parmesan, 2006; Franks i sar., 2014; Piao i sar., 2019). Tokom proteklih decenija, jedan od najuočljivijih obrazaca fenoloških promena kod biljaka jeste raniji početak prolećnih razvojnih faza, odnosno ranije cvetanje i formiranje listova, zabeležen širom Evrope, Severne Amerike i istočne Azije, kako putem satelitskih posmatranja tako i eksperimentalnim istraživanjima (Piao i sar., 2019). Ove promene ukazuju na to da posledice globalnog zagrevanja nisu isključivo predmet teorijskih predviđanja, već da sada dovode do merljivog narušavanja funkcionisanja prirodnih ekosistema, sa sve izraženijim posledicama po opstanak vrsta. U skladu sa tim, Warren i saradnici (2018) su, poredeći scenarije porasta temperature od 1,5 °C i 2 °C u odnosu na predindustrijski nivo, pokazali da bi ograničavanje globalnog zagrevanja na 1,5 °C značajno smanjilo udeo vrsta koje bi izgubile više od polovine svog areala rasprostranjenja, i to za do 50 % kod biljaka i životinja, odnosno za čak 66 % kod insekata. Prema globalnoj meta-analizi koja je obuhvatila 131 studiju (Urban, 2015), rizik od izumiranja vrsta raste eksponencijalno sa porastom temperature: zagrevanje od 2 °C moglo bi da ugrozi oko 5 % vrsta, dok bi porast temperature od 4 °C mogao dovesti do nestanka čak 16 % svih savremenih vrsta. Kao najugroženiji regioni izdvajaju se Južna Amerika, Australija i Novi Zeland, gde bi izumiranje moglo zahvatiti čak jednu petinu vrsta, dok su Severna Amerika i Evropa područja sa najmanjim predviđenim rizikom (Urban, 2015).

Globalno zagrevanje može dovesti do izumiranja biljnih vrsta direktnim i indirektnim mehanizmima. Direktni mehanizmi podrazumevaju porast temperature iznad fiziološke tolerancije vrste (Cahill i sar., 2013), pri čemu su posebno ugrožene biljke sa uskim rasponom termotolerancije, naročito u regionima u kojima je povećanje temperature znatno veće od globalnog proseka. Indirektni mehanizmi uključuju skraćenje perioda aktivnosti usled nepovoljnih temperaturnih uslova, porast energetskih troškova održavanja, povećanje učestalosti i intenziteta ekstremnih klimatskih događaja, izraženije sezonske temperaturne oscilacije, neusaglašenost između temperaturnih uslova i fotoperioda, kao i fenološku neusaglašenost između biljaka i njihovih oprašivača (Cahill i sar., 2013; Franks i sar., 2014; Catullo i sar., 2019). Podaci dobijeni primenom različitih modela i eksperimentalnih pristupa ukazuju na to da i relativno mali porast prosečne globalne temperature može imati

nesrazmerno velike posledice po biodiverzitet i stabilnost ekosistema (Urban, 2015; Warren i sar., 2018; IPCC, 2023). Na nivou pojedinačnih organizama, ovi efekti ispoljavaju se kroz promene u osnovnim fiziološkim procesima koji utiču na rastenje, razvoj i reproduktivni uspeh (Wahid i sar., 2007; Raza i sar., 2019). Kod biljaka, stres izazvan povišenom temperaturom dovodi do smanjenja efikasnosti fotosinteze, povećanja transpiracije i destabilizacije ćelijskih membrana, što za posledicu ima narušavanje vodnog i energetskog balansa (Raza i sar., 2019; Kan i sar., 2023; Rammal i sar., 2025). Pored toga, globalno zagrevanje remeti fiziološku ravnotežu biljaka, povećava njihovu osetljivost na patogene i dovodi do promena u fenologiji, morfologiji, fiziologiji i ukupnoj produktivnosti (Jagadish i sar., 2021; Kan i sar., 2023; Chen i sar., 2025).

Da bi opstale u izmenjenim sredinskim uslovima, prirodne populacije biljaka mogu koristiti tri strategije, koje se međusobno ne isključuju: (1) migraciju putem disperzije semena u područja sa povoljnijim uslovima, (2) adaptaciju delovanjem prirodne selekcije ili (3) fenotipsku plastičnost (Nicotra i sar., 2010). S obzirom na to da temperatura predstavlja jedan od najznačajnijih stresnih faktora, razumevanje načina na koji biljke percipiraju temperaturne promene i odgovaraju na njih ključno je za predviđanje njihovog funkcionisanja i opstanka u uslovima globalnog zagrevanja.

1.2. Stres i odgovori biljaka na sredinski stres

1.2.1. Heterogenost životne sredine

Prirodna staništa biljaka odlikuju se izraženom prostornom i vremenskom heterogenošću abiotičkih i biotičkih činilaca, usled čega su resursi i drugi sredinski faktori neujednačeno raspoređeni i variraju u intenzitetu i trajanju (Wiens, 1976; Kotliar i Wiens, 1990; Stuefer, 1996; Larcher, 2003; Nicotra i sar., 2010; Suzuki i sar., 2014). S obzirom na to da su biljke sesilni organizmi, njihova sposobnost da percipiraju heterogenost sredine i da na nju odgovore predstavlja važan preduslov opstanka (Stuefer, 1996; Nicotra i sar., 2010; Suzuki i sar., 2014). Stoga heterogenost staništa predstavlja važan ekološki kontekst u kojem se oblikuju kratkoročni (ekološki) i dugoročni (evolucioni) odgovori biljaka (Stuefer, 1996).

Heterogenost životne sredine podrazumeva da se uslovi mogu razlikovati po skali, stepenu kontrasta, prostornoj kovarijansi resursa i predvidljivosti promena, pri čemu se takvo variranje može ispoljavati u prostoru, vremenu ili u obe dimenzije istovremeno (Wiens, 1976; Kotliar i Wiens, 1990; Stuefer, 1996). Važno je naglasiti da se ovi aspekti ne ispoljavaju izolovano, već su u međusobnoj interakciji: svaki od njih može omogućiti određene odgovore biljaka, ali i nametnuti određena ograničenja, tako da se spektar mogućih odgovora formira njihovim kombinovanim delovanjem (Kotliar i Wiens, 1990; Stuefer, 1996). Skala heterogenosti označava veličinu prostora ili vremensko trajanje u okviru kojih sredinski faktori zadržavaju relativno stabilan kvalitet (Wiens, 1976; Stuefer, 1996). Pri tome je važno razlikovati strukturnu heterogenost, koja se odnosi na objektivno prostorno-vremensko variranje uslova, od funkcionalne heterogenosti, koja obuhvata samo one razlike koje su biološki relevantne i koje dati organizam može da registruje (Stuefer, 1996; Baythavong i Stanton, 2010). Vremenska heterogenost može biti unutar-generacijska, ukoliko se fluktuacije sredinskih faktora odvijaju tokom životnog ciklusa jedinke, ili među-generacijska, kada se promene odvijaju u periodu dužem od generacijskog vremena vrste (Kotliar i Wiens, 1990; Stuefer, 1996). Sredinska heterogenost može se definisati kao variranje sredinskih faktora i dostupnosti resursa u različitim delovima prostora koje organizam nastanjuje. Kada je sredinsko variranje, u odnosu na veličinu i disperzionu sposobnost jedinki, grubo granulisano (engl. *coarse-grained*), odnosno kada organizmi provode znatno više vremena u jednom nego u drugim staništima, teorijski se očekuje formiranje konstitutivnih ili lokalno adaptiranih fenotipova, odnosno specijalizacija

(Stuefer, 1996; Banta i sar., 2007; Hamann i sar., 2016; De Villemereuil i sar., 2018). Nasuprot tome, ukoliko je sredinsko variranje fino granulisano (engl. *fine-grained*), odnosno ukoliko jedinke koriste sredinske resurse proporcionalno njihovoj prostorno-vremenskoj zastupljenosti u datom staništu, očekuje se evolucija adaptivne fenotipske plastičnosti koja omogućava usklađivanje fenotipa sa promenama u mikrookruženju (Stuefer, 1996; Baythavong i Stanton, 2010; Baythavong, 2011; Hamann i sar., 2017; Henn i sar., 2018). Kontrast predstavlja stepen razlike između susednih delova staništa i, zajedno sa skalom, utiče na to da li će sredinsko variranje dati organizam funkcionalno prepoznati i da li će ono izazvati odgovor (Kotliar i Wiens, 1990; Stuefer, 1996). Prostorna kovarijansa označava način na koji su različiti resursi, poput vode, nutrijenata i svetlosti, raspoređeni u prostoru. Kada se različiti resursi prostorno preklapaju (pozitivna kovarijansa), povoljnija mikrostaništa mogu biti jasnije definisana u prostoru, što može olakšati istovremeno korišćenje više resursa; nasuprot tome, njihovo prostorno isključivanje (negativna kovarijansa) može otežati takvo usklađeno korišćenje resursa i zahtevati strategije poput specijalizacije ili razmene resursa unutar klona (Stuefer, 1996). Posebno složen aspekt heterogenosti životne sredine predstavlja predvidljivost sredinskih promena, koja značajno utiče na evoluciju odgovora organizama na heterogenost (Stuefer, 1996; Valladares i sar., 2007; Reed i sar., 2010; Simons, 2011). Kada se faktori sredine menjaju na relativno predvidiv način, na primer usled sezonskih promena temperature ili vlažnosti, sredinski signali su pouzdaniji, pa selekcija favorizuje razvoj adaptivne fenotipske plastičnosti (Scheiner, 1993; Stuefer, 1996; Ghalambor i sar., 2007; Reed i sar., 2010). Nasuprot tome, u uslovima niske predvidljivosti, kada se intenzitet i trajanje promena teško mogu anticipirati, selekcija najčešće favorizuje generalizaciju, odnosno formiranje intermedijarnih i robusnih fenotipova sa smanjenom plastičnošću, čime se umanjuje rizik od maladaptivnih odgovora na nepouzdane sredinske signale (Stuefer, 1996; Nicotra i sar., 2010).

Izbor između specijalizacije, generalizacije i fenotipske plastičnosti u velikoj meri zavisi od međudejstva različitih aspekata heterogenosti, pre svega skale, kontrasta i predvidljivosti, što u datom ekološkom kontekstu određuje koji tipovi odgovora biljaka mogu biti funkcionalno održivi (Stuefer, 1996). Način na koji biljke registruju i odgovaraju na heterogenost životne sredine ne zavisi samo od prisustva različitih faktora, već i od njihove prostorne raspodele, intenziteta i trajanja. Međutim, kada jedan ili više sredinskih faktora svojom jačinom i trajanjem naruše fiziološku ravnotežu biljaka, heterogenost poprima stresni karakter, što predstavlja poseban izazov u prirodnim ekosistemima (Larcher, 2003; Valladares i sar., 2007; Nicotra i sar., 2010).

1.2.2. Pojam i tipovi stresa

Proučavanje odgovora organizma i populacija na sredinski stres predstavlja poseban konceptualni izazov zbog višeznačnosti samog pojma *stres*. Jedan od najznačajnih autora u istoriji proučavanja stresa i utemeljivač modernog koncepta stresa, Selye (1973) istakao je da *„Svako zna šta je stres, a opet niko zaista ne zna šta on jeste“,* ukazujući na paradoks termina koji je opšteprihvaćen, ali različito definisan u zavisnosti od konteksta u kome se upotrebljava. Isti autor definiše stres kao *„nespecifični odgovor organizma na svaki zahtev koji se pred njega postavi“*, naglašavajući da različiti stresori mogu pokrenuti zajedničke, opšte fiziološke reakcije. Tumačenje stresa zavisi ne samo od istraživačke discipline, već i od nivoa biološke organizacije na kojem se proučava, od molekularnog i fiziološkog do organizamskog i populacionog (Bijlsma i Loeschcke, 2005). U savremenoj biološkoj literaturi termin *stres* često se koristi i za spoljašnji faktor koji deluje na organizam i za odgovor organizma na to delovanje. Zbog toga je potrebno razlikovati pojam *stresor*, kao sredinske komponente, od *stresnog odgovora*, odnosno skupa fizioloških i biohemijskih promena koje prate izlaganje stresoru, kao biološke komponente (Lichtenthaler, 1996, 1998; Bijlsma i Loeschcke, 2005; Kranner i sar., 2010).

U fiziološkom kontekstu, stres se najčešće posmatra kao skup fizioloških i biohemijskih odgovora jedinke na delovanje sredinskih stresora, pri čemu se njegovi efekti procenjuju na osnovu promena u performansi organizma (Levitt, 1980; Lichtenthaler, 1988, 1996, 1998; Larcher, 2003; Mittler, 2006). Iako se stres najčešće smatra negativnim fenomenom, njegovi efekti mogu biti i korisni, u zavisnosti od intenziteta i trajanja delovanja stresora. U tom smislu razlikuju se *eustres*, koji označava stres niskog do umerenog intenziteta i aktivira signalne puteve i odbrambene mehanizme bez trajnih oštećenja, i *distres*, koji nastaje kada intenzitet ili trajanje stresora premaše kompenzacione kapacitete organizma i dovedu do smanjene funkcionalne stabilnosti i oštećenja (Lichtenthaler, 1988, 1996, 1998; Zhou i Wang, 2023; Berni i sar., 2024). Kumulativni efekat delovanja stresora može se opisati pojmom *doza stresa* (engl. *stress dose*), koja predstavlja proizvod intenziteta i trajanja delovanja stresora i omogućava procenu praga, specifičnog za tip stresora i organizam, iznad kojeg eustres prelazi u distres (Lichtenthaler, 1996, 1998; Georgieva i Vassileva, 2023). Tako, kratkotrajno izlaganje stresoru niskog intenziteta može izazvati slab ili izostajući odgovor, dok dugotrajno delovanje čak i blagih stresora može dovesti do hroničnog stresa i postepenih fizioloških promena. Nasuprot tome, kratkotrajni stres visokog intenziteta, odnosno akutni stres, izaziva brze i izražene fiziološke reakcije, tako da stres sličnog intenziteta, ali različitog trajanja, može pokrenuti kvalitativno različite biljne odgovore (Levitt, 1980; Larcher, 2003; Lai i He, 2016; Samat i sar, 2025).

U evolucionom kontekstu, stres se posmatra kao selekcioni faktor koji može pokrenuti adaptivne evolucione promene u populacijama izloženim promenljivoj životnoj sredini. U tom okviru, stres se definiše kao ishod interakcije stresora i odgovora organizma, pri čemu isti intenzitet stresora može imati različite posledice u zavisnosti od fiziološkog stanja i adaptivnog potencijala organizma (Hoffmann i Parsons, 1991; Bijlsma i Loeschcke, 2005; Zhou i Wang, 2023). U praksi, stres se često povezuje sa uslovima u kojima intenzitet i trajanje delovanja stresora smanjuju adaptivnu vrednost organizma, ograničavajući njegovo preživljavanje i/ili reprodukciju. Zbog toga izlaganje ekstremnim ili novim uslovima često deluje kao snažan selekcioni filter (Bijlsma i Loeschcke, 2005). Empirijsku potvrdu ovakvog delovanja stresa pružaju i eksperimenti u kojima su prirodne linije vrste *Arabidopsis thaliana* pokazale značajne razlike u preživljavanju i reprodukciji u kontrastnim klimatskim uslovima (Exposito-Alonso i sar., 2019). Ipak, nije svako smanjenje adaptivne vrednosti nužno posledica stresa, niti svaki stres mora dovesti do njenog smanjenja. Mnoge promene u metabolizmu, rastenju ili fiziološkim aktivnostima biljaka predstavljaju uobičajene odgovore na svakodnevne ili sezonske promene uslova sredine, pa granica između uobičajenog variranja sredinskih uslova i stresnog delovanja nije oštro određena i često se procenjuje tek na osnovu posledica po preživljavanje i reprodukciju (Lichtenthaler, 1998; Bijlsma i Loeschcke, 2005).

Sredinski stres može nastati delovanjem različitih abiotičkih i biotičkih stresora iz životne sredine. Abiotički stresori obuhvataju odstupanja neživih faktora sredine, kao što su temperatura, svetlost, salinitet, dostupnost nutrijenata i vlažnost zemljišta, od njihovih optimalnih vrednosti, kao i prisustvo zagađujućih supstanci u vodi, vazduhu i zemljištu. Biotički stresori odnose se na interakcije između organizama, uključujući predatorstvo, herbivoriju, parazitizam, patogenost i kompeticiju (Suzuki i sar., 2014; Pandey i sar., 2017; Nawaz i sar., 2023; Du i sar., 2024). Abiotički i biotički stresori mogu delovati nezavisno ili međusobno interagovati. Efekat stresa procenjuje se u odnosu na organizam na koji deluje, zbog čega stres ima i unutrašnju, genetičku komponentu (Bijlsma i Loeschcke, 2005). Genetički stres može nastati usled smanjene genetičke varijabilnosti, inbridinga ili akumulacije štetnih mutacija, čime se smanjuje adaptivni potencijal populacije (Bijlsma i sar., 2000). Zbog toga kombinovano delovanje sredinskog i genetičkog stresa može imati posebno izražene posledice, jer genetički osiromašene populacije često pokazuju veću osetljivost na abiotičke i biotičke stresore, što

može dovesti do značajnog smanjenja adaptivne vrednosti (Keller i sar., 2002; Bijlsma i Loeschcke, 2005; Cheptou i Donohue, 2011).

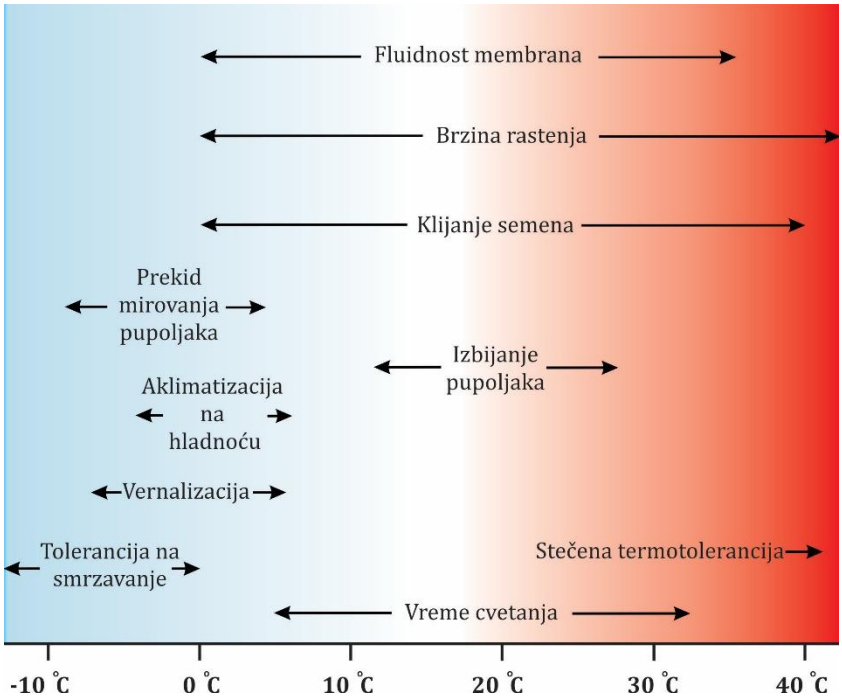
U prirodnim uslovima, biljke su najčešće izložene istovremenom delovanju više stresora, a globalno zagrevanje dodatno povećava učestalost i intenzitet kombinovanih stresnih faktora (Suzuki i sar., 2014; Zandalinas i Mittler, 2022). Efekti kombinovanih stresora mogu biti aditivni, sinergistički ili antagonistički, pri čemu ishod zavisi od trajanja i intenziteta delovanja, redosleda izlaganja, tipa tkiva, razvojne faze i biljne vrste (Dietz, 2021; Zandalinas i Mittler, 2022). Aditivni efekat podrazumeva odsustvo interakcije između stresora, tako da je ukupni odgovor biljke približno jednak zbiru efekata pojedinačnih stresora (Zandalinas i Mittler, 2022). Sinergistički efekat nastaje kada kombinovano delovanje stresora izaziva intenzivniji odgovor od očekivanog zbira njihovih pojedinačnih efekata. Tako je, na primer, kod duvana pokazano da zajedničko delovanje povišene temperature i suše izaziva intenzivniji oksidativni stres i veća oštećenja fotosintetskog aparata, nego svaki od ovih stresora pojedinačno (Rizhsky i sar., 2002; Zandalinas i Mittler, 2022). Nasuprot tome, antagonistički efekat javlja se kada je ukupni uticaj kombinovanih stresora manji od očekivanog zbira pojedinačnih efekata (Zandalinas i Mittler, 2022). To ilustruje primer eksperimenta na jagodi, kod koje umeren vodni deficit povećava otpornost na niske temperature, smanjujući rizik od formiranja leda u ćelijama (Rajashekar i Panda 2014).

Stres tako predstavlja važan faktor koji oblikuje fiziološke odgovore jedinki i može usmeravati evolucione procese u populacijama izloženim promenljivoj životnoj sredini (Bijlsma i Loeschcke, 2005; Dietz, 2021; Zhou i Wang, 2023). Sposobnost biljaka da prepoznaju stresore i integrišu odgovore na njihovo kombinovano delovanje predstavlja osnovu otpornosti i dugoročnog opstanka u uslovima ubrzanih klimatskih promena.

1.2.3. Termalno okruženje biljaka i temperaturni stres

Temperatura predstavlja jedan od najvažnijih abiotičkih faktora za žive organizme, jer utiče na gotovo sve biološke procese: menja fluidnost ćelijskih membrana, stabilnost proteina, aktivnost enzima, brzinu hemijskih reakcija, viskoznost ćelijskih tečnosti i difuziju različitih molekula kroz njih. Zbog toga je rasprostranjenost organizama u velikoj meri određena njihovom temperaturnom tolerancijom, pa se u tom pogledu razlikuju organizmi prilagođeni visokim (termofili), umerenim (mezofili) i niskim temperaturama (psihrofili) (Źróbek-Sokolnik, 2012). Raspon temperatura u biosferi izuzetno je širok, od približno -94 °C na Antarktiku do preko +400 °C u hidrotermalnim izvorima na dnu okeana, ali su granice u kojima organizmi mogu da opstanu i ostvare kompletan životni ciklus znatno uže, i kreću se od oko -20 °C do +122 °C (Clarke, 2014; Nievola i sar., 2017). Biljke su ograničene na još uži temperaturni opseg, približno od -10 °C do +60 °C, čije granice određuju temperatura smrzavanja unutarćelijske tečnosti i temperatura denaturacije proteina (Clarke, 2014; Nievola i sar., 2017). Optimalni temperaturni opseg za većinu viših biljaka iznosi 10–30 °C, dok se osnovne fiziološke funkcije mogu održavati u širem intervalu, od 0 °C do 40 °C (Fitter i Hay, 2002; Nievola i sar., 2017). Za razliku od homeotermnih životinja, biljke ne poseduju aktivne mehanizme za održavanje stabilne temperature u ćelijama i tkivima, zbog čega promene temperature spoljašnje sredine snažno utiču na njihov metabolizam, rastenje i razvoj (Fitter i Hay, 2002). Procesi rastenja i razvića zasnivaju se na brojnim biohemijskim reakcijama, koje su u različitom stepenu osetljive na temperaturu (Slika 1.2.1) (Penfield, 2008; Źróbek-Sokolnik, 2012; Nievola i sar., 2017).

Termalno okruženje biljaka može se opisati kao složen i dinamičan mozaik fluktuirajućih temperatura vazduha i zemljišta, pri čemu različiti organi mogu biti izloženi različitim obrascima temperaturnih promena. Na primer, temperatura lista u datom trenutku zavisi od više faktora koji određuju količinu presretnutog sunčevog zračenja i razmenu energije sa spoljašnjom sredinom. Među njima su dnevne i sezonske promene temperature, kratkotrajne meteorološke prilike, kao što su oblačnost, brzina vetra i poreklo vazdušne mase, položaj lista (listovi sunca i listovi senke) kao i njegova udaljenost od površine zemljišta (Fitter i Hay, 2002; O'sullivan i sar., 2017). Zbog kombinovanog delovanja ovih faktora, temperatura lista često može biti viša od temperature okolnog vazduha (O'sullivan i sar., 2017), i varirati u kratkom vremenskom periodu čak i do 20 °C, usled naizmeničnog zagrevanja i hlađenja (McClung i Davis, 2010). Pored toga, različite biljne vrste, kao i različiti organi i tkiva iste biljke, mogu imati različite temperaturne zahteve u zavisnosti od fiziološkog procesa ili ontogenetske faze (Fitter i Hay, 2002; Penfield, 2008).



Slika 1.2.1. Šematski prikaz temperaturnih opsega glavnih opisanih odgovora biljaka na temperaturu sredine

Temperaturni opsezi u kojima se odvijaju najvažniji fiziološki i razvojni procesi kod biljaka (Preuzeto i prilagođeno prema Penfield, 2008).

Biljke pokazuju širok spektar odgovora na temperaturne promene u svom okruženju. Neki od ovih odgovora su brzi, dok drugi zavise od integracije temperaturnih signala tokom dužeg perioda, tako da fenološki događaji poput prekida faze mirovanja pupoljaka ili cvetanja indukovanog vernalizacijom, često zavise od akumulirane temperature u prethodnoj sezoni (Penfield, 2008 Piao i sar., 2019). Ovakvi odgovori, koji zavise od prethodnih temperatrnih uslova, mogu se posmatrati kao razvojno-fenološka komponenta sredinske (ekološke) memorije, koja podrazumeva da raniji stimulusi ili stresori oblikuju kasnije razvojne i fiziološke odgovore biljaka (Amasino, 2004; Auge i sar., 2023). Mehanizmi koji stoje u osnovi ovog „pamćenja" uključuju promene u ekspresiji gena, epigenetičke modifikacije, signalne i metaboličke puteve, kao i procese stabilizacije proteina i održavanja proteinske homeostaze (Hilker i sar., 2016; Auge i sar., 2023; Zhang i sar., 2026). Takvo „pamćenje" podrazumeva da efekat prethodnog signala ili stresora može trajati i nakon inicijalnog odgovora, utičući na kasnije razvojne faze ili fiziološke odgovore, a u pojedinim slučajevima i na fenotip naredne generacije, pri čemu se kapacitet i trajanje zadržavanja informacije mogu značajno varirati (Hilker i sar., 2016; Auge i sar., 2023).

Za biljne vrste i niske i visoke temperature mogu predstavljati stresne faktore, dovodeći do stresa izazvanog hladnoćom (engl. *chilling stress*) ili smrzavanjem (engl. *freezing stress*), odnosno toplotnog stresa (engl. *heat stress*) (Źróbek-Sokolnik, 2012). Opstanak biljaka i

njihova sposobnost adaptivnog odgovora zavise od pouzdane percepcije i pravilne interpretacije signala iz promenljive životne sredine (Bigot i sar., 2018). Pokazano je da biljke mogu detektovati i reagovati na temperaturne promene reda veličine 1 °C (Jung i sar., 2016; Kan i sar., 2023). Zbog toga je pravilna percepcija i niskih i visokih temperatura od ključnog značaja za usklađivanje razvojnih i fizioloških odgovora (Penfield, 2008). U uslovima globalnog zagrevanja može se povećati verovatnoća neusaglašenih temperaturnih signala, što može dovesti do maladaptivnih odgovora, na primer neodgovarajućeg vremena početka cvetanja u odnosu na fazu životnog ciklusa ili ekologiju vrste (Nicotra i sar., 2010).

Ne dovodi svako povećanje temperature nužno do štetnih posledica po biljku, već njegov efekat zavisi od intenziteta, trajanja i brzine porasta temperature (Źróbek-Sokolnik, 2012; Jagadish i sar., 2021). Blago povišene temperature mogu pokrenuti termomorfogenezu, adaptivni razvojni odgovor koji omogućava prilagođavanje supraoptimalnim uslovima, odnosno umereno povišenim temperaturama koje još nisu dovoljno visoke da izazovu toplotni stres (Casal i Balasubramanian, 2019; Ding i sar., 2020; Ludwig i sar, 2021; Kan i sar., 2023; Kerbler i Wigge, 2023). U tom smislu, termomorfogeneza obuhvata morfološke promene kao što su izduživanje stabljike, hipokotila, lisnih drški i korenova, promena ugla listova i smanjenje lisne površine, čime se povećava efikasnost hlađenja i snižava temperatura tkiva (Casal i Balasubramanian, 2019; Ludwig i sar., 2021; Kan i sar., 2023). Nasuprot tome, toplotni stres nastaje kada temperatura premaši fiziološki prag tolerancije vrste, što dovodi do narušavanja homeostaze, uključujući metaboličku neravnotežu i inhibiciju rastenja, pri čemu intenzitet odgovora zavisi od vrste, genotipa, razvojne faze i tipa tkiva (Ahmad i Prasad, 2012; Hasanuzzaman i sar., 2013; Jagadish i sar., 2021; Kan i sar., 2023; Samat i sar., 2025). Granica između blago povišene temperature i toplotnog stresa nije univerzalna, već zavisi od vrste, ekotipa kao i adaptivnog kapaciteta biljke. Tako se kod model organizma *Arabidopsis thaliana* temperature do približno 27 °C smatraju umerenim i mogu pokrenuti termomorfogenezu, dok kod pirinča gornja granica može biti oko 34 °C (Ding i sar., 2020; Kan i sar., 2023). Najosetljivije faze životnog ciklusa biljaka na visoke temperature jesu rani stadijum sadnice i reproduktivni period, naročito gametogeneza i cvetanje (Jagadish i sar., 2021). Toplotni stres različito utiče na stabilnost proteina, lipidnih membrana, nukleinskih kiselina (DNK i RNK) i citoskeletnih struktura, a istovremeno menja efikasnost enzimskih reakcija u ćeliji, dovodeći do metaboličke neravnoteže (McClung i Davis, 2010; Calixto, 2025; Samat i sar., 2025). Povišene temperature takođe mogu povećati osetljivost biljaka na patogene (Kumar i Mukhopadhyay, 2025). U ekstremnim uslovima dolazi do ćelijskog oštećenja ili ćelijske smrti, što može izazvati kolaps tkiva ili organa, a u krajnjem slučaju i smrt organizma (Ahuja i sar., 2010). Metabolička neravnoteža izazvana toplotnim stresom praćena je akumulacijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) i razvojem sekundarnog oksidativnog stresa (Hasanuzzaman i sar., 2013; Mittler, 2006, 2017).

Biljke poseduju mehanizme percepcije temperature koji omogućavaju detekciju i najmanjih promena u toplotnom okruženju. Ovi signali aktiviraju složene mreže transdukcije koje dovode do promena u ekspresiji gena, metabolizmu i razvoju (Mittler i sar., 2012; Jung i sar., 2016; Ding i sar., 2020; Calixto, 2025). Efikasnost koordinacije ovih mreža i reprogramiranja ćelijskih procesa određuje da li će biljka uspeti da održi homeostazu, razvije otpornost ili će podleći stresu. U skladu s tim, biljke su razvile različite strategije i mehanizme za uspostavljanje ove ravnoteže, od morfoloških prilagođavanja do molekularnih odgovora koji im omogućavaju opstanak u promenljivim uslovima sredine.

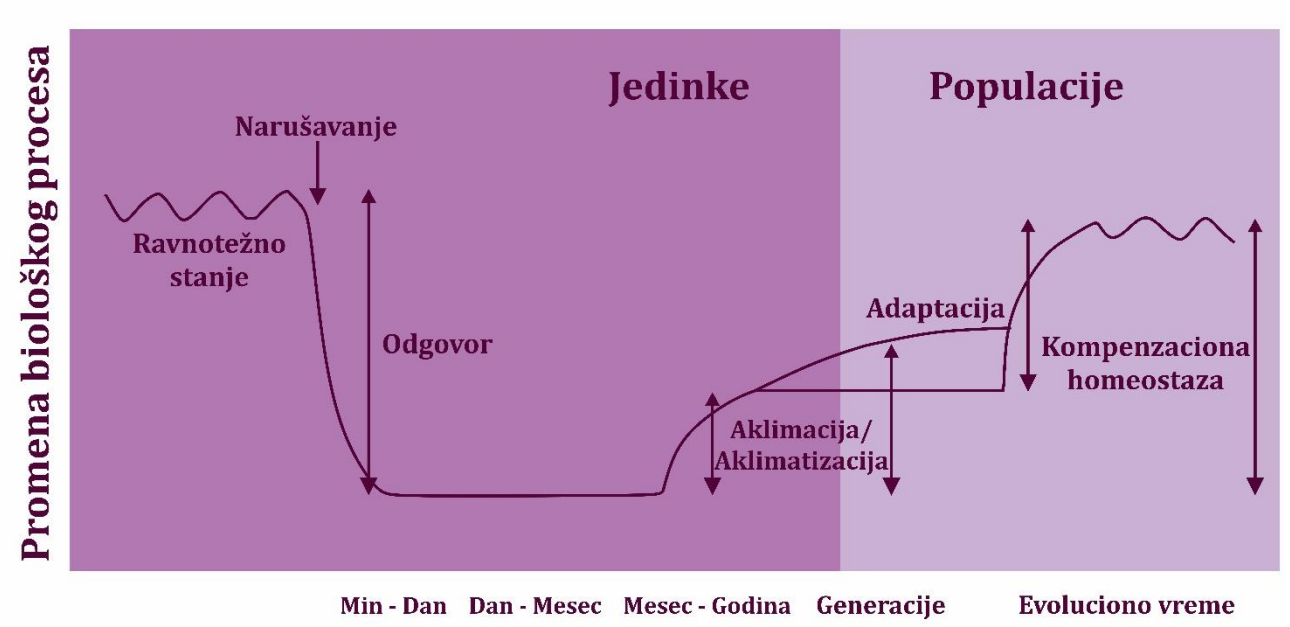
1.2.4. Odgovori biljaka na abiotičke stresore

Tokom svog životnog ciklusa one su neprestano izložene različitim stresorima, koji mogu delovati pojedinačno ili združeno (Suzuki i sar., 2014; Zandalinas i Mittler, 2022). Na

fiziološkom nivou, odgovori biljaka na stres mogu se svrstati u dve osnovne strategije: strategiju bega od promene (engl. *escape*) i strategiju otpornosti na promenu (engl. *resistance*) (Levitt, 1980; Shaar-Moshe i sar., 2019). Strategija bega podrazumeva izbegavanje izlaganja stresu kroz promene u fenologiji, rastenju i razviću, tako da se osetljive faze životnog ciklusa odvijaju u povoljnim uslovima, dok se nepovoljni periodi premošćuju stanjem smanjene metaboličke aktivnosti ili dormancije (Volaire, 2018; Shaar-Moshe i sar., 2019; Ludwig i sar., 2021). Tako biljke mogu skratiti životni ciklus i završiti razviće pre nastupanja nepovoljnih uslova, čime "izbegavaju" sušu ili temperaturni stres (Franks i sar., 2014; Volaire, 2018; Ludwig i sar., 2021). Otpornost na stres obuhvata mehanizme izbegavanja (engl. *avoidance*) i tolerancije (engl. *tolerance*) (Shaar-Moshe i sar., 2019). Mehanizmi izbegavanja podrazumevaju različite anatomske, morfološke, fiziološke i biohemijske promene koje sprečavaju ili smanjuju delovanje stresora, često uz redukciju metaboličke aktivnosti (Lambers i Oliveira, 2019; Ludwig i sar., 2021). Iako se u literaturi strategije bega i izbegavanja ponekad objedinjuju, njihovo razdvajanje ima jasnu mehanističku osnovu: beg sprečava izlaganje stresu, dok izbegavanje deluje u njegovom prisustvu (Volaire, 2018). Mehanizmi tolerancije omogućavaju održavanje osnovnih fizioloških funkcija i strukturne stabilnosti uprkos delovanju stresora, uz ograničeno narušavanje funkcija i mogućnost obnove oštećenja. Tolerancija može biti bazalna, kao rezultat adaptacije, ili stečena, kroz aklimaciju i aklimatizaciju (Sung i sar., 2003; Lambers i Oliveira, 2019; Calixto, 2025). Stečena tolerancija nastaje kao posledica prethodne izloženosti blagim stresnim uslovima (engl. *priming*), pri čemu takva izloženost povećava otpornost na kasnije, intenzivnije stresove (Bäurle, 2016; Chopra i sar., 2025). Tolerantne biljke održavaju ćelijsku homeostazu zahvaljujući metaboličkoj plastičnosti, stabilizaciji proteina i membrana, kao i aktivaciji molekularnih odbrambenih sistema (Ludwig i sar., 2021; Shaar-Moshe i sar., 2019). Stepen termotolerancije zavisi od vrste, ali i od doba dana, sezone, tkiva i razvojne faze (Dickinson i sar., 2018; Grossman, 2023). Mehanizmi izbegavanja i tolerancije nisu međusobno isključivi i mogu se kombinovati u zavisnosti od intenziteta i trajanja stresnih uslova (Lambers i Oliveira, 2019). Efikasnost ovih strategija zavisi i od vremenske skale stresa, jer kratkotrajni i dugotrajni stres izazivaju kvalitativno različite odgovore. U tom smislu razlikuju se trenutni odgovor na stres, aklimacija /aklimatizacija i adaptacija (Slika 1.2.2).

Trenutni odgovor na stres predstavlja neposredni negativni efekat stresora na fiziološke procese i javlja se u rasponu od nekoliko sekundi do nekoliko dana, često praćen opštim smanjenjem metaboličke aktivnosti (Lambers i Oliveira, 2019). Ukoliko biljka ne poseduje adekvatne mehanizme tolerancije, može doći do akutnih oštećenja, ubrzane senescencije i smrti (Lichtenthaler, 1998). Kod tolerantnih biljaka dolazi do aklimatizacije (Lambers i Oliveira, 2019), odnosno do skupa morfoloških i fizioloških modifikacija koje ublažavaju inicijalne negativne efekte stresa. Dok se aklimatizacija odnosi na odgovore biljaka u prirodnim uslovima, gde istovremeno varira više faktora sredine (Smith i Dukes, 2013; Lambers i Oliveira, 2019), aklimacija podrazumeva odgovore u eksperimentalno kontrolisanim uslovima (Kleine i sar., 2021). Tokom oba procesa, koji se odvijaju u rasponu od nekoliko dana do nekoliko nedelja, dolazi do složenih promena u hormonskoj regulaciji, sintezi odbrambenih molekula, ekspresiji gena, aktivnosti enzima i regulaciji signalnih puteva i transkripcionih faktora (Larkindale i Vierling, 2008; Wani i sar., 2016; Lambers i Oliveira, 2019; Singh i sar., 2020; Devireddy i sar., 2021; Kleine i sar., 2021; Waadt i sar., 2022). Ovi molekularni i fiziološki odgovori predstavljaju osnovu promena u rastenju, razvoju i morfologiji cele biljke (Lambers i Oliveira, 2019). Aklimatizacija i aklimacija na stres predstavljaju plastične odgovore koji se odvijaju tokom života jedinke, odnosno unutar jedne generacije. Za razliku od njih, adaptacija predstavlja evolucioni odgovor na nivou populacije, koji nastaje kao rezultat promena u genetičkoj

strukturi populacije pod delovanjem prirodne selekcije i ostvaruje se tokom višegeneracija, odnosno na evolucionoj vremenskoj skali (Lambers i Oliveira, 2019; Kristensen i sar., 2020).



Slika 1.2.2. Tipičan vremenski tok odgovora biljaka na sredinski stres

Neposredan odgovor biljaka na sredinski stres ogleda se u smanjenju intenziteta fiziološke aktivnosti. Tokom aklimacije/aklimatizacije, jedinke delimično kompenzuju uticaj stresa, tako da se nivo aktivnosti postepeno vraća ka kontrolnom nivou. Tokom evolucionog vremena populacije se adaptiraju na sredinski stres, što dovodi do dodatnog povećanja nivoa aktivnosti ka nivou nestresiranih, neadaptiranih biljaka. Ukupno povećanje aktivnosti koje proizilazi iz aklimacije/aklimatizacije i adaptacije predstavlja aktivnost *in situ* u prirodnim populacijama i odražava ukupnu homeostatsku kompenzaciju kao odgovor na sredinski stres (preuzeto i modifikovano prema: Lambers i Oliveira, 2019).

U kontekstu globalnog zagrevanja, dugoročni opstanak biljaka zavisi od procesa koji deluju na različitim biološkim nivoima i odvijaju se na različitim vremenskim skalama. U tom smislu razlikuju se tri osnovne strategije koje se međusobno ne isključuju: pomeranje areala rasprostranjenja ka staništima sa povoljnijim uslovima, genetička adaptacija i fenotipska plastičnost (Nicotra i sar., 2010; Franks i sar., 2014; Catullo i sar., 2019). Pomeranje areala rasprostranjenja koje se kod biljaka ostvaruje rasejavanjem semena, često je ograničeno prostornim dometomrasejavanja, fragmentacijom staništa, dugim generacijskim periodom, kao i mogućom neusaglašenošću sa drugim abiotičkim i biotičkim faktorima, kao što su fotoperiod i oprašivači. Zbog toga se smatra da je kod mnogih biljnih vrsta verovatnoća dovoljno brzogpomeranja areala koja bi omogućila praćenje savremenih temperaturnih promena, relativno mala (Jump i Peñuelas, 2005; Franks i sar., 2014; Scheiner i sar., 2020). Genetička adaptacija omogućava dugoročno prilagođavanje populacija novim uslovima, ali zahteva više generacija i zavisi od niza populacionih parametara, uključujući veličinu populacije, nivo genetičke varijabilnosti, protok gena i konzistentnost selekcionog pritiska (Chevin i sar., 2013; Catullo i sar., 2019). Stoga prisustvo genetičke varijabilnosti u osobinama povezanim sa temperaturom u prirodnim populacijama ne znači nužno da će do adaptacije zaista i doći, niti da će njena stopa biti usklađena sa prognoziranom stopom promene životne sredine usled globalnog zagrevanja (Jump i Peñuelas, 2005). Pored toga, adaptivni odgovor na brze promene sredine može zahtevati istovremenu evoluciju većeg broja osobina, pri čemu korelacije među njima mogu ograničiti pravac i brzinu odgovora. Uprkos visokom nivou variranja u

pojedinačnim kvantitativnim osobinama, vrste možda neće biti sposobne da adaptivno odgovore na selekcioni pritisak sredine (Jump i Peñuelas, 2005; Hoffmann i Sgrò, 2011; Kelly, 2019). U okolnostima u kojima su promene sredinskih faktora brže od stope evolucionih promena, fenotipska plastičnost predstavlja ključni mehanizam koji omogućava brze, često reverzibilne promene fenotipa unutar jedne generacije, čime biljke mogu očuvati funkcionalnost i adaptivnu vrednost u promenjenim uslovima (Nicotra i sar., 2010; Scheiner i sar., 2020). Ukoliko su plastični odgovori adaptivni, oni mogu ublažiti negativne efekte globalnog zagrevanja, smanjiti rizik od lokalnog izumiranja i potencijalno obezbediti vreme za kasniju genetičku adaptaciju (Nicotra i sar., 2010; Franks i sar., 2014). U tom smislu, fenotipska plastičnost se sve češće prepoznaje kao jedan od ključnih mehanizama kojima se biljne populacije suočavaju sa ubrzanim globalnim zagrevanjem.

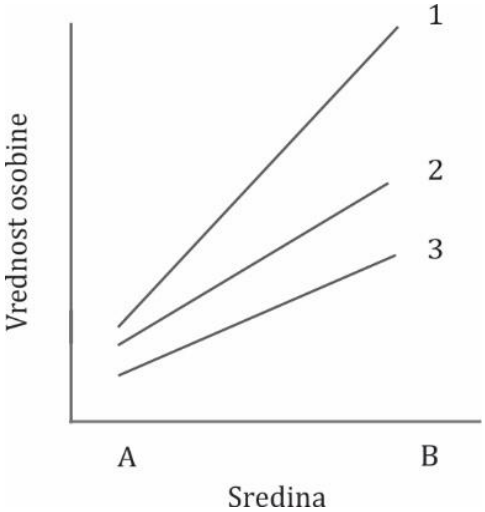
1.3. Fenotipska plastičnost

1.3.1. Definicija i osnovne karakteristike fenotipske plastičnosti

Fenotipska plastičnost predstavlja sposobnost jednog genotipa da ispolji različite fenotipove u različitim uslovima životne sredine (West-Eberhard, 1989). To podrazumeva da čak i relativno male razlike u abiotičkim i biotičkim faktorima životne sredine mogu izazvati fenotipske promene na različitim nivoima biološke organizacije, uključujući promene u anatomiji, morfologiji, fiziologiji, razviću, alokaciji resursa, fenologiji i ponašanju, koje mogu uticati na preživljavanje i reprodukciju organizama (Nicotra i sar., 2010; Forsman, 2014; Schneider, 2022). Iako se često navodi da kod biljaka morfološke i fiziološke osobine ispoljavaju veći nivo fenotipske plastičnosti, a kod životinja osobine ponašanja, ova podela nije apsolutna, već zavisi od vrste, osobine i ekološkog konteksta (Stojković i Tucić, 2012). Fenotipska plastičnost nije opšta odlika genotipa ili organizma, već je specifična za određenu osobinu ili funkcionalni skup osobina i ispoljava se kao odgovor na ispitivane uslove životne sredine (Nicotra i sar., 2010). Prisustvo i nivo fenotipske plastičnosti određene osobine nalaze se pod genetičkom kontrolom i mogu varirati među osobinama, jedinkama i populacijama (Jump i Peñuelas, 2005). Iako nijedan genotip nije potpuno neplastičan, fenotipska plastičnost nije neograničena, pa isti genotip ne ispoljava plastičnost za svaku osobinu u svim uslovima životne sredine (Nijhout, 2003; Schneider, 2022). Za opisivanje fenotipskih odgovora istog genotipa u različitim uslovima životne sredine koristi se pojam *norme reakcije*, koji predstavlja skup svih fenotipova koje taj genotip može ispoljiti u različitim sredinskim uslovima (Sultan, 1987). Najjednostavniji način prikazivanja fenotipskog odgovora jednog genotipa na različite uslove životne sredine jeste dijagram normi reakcije. Takav dijagram omogućava da se utvrdi da li među posmatranim genotipovima postoje fenotipska plastičnost, genetička varijabilnost za ispitivanu osobinu i interakcija između genotipa i sredine, odnosno varijabilnost u fenotipskoj plastičnosti. Fenotipska plastičnost se ispoljava kao promena vrednosti osobine, odnosno nagiba norme reakcije, između dve sredine, genetička varijabilnost kao razlika u vrednosti iste osobine među genotipovima u istoj sredini, dok se interakcija između genotipa i sredine prepoznaje po neparalelnim normama reakcije, što ukazuje na to da se genotipovi razlikuju u načinu na koji registruju i obrađuju sredinske signale (Sultan, 1987; Nicotra i sar., 2010; Stojković i Tucić, 2012) (Slika 1.3.1).

Postoji više karakteristika na osnovu kojih se može opisati specifičan plastični odgovor. Aktivna plastičnost podrazumeva promene u metaboličkim putevima, ekspresiji regulatornih gena ili tokovima razvića kao odgovor na sredinski signal, dok je pasivna plastičnost posledica ograničenosti resursa, alometrijskih odnosa ili ontogenetskih procesa (Forsman, 2014; Schneider, 2022). Neki oblici fenotipske plastičnosti predstavljaju brze i reverzibilne odgovore, odnosno fenotipsku fleksibilnost, koja se može ispoljavati tokom čitavog života organizma i zavisi od konteksta životne sredine. Nasuprot tome, pojedini oblici fenotipske plastičnosti

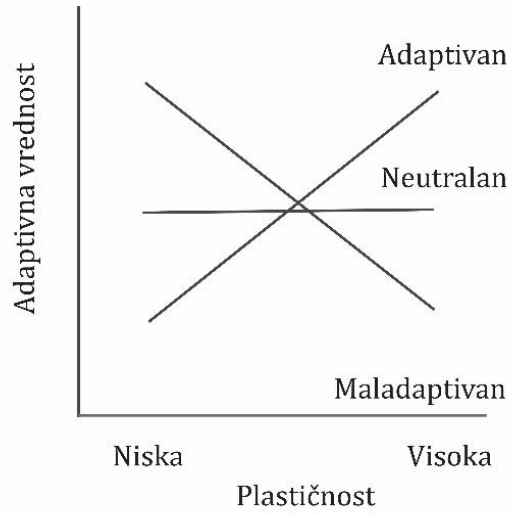
nastaju u interakciji razvojnog programa i uslova životne sredine i predstavljaju primer ireverzibilne plastičnosti (Stojković i Tucić, 2012). Pod terminom *razvojna plastičnost* podrazumevaju se ireverzibilne varijacije u osobinama nastale kao rezultat sredinski indukovanih modifikacija rastenja i razvića, koje, nakon što su indukovane, ostaju fiksirane čak i kada odgovarajući signal više nije prisutan u životnoj sredini (Forsman, 2014).



Slika 1.3.1. Norme reakcije tri genotipa za ispitivanu osobinu u dve različite sredine

Na x-osi prikazane su dve sredine (A i B), a na y-osi fenotipske vrednosti ispitivane osobine za tri genotipa (1-3). Sva tri genotipa ispoljavaju fenotipsku plastičnost, ali u različitom stepenu: genotip 1 najveću a genotip 3 najmanju. Norme reakcije genotipova 2 i 3 su paralelne, što ukazuje na isti pravac i opseg fenotipske plastičnosti, dok norma reakcije genotipa 1 nije paralelna sa ostalima, što ukazuje na postojanje genetičke varijabilnosti u plastičnosti između genotipova 1 i 2, kao i između 1 i 3)(preuzeto i prevedeno iz: Nicotra i sar., 2010).

U zavisnosti od uticaja koji fenotipska plastičnost ima na adaptivnu vrednost jedinke, razlikuju se adaptivna, neutralna i maladaptivna fenotipska plastičnost. Adaptivna plastičnost dovodi do formiranja fenotipa koji je bliži optimumu u datoj sredini, neutralna nema merljiv uticaj na adaptivnu vrednost jedinke, dok maladaptivna dovodi do formiranja fenotipa koji je udaljeniji od optimuma u datoj sredini (Slika 1.3.2) (Nicotra i sar., 2010; Stojković i Tucić, 2012).



Slika 1.3.2. Procena adaptivne vrednosti plastičnog odgovora.

Regresija mere plastičnosti na prosečnu adaptivnu vrednost pokazuje da odnos između plastičnosti i adaptivne vrednosti može biti adaptivan, neutralan ili maladaptivan (preuzeto i prevedeno iz: Nicotra i sar., 2010).

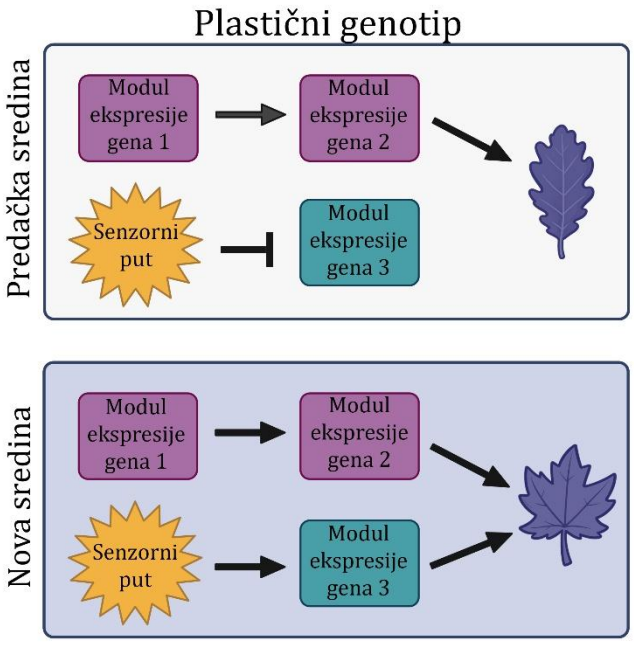
Adaptivna vrednost plastičnog odgovora zavisi od ispitivane sredine, posmatrane osobine i njenih interakcija sa drugim osobinama (Schneider, 2022). Budući da organizmi raspolažu ograničenim resursima, različiti fiziološki i razvojni procesi često se nalaze u odnosu uzajamnog ograničavanja (engl. *trade-off*), jer zahtevaju iste energetske i materijalne resurse unutar jedne jedinke (Stearns, 1989; DeWitt i sar., 1998). Zbog toga sposobnost organizma da plastično odgovori na variranja uslova životne sredine nije neograničena (DeWitt i sar., 1998; Van Kleunen i Fischer, 2005; Valladares i sar., 2007). Naime, odgovor plastičnog genotipa zahteva uključivanje većeg broja elemenata u molekularne, biohemijske, razvojne i fiziološke puteve, a samim tim i veći utrošak materije, energije i vremena nego odgovor fiksnog,

neplastičnog, genotipa (DeWitt i sar., 1998; Valladares i sar., 2007; Stojković i Tucić, 2012). Ovi dodatni zahtevi ukazuju na to da fenotipska plastičnost može biti praćena određenim troškovima, odnosno cenom plastičnosti. Cena fenotipske plastičnosti definiše se kao smanjenje adaptivne vrednosti plastičnog genotipa u odnosu na neplastičan genotip koji u istoj sredini ostvaruje isti prosečan fenotip (DeWitt i sar., 1998). Razlikuje se najmanje pet tipova cene plastičnosti: cena produkcije, odnosno izgradnje određene strukture ili osobine, cena održavanja plastičnosti, cena prikupljanja informacija iz sredine, cena nestabilnosti razvića i genetička cena, povezana sa pleiotropijom, epistazom ili vezanošću gena (DeWitt i sar., 1998; Valladares i sar., 2007). Ograničenja fenotipske plastičnosti odnose se na biološke i ekološke faktore koji smanjuju ili ograničavaju opseg mogućih fenotipskih promena koje jedan genotip može ostvariti u različitim uslovima životne sredine (DeWitt i sar., 1998; Van Kleunen i Fischer, 2005; Valladares i sar., 2007). U ograničenja fenotipske plastičnosti ubrajaju se pouzdanost informacija, odnosno sredinskih signala o promenama u sredini, kašnjenje između promene sredine i fenotipskog odgovora, kao i ograničenja razvojnog opsega (DeWitt i sar., 1998; Valladares i sar., 2007). Uopšteno posmatrano, selekcija favorizuje plastičnost kada su promene životne sredine česte, kada ista osobina ima različite optimalne vrednosti u različitim sredinskim uslovima, kada su dostupni pouzdani signali promena u lokalnoj sredini i kada korist plastičnosti, odnosno povećavanje adaptivne vrednosti, nadmašuje njenu cenu (Ehrenreich i Pfennig, 2016). Uzajamna ograničenja, cena plastičnosti, kanalisanost razvića i adaptivna vrednost plastičnog odgovora u određenoj životnoj sredini predstavljaju razloge zbog kojih ne postoji „Darvinov demon“- organizam generalista, sposoban da u svim staništima, nezavisno od abiotičkih i biotičkih faktora, ostvaruje neograničenbroj potomaka i poseduje beskonačno dug životni vek (Stojković i Tucić, 2012).

1.3.2. Genetička osnova fenotipske plastičnosti

Plastičnost određene osobine predstavlja posebnu osobinu organizma sa sopstvenom genetičkom osnovom, koja je delimično nezavisna od genetičke osnove same posmatrane osobine. Dakle, selekcija deluje i na osobinu koja se prati i na samu normu reakcije, odnosno na oblik i opseg sredinski indukovanog plastičnog odgovora (Stojković i Tucić, 2012; Cooper i sar., 2022). U odgovoru na promene u životnoj sredini, regulatorni geni uključeni u ispoljavanje fenotipske plastičnosti određene osobine regulišu ekspresiju gena koji neposredno određuju stanje same osobine, odnosno strukturnih gena (Stojković i Tucić, 2012). Varijabilnost regulatornih gena, kao i njihov položaj u mreži regulatornih interakcija, podložni su delovanju prirodne selekcije nezavisno od evolucionih promena same osobine, odnosno gena koji neposredno određuju njeno ispoljavanje. Sa druge strane, fenotipska promena osobine uslovljena faktorima sredine podrazumeva promene u ekspresiji gena koji leže u osnovi date osobine, kako u kvantitativnom, tako i u kvalitativnom smislu. Iako je plastičnost delimično nezavisna od same osobine za koju je definisana, evolucija osobine i njena plastičnost predstavljaju kompleksno povezane fenomene koji koevoluiraju u populacijama koje naseljavaju prostorno i vremenski heterogenu životnu sredinu (Stojković i Tucić, 2012; Goldstein i Ehrenreich, 2021). Jedno od uočenih pravila u koevoluciji osobine i njene plastičnosti je Džinks-Konolijevo pravilo (engl. *Jinks-Connolly rule*), prema kojem osobine koje su sinergistički selektovane ispoljavaju veću plastičnost od osobina koje su antagonistički selektovane, pri čemu se sinergistička selekcija odvija u istom smeru kao i plastični odgovor u datoj sredini, a antagonistička u smeru suprotnom od njega (Jinks i Connolly, 1973, 1975; Falconer, 1990; Stojković i Tucić, 2012).

Molekularna biologija nastoji da rasvetli genetičku osnovu fenotipske plastičnosti analizom molekulskih puteva signalne transdukcije uključenih u svaki konkretan tip plastičnog odgovora (Ehrenreich i Pfennig, 2016). Da bi se pokrenuo plastični odgovor na promenu signala iz životne sredine, bilo spoljašnje ili unutrašnje prirode, organizam mora taj signal da detektuje, integriše i na njega odgovori, pri čemu se aktiviraju različiti molekularni putevi povezani sa plastičnim promenama na nivou organizma (Aubin-Horth i Renn, 2009). Odgovor započinju sistemi koji detektuju sredinski signal i prosleđuju ga u unutrašnjost biološke strukture, gde on zatim pokreće biohemijski odgovor koji značajno menja ćelijske aktivnosti i dovodi do promena u nivou transkripcije gena. Te promene mogu obuhvatiti izmenu funkcije enzima u signalnim kaskadama molekularnih puteva, promene afiniteta i mesta vezivanja transkripcionih faktora za *cis*- i *trans*- regulatorne sekvence, aktivaciju transpozona, epigenetičke promene koje utiču na transkripcionu aktivnost, kao i postranslacione modifikacije sintetisanih proteina. Kao krajnji ishod ovih procesa dolazi do promene obrasca genske ekspresije i formiranja novog fenotipa (Aubin-Horth i Renn, 2009; Nicotra i sar., 2010; Stojković i Tucić, 2012). Najveće promene u ekspresiji gena nastaju usled promena u vezivanju transkripcionih faktora na promotor i druge regulatorne elemente, što dovodi do aktivacije različitih gena i može rezultirati nastankom novog fenotipa (Slika 1.3.3) (Nijhout, 2003; Aubin-Horth i Renn, 2009; Ehrenreich i Pfennig, 2016). Odvijanje ovih procesa u realnim biološkim sistemima veoma je složeno i teško za praćenje (Ehrenreich i Pfennig, 2016). Sredinski stimulus može izazvati promene na svim nivoima regulacije genske ekspresije, što dodatno povećava složenost proučavanja mehanizama plastičnosti. Na primer, strukturne promene u *cis*- i *trans*-regulatornim sekvencama, uslovljene sredinskim signalom, mogu značajno promeniti afinitet vezivanja transkripcionih faktora za DNK, čime utiču na ekspresiju jednog, ali često i većeg broja gena. Ako se ima u vidu da već na ovom nivou regulacije učestvuje veliki broj različitih molekula sa diferencijalnom osetljivošću na sredinske stimuluse, a da tome treba dodati i druge nivoe regulacije, kao što je, na primer, regulacija genske ekspresije nekodirajućim RNK molekulima, postaje jasno koliko molekularna mreža pokrenuta sredinskim stimulusom može biti složena (Ehrenreich i Pfennig, 2016). Dakle, varijabilnost u plastičnosti neke osobine rezultat je interakcije genotipa i sredine, odnosno međudejstva sredinskih signala i svih skupova genskih lokusa koji reaguju na životnu sredinu individue, pri čemu njihovi efekti mogu biti aditivni ili epistatički (Goldstein i Ehrenreich, 2021).



Slika 1.3.3. Modularna ekspresija gena zavisna od signala iz sredine

U novoj sredini aktivacija senzornog puta pokreće dodatni modul ekspresije gena, što dovodi do formiranja novog fenotipa u odnosu na predačku sredinu (preuzeto i modifikovano prema: Ehrenreich i Pfennig 2016).

Još jedan važan nivo regulacije fenotipske plastičnosti jeste epigenetički nivo. Različiti sredinski faktori mogu indukovati promene u obrascima metilacije DNK, organizaciji hromatina, aktivnosti nekodirajućih RNK i transkripcionoj aktivaciji transpozona (Stojković i Tucić, 2012).

Epigenetička informacija, preko kontrole razvojnih procesa i fenotipske plastičnosti, učestvuje u adaptivnim odgovorima na sredinski stres. U stresnim uslovima dolazi do promena u ekspresiji gena koji kodiraju epigenetičke regulatore, kao što su DNK metilaze, DNK demetilaze i histon demetilaze, što dovodi do remodelovanja i reprogramiranja epigenoma u celini (Gallusci i sar., 2017).

Iako je mehanizam formiranja plastičnog fenotipa u osnovi sličan kod svih organizama, budući da uključuje iste grupe gena koje utiču na ekspresiju homeotičnih gena, kao i homologe gena koji kodiraju histone, između biljaka i životinja ipak postoje fundamentalne razlike koje prvenstveno proističu iz njihovog različitog načina života. Za biljke je prilagođavanje promenama životne sredine posebno izazovno zbog sesilnog načina života i odsustva nervne transmisije signala (Lachowiec i sar., 2016). Pored toga, u mnogim staništima prostorno-vremensko variranje sredinskih faktora ima finu granulaciju, tako da se različiti organi biljke mogu nalaziti u različitim mikrosredinama (De Kroon i sar., 2005). Biljke su ove izazove prevazišle zahvaljujući otvorenom razviću i modularnoj organizaciji organa, pa i čitavog organizma. Time je omogućeno lokalno ispoljavanje fenotipske plastičnosti, na nivou pojedinačnih modula. U ovom kontekstu, moduli predstavljaju poluautonomne strukturne i/ili funkcionalne komponente, kao što su listovi, korenovi, cvetovi ili pojedinačni meristemi (De Kroon i sar., 2005; Schneider, 2022). Zbog modularne organizacije, odgovor biljke na okolinu može se posmatrati kao zbir odgovora pojedinačnih modula na lokalne uslove, kao i efekata njihovih međusobnih interakcija koje proističu iz integracije. Moduli mogu biti međusobno povezani u različitom stepenu, a komunikacija između njih, na primer putem hormona, može uticati na nivo ispoljene plastičnosti: s jedne strane, može povećati ili smanjiti plastičnost pojedinačnog modula, a s druge strane može menjati razlike između integrisanih modula izloženih različitim mikrosredinskim uticajima (De Kroon i sar., 2005).

1.3.3. Evolucija fenotipske plastičnosti

Izmenjeni uslovi životne sredine, poput onih nastalih usled globalnog zagrevanja, mogu dovesti ne samo do promena srednjih vrednosti osobina, odnosno plastičnosti odgovora, već i do evolucije same plastičnosti. Tokom vremena, osobine mogu postajati manje ili više plastične, u zavisnosti od pravca i intenziteta selekcionih pritisaka, kao i od strukture i predvidljivosti sredinskog variranja (Franks i sar., 2014; Kelly, 2019; Stollewerk i sar., 2025). Ukoliko se genetički različite jedinke u populaciji razlikuju i u osetljivosti i/ili načinu odgovora na faktore životne sredine, variranje sredinskih faktora može dovesti do razlika u nivou genetičke i fenotipske varijabilnosti ispitivane osobine u populaciji (Stojković i Tucić, 2012; Stollewerk i sar., 2025). Širok raspon variranja u ispoljavanju osobina unutar vrste može nastati kao rezultat istorijskih demografskih procesa, ali i prostorne i vremenske heterogenosti staništa, koji vrše različite selekcione pritiske u različitim delovima areala vrste (Cooper i sar., 2022). Tokom vremena, subpopulacije mogu postati genetički i fenotipski divergentne usled delovanja genetičkog drifta, protoka gena, mutacija i prirodne selekcije. Budući da prirodna selekcija deluje i na samu osobinu i na njenu fenotipsku plastičnost, promenljivost u jačini i smeru selekcionih pritisaka može stvarati mozaik srednjih vrednosti osobine i njene plastičnosti širom areala vrste (Kelly, 2019; Cooper i sar., 2022). Zbog toga adaptivna evolucija individualnih osobina i evolucija njihove plastičnosti mogu na različite načine uticati na opstanak populacije u promenljivoj sredini, jer oba procesa menjaju opseg fenotipova koje populacija može da ispolji (Kelly, 2019a).

Savremeni teorijski i empirijski radovi ukazuju na to da evolucija fenotipske plastičnosti u velikoj meri zavisi od obrasca sredinskog variranja. Očekuje se da će plastičnost biti izraženija u heterogenim i relativno predvidljivim sredinama, u kojima sredinski signali pouzdano najavljuju promenu uslova, dok u homogenim ili nepredvidljivim sredinama može doći do

njenog smanjenja usled troškova održavanja plastičnosti ili pojave maladaptivnih odgovora (DeWitt i sar., 1998; Lande, 2009; Stollewerk i sar., 2025). U uslovima ekstremnih klimatskih događaja, koji izlaze iz opsega istorijskog variranja, predviđa se i mogućnost brze evolucije plastičnosti, jer povećana plastičnost može približiti fenotip novom selekcionom optimumu i time povećati verovatnoću opstanka populacije (Lande, 2009; Franks i sar., 2014; Kelly, 2019). Međutim, ovakav scenario zavisi od oblika normi reakcije, genetičke varijanse i kovarijanse osobina, kao i od međusobne povezanosti plastičnih odgovora više osobina koje zajedno određuju adaptivnu vrednost u novoj sredini (Cooper i sar., 2022; Gómez i sar., 2025). Takođe, iako se plastičnost često proučava na pojedinačnim osobinama, vrste u prirodi na promene životne sredine najčešće odgovaraju istovremenom fenotipskom plastičnošću više osobina. Zbog toga plastičnost jedne osobine može uticati na plastičnost druge, menjajući optimalni multivarijatni plastični odgovor i adaptivnu vrednost u novoj sredini (Nielsen i Papaj, 2022). Korelacije između plastičnosti različitih osobina mogu ograničiti evoluciju plastičnosti, što može rezultovati određenim fenotipskim strategijama ili rešenjima. Svi ovi procesi zajedno generišu heterogeni pejzaž u kome selekcioni gradijenti mogu dovesti do značajnih razlika u plastičnosti duž gradijenta sredinskih uslova (Cooper i sar., 2022).

Kao evolucioni odgovor na sredinski indukovanu fenotipsku promenu može se javiti proces naslednih promena poznat kao *genetička akomodacija*. Ona podrazumeva da je osobina inicijalno bila plastična i da je prirodna selekcija delovala na njenu normu reakcije (Stojković i Tucić, 2012). Genetička akomodacija može se definisati kao evolucioni mehanizam kojim novi fenotipovi, nastali promenama unutrašnje sredine, tj. genetičkim promenama, ili spoljašnje sredine, tj. delovanjem sredinskih faktora, putem niza kvantitativno-genetičkih promena postaju adaptivni (West-Eberhard, 2020). *Genetička asimilacija* predstavlja specifičan oblik genetičke akomodacije u kom osobina koja je prvobitno reagovala na sredinske uticaje, odnosno bila plastična, gubi ekološku osetljivost i postaje fiksirana i konstitutivno ispoljena u populaciji, nezavisno od daljih promena uslova životne sredine (Lande, 2009; Ehrenreich i Pfennig, 2016; Kelly, 2019).

Iako je danas jasno da fenotipska plastičnost i njena evolucija imaju ključnu ulogu u odgovoru biljaka na globalno zagrevanje i njegove posledice, kvantitativna predviđanja brzine i obima tih odgovora u prirodnim populacijama i dalje predstavljaju veliki izazov (Franks i sar., 2014; Merilä i Hendry, 2014; Nicotra i sar., 2010). U novijoj literaturi naglašava se da plastičnost može omogućiti kratkoročno prilagođavanje promenljivim uslovima, ali da njena efikasnost i adaptivna vrednost zavise od genetičkog variranja, predvidljivosti sredine i interakcija između više osobina (Bonamour i sar., 2019; Laitinen, 2024; Stollewerk i sar., 2025). Čak i kada su plastični ili evolucioni odgovori prisutni, oni ne moraju biti dovoljno brzi ni dovoljno izraženi da u potpunosti prate promene sredinskih uslova, što može dovesti do neusklađenosti između fenotipa i sredine i ugroziti dugoročnu stabilnost populacija, uz povećan rizik od smanjenja adaptivne vrednosti ili lokalnog izumiranja (Jump i Peñuelas, 2005; Chown i sar., 2010; Franks i sar., 2014; Merilä i Hendry, 2014; Stollewerk i sar., 2025).

1.4. Fenotipska integracija

U biološkim sistemima osobine organizma ne funkcionišu izolovano, već su međusobno povezane različitim razvojnim, funkcionalnim i genetički uslovljenim odnosima (Klingenberg, 2008; Armbruster i sar., 2014; Klingenberg, 2014; Schneider, 2022). Fenotipski odgovor organizma na promene životne sredine stoga uključuje usklađene promene većeg broja međusobno povezanih osobina. Razumevanje koordinisanosti i međusobne povezanosti grupa osobina u odgovoru na sredinske promene zasniva se na konceptima modularnosti i fenotipske integracije (Schlichting i Pigliucci, 1998; Pigliucci, 2003; Armbruster i sar., 2014; Klingenberg, 2014). Modularnost podrazumeva postojanje relativno autonomnih skupova međusobno

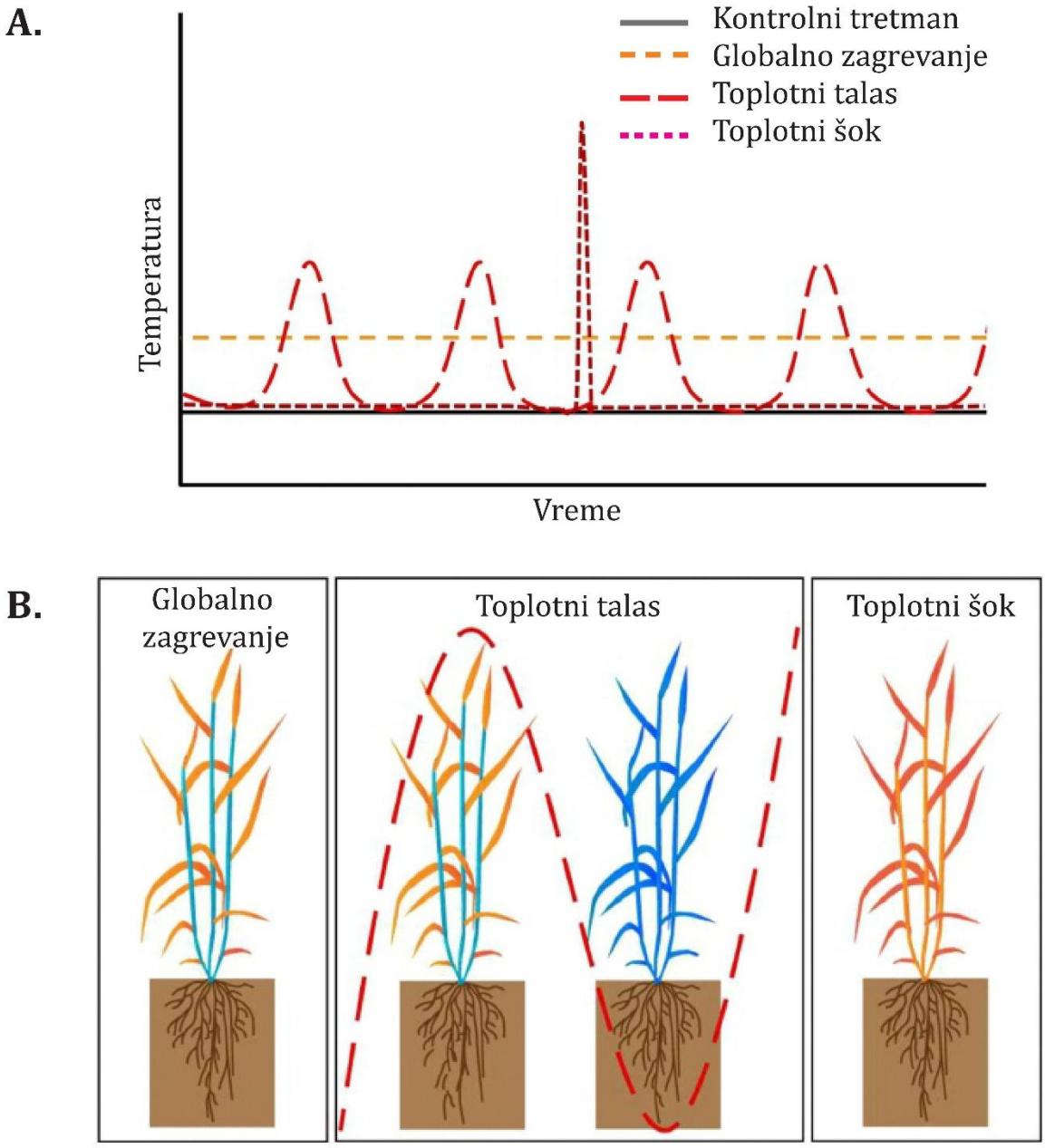
povezanih osobina, odnosno modula, koji određuju specifičnu strukturu, proces ili put (Murren, 2002; Klingenberg, 2008; Murren, 2012). Fenotipska integracija, s druge strane, opisuje obrazac i jačinu povezanosti, odnosno kovarijacije, između osobina, kako unutar pojedinačnih modula, tako i između različitih modula organizma (Murren, 2002; Pigliucci, 2003; Klingenberg, 2008; Armbruster i sar., 2014; Stotz i sar., 2025). Na osnovu funkcionalne povezanosti, osobine organizma mogu se posmatrati kao integrisane, odnosno uzajamno visoko korelisane, ili neintegrisane, odnosno funkcionalno i razvojno nezavisne (Wagner, 2001; Pigliucci, 2003; Armbruster i sar., 2014). Fenotipska integracija predstavlja dinamično svojstvo fenotipa, jer se obrasci odnosa između osobina mogu menjati tokom razvića i u zavisnosti od sredinskih uslova (Murren, 2002; Armbruster i sar., 2014).

Stepen fenotipske integracije može imati značajne ekološke i evolucione posledice, jer kovarijacije između osobina mogu obezbediti koordinisan odgovor složenog fenotipa na selekcione pritiske, ali istovremeno mogu umanjiti nezavisnu varijaciju pojedinačnih osobina. Na osnovu ovog teorijskog okvira dugo je postojala hipoteza da visok stepen integracije između osobina unutar modula može ograničiti opseg fenotipskih promena pojedinačnih osobina, a time i njihov plastični odgovor na promene sredine (Schlichting i Pigliucci, 1998; Pigliucci, 2003; Gianoli i Palacio-López, 2009; Armbruster i sar., 2014; Damián i sar., 2020). Međutim, rezultati eksperimentalnih istraživanja nisu jednoznačni. Mali broj studija eksplicitno je potvrdio negativnu povezanost između fenotipske integracije i fenotipske plastičnosti (Gianoli i Palacio-López, 2009; Yang i sar., 2024), dok su druge pokazale neutralan ili pozitivan odnos između ovih svojstava (Zimmermann i sar., 2016; Matesanz i sar., 2021; Oyanoghafo i sar., 2023; He i sar., 2024; Stotz i sar., 2025). Na primer, Matesanz i saradnici (2021) nisu pronašli dokaze da fenotipska integracija predstavlja unutrašnje ograničenje obima plastičnosti osobina, već su pokazali da razlike u plastičnim odgovorima među osobinama mogu biti praćene reorganizacijom obrazaca njihove kovarijacije između sredina. U skladu s tim, Stotz i saradnici (2025) su, na osnovu meta-analize koja je obuhvatala 156 studija slučaja, zaključili da jače integrisane osobine nisu nužno manje plastične, ali da veća integracija može biti povezana sa manjom varijabilnošću plastičnih odgovora među osobinama, što se ispoljava kao veća korelisanost, odnosno koordinisanost plastičnih odgovora. Pored toga, u uslovima stresa nije uočen konzistentan obrazac promena fenotipske integracije (Stotz i sar., 2025). Razumevanje promena plastičnosti osobina, njihove integracije i njihovog međusobnog odnosa u odgovoru na povišenu temperaturu zahteva pažljivo osmišljene eksperimentalne pristupe. Izbor eksperimentalnog režima, pre svega u pogledu intenziteta i trajanja temperaturne promene, određuje koje tipove biljnih odgovora je moguće kvantifikovati u kontrolisanim ili prirodnim uslovima.

1.5. Eksperimentalni pristupi u izučavanju biljnih odgovora na povišenu temperaturu

Iako se povišena temperatura često posmatra kao jedinstven abiotički stresor, odgovori biljaka na njen porast obuhvataju različite tipove molekularnih i fizioloških odgovora, koji zavise od intenziteta i dinamike temperaturne promene. Umereno ili postepeno zagrevanje može indukovati termomorfogenetske, regulatorne i metaboličke odgovore, dok nagle ili intenzivne temperaturne promene dovode do aktivacije odgovora na toplotni šok (HSR, engl. *Heat Shock Response*), kao specifičnog zaštitnog mehanizma ćelije (Kan i sar., 2023). S obzirom na to da ne postoji jasna temperaturna granica između ovih tipova odgovora, pojam toplotnog stresa u biljnoj fiziologiji nije jednoznačno definisan i u literaturi se koristi za označavanje različitih eksperimentalnih režima koji se međusobno razlikuju pre svega po trajanju izlaganja i veličini temperaturne promene kojoj je biljka izložena (Wahid i sar., 2007; Geange i sar., 2021; Jagadish i sar., 2021). Razlike u ovim parametrima dovode do kvalitativno i kvantitativno različitih

biljnih odgovora, zbog čega izbor eksperimentalnog pristupa predstavlja važan konceptualni okvir koji određuje koji nivoi organizacije i koji mehanizmi odgovora mogu biti obuhvaćeni. Na nivou eksperimentalnog dizajna, intenzitet i trajanje temperaturnog stresa najčešće su u inverznom odnosu, tako da kratkotrajni tretmani obično podrazumevaju više temperature, dok su dugotrajniji tretmani najčešće povezani sa blažim porastom temperature (Colombo i Timmer, 1992; Nuttall i sar., 2018). U skladu sa tim, u literaturi se razlikuju tri osnovna tipa ekperimenata manipulacije temperaturom: toplotni šok, toplotni talasi i eksperimenti zagrevanja (Jagadish i sar., 2021) (Slika 1.5.1).



Slika 1.5.1. Tipovi ekspeirmenata manipulacije temperaturom kod biljaka

(**A.**) Konceptualni prikaz razlika u trajanju i intenzitetu temperaturnih promena u ekperimentima toplotnog šoka, toplotnih talasa i zagrevanja u odnosu na kontrolni tretman; u scenarijima toplotnog šoka i toplotnih talasa prikazani su i periodi oporavka, kada se temperatura vraća na kontrolni nivo. (**B.**) Temperature koje biljka doživljava u različitim tipovima eksperimenata manipulacije temperaturom označene su različitim bojama:plava - optimalna, narandžasta - umereno povišena, crvena - jako povišena (Preuzeto i prevedeno: Jagadish i sar., 2021).

Toplotni šok predstavlja kratkotrajno izlaganje biljaka, u trajanju od nekoliko minuta do nekoliko sati, temperaturama koje su za 20 °C ili više iznad optimalne temperature potrebne za rastenje i razviće određene vrste (Jagadish i sar., 2021). Eksperimenti toplotnog šoka predstavljaju najčešći oblik proučavanja toplotnog stresa kod gajenih i divljih vrsta (Geange i sar., 2021). Ovom vrstom stresa prvenstveno se bave molekularna istraživanja, u kojima se ispituju rani odgovori biljaka, poput brze sinteze proteina toplotnog stresa (Hsp, engl. *Heat shock proteins*), koja počinje već nekoliko minuta nakon detekcije stresora (Yadav i sar., 2020). U velikom broju studija ovog tipa pojam toplotnog stresa praktično je izjednačen sa toplotnim šokom, što je važno imati u vidu prilikom upoređivanja rezultata različitih istraživanja (Mittler i sar., 2012; Geange i sar., 2021). Pored Hsp, u eksperimentima toplotnog šoka često se ispituju i mehanizmi percepcije temperaturnih promena, kao i rani odgovori biljaka na oksidativni stres, uključujući stabilnost ćelijskih membrana i promene u aktivnosti antioksidativnih enzima (Suzuki i Mittler, 2006; Wahid i sar., 2007; Kan i sar., 2023). Iako eksperimenti toplotnog šoka nisu ekološki realistični, oni pružaju važne uvide u mehanizme detekcije temperaturnog signala i procese koji leže u osnovi razvoja tolerancije biljaka na akutni toplotni stres (Jagadish i sar., 2021).

U eksperimentima toplotnog talasa, biljke se izlažu temperaturama vazduha koje su za 5-10 °C više od optimalne temperature za rastenje, u trajanju od nekoliko sati do nekoliko dana, često uz ponavljanje toplotnog stresa nakon perioda oporavka (Jagadish i sar., 2021). Ovakvi eksperimenti omogućavaju uvid u odgovore biljaka tokom ključnih faza razvića, kao što su cvetanje (Prasad i Jagadish, 2015) i sazrevanje semena (Impa i sar., 2021). Iako su ekološki realističniji od eksperimenata toplotnog šoka, oni i dalje najčešće podrazumevaju manipulaciju jednog abiotičkog faktora, bez istovremenih promena drugih sredinskih uslova, poput dostupnosti vode ili intenziteta zračenja, koje u prirodnim uslovima često prate toplotne talase (De Boeck i sar., 2010; Impa i sar., 2021). Uprkos tome, ovakvi pristupi imaju poseban značaj, jer omogućavaju proučavanje uticaja ekstremnih temperaturnih događaja, čije posledice po žive organizme mogu biti snažnije i neposrednije od onih izazvanih postepenim promenama prosečnih klimatskih uslova (Jentsch i sar., 2007; Teskey i sar., 2015).

U eksperimentima zagrevanja, biljke se izlažu povišenim temperaturama tokom perioda od nekoliko nedelja do nekoliko godina, a pokad i tokom čitavog životnog ciklusa, pri čemu je porast temperature vazduha relativno mali i najčešće se kreće u rasponu od 2 °C do 6 °C (Jagadish i sar., 2021). Ovakav stepen zagrevanja uspostavlja umerene, hronične temperaturne uslove koji omogućavaju aklimaciju/aklimatizaciju i razvoj stečene termotolerancije na temperaturama iznad optimalnih, ali ispod onih koje izazivaju ozbiljnija oštećenja ćelijskih struktura (Wahid i sar., 2007; Mittler i sar., 2012; Röth i sar., 2015). Eksperimenti zagrevanja prvenstveno su usmereni na razumevanje načina na koji se biljke prilagođavaju porastu temperature povezanom sa globalnim zagrevanjem, pri čemu se većina studija fokusira na rastenje, opšte stanje biljaka i njihove ekofiziološke odgovore (Jagadish i sar., 2021). Analize dosadašnje literature ukazuju na to da su, za razliku od kratkotrajnih studija toplotnog šoka, u dugotrajnim eksperimentima zagrevanja molekularni, biohemijski i metabolički odgovori znatno ređe obuhvaćeni, što otežava direktno poređenje rezultata dobijenih primenom ova dva tipa eksperimentalnih pristupa. Iako se različiti eksperimentalni pristupi manipulaciji temperaturom razlikuju po trajanju, intenzitetu i stepenu ekološke realističnosti, mnogi mehanizmi biljnog odgovora na povišenu temperaturu zajednički su različitim tipovima temperaturnog stresa, pri čemu se slični signalni putevi aktiviraju u različitim vremenskim okvirima (Jagadish i sar., 2021). Budući da se adaptivni odgovori biljaka na povišenu temperaturu formiraju kroz procese koji se odvijaju na više vremenskih skala, integracija molekularnih, biohemijskih i fizioloških podataka predstavlja ključni korak ka razumevanju kapaciteta biljaka za aklimaciju/aklimatizaciju i adaptaciju na temperaturne promene, kao i ka pouzdanijem predviđanju njihovih odgovora na posledice globalnog zagrevanja (Jagadish i sar.,

2021). U tom kontekstu, novija istraživanja sve češće nastoje da povežu odgovore biljaka na dugotrajno zagrevanje sa mehanizmima identifikovanim u eksperimentima toplotnog šoka, iako su takvi integrativni pristupi i dalje relativno retki u poređenju sa klasičnim ekofiziološkim analizama (Glaubitz i sar., 2017; Davies i sar., 2018; Wang i sar., 2020; Pineda i sar., 2024; Min i sar., 2025).

Dodatna razlika između eksperimentalnih pristupa u proučavanju biljnih odgovora na povišenu temperaturu odnosi se na stepen kontrole sredinskih faktora i očuvanosti prirodnog ekološkog konteksta tokom izvođenja eksperimenta. U tom smislu, istraživanja se mogu sprovoditi kao *ex situ* eksperimenti, u kojima se biljke gaje u kontrolisanim uslovima van prirodnog staništa, ili kao *in situ* eksperimenti, koji se izvode direktno u prirodnom okruženju biljaka (Poorter i sar., 2012; Jacobs i Latimer, 2012; De Boeck i Nijs, 2017). *Ex situ* eksperimenti se najčešće sprovode u staklenicima, komorama za gajenje biljaka ili laboratorijama, gde je moguće precizno manipulisati pojedinačnim sredinskim faktorima i obezbediti visoku ponovljivost eksperimentalnih uslova (Jacobs i Latimer, 2012; Poorter i sar., 2012). Međutim, ovakvi pristupi često ne obuhvataju prirodnu prostornu i vremensku varijabilnost sredine i mogu uključivati uslove koji se značajno razlikuju od onih u prirodnom staništu, što može ograničiti ekološku relevantnost dobijenih rezultata i dovesti do pojave artefaktnih odgovora koji se ne javljaju u prirodi (Jacobs i Latimer, 2012; Poorter i sar., 2012). Nasuprot tome, *in situ* eksperimenti omogućavaju ispitivanje biljnih odgovora u kompleksnim i promenljivim uslovima prirodnog staništa, odnosno u realnom ekološkom kontekstu. Ipak, ovi pristupi ograničeni su manjim stepenom kontrole sredinskih faktora, izraženijim uticajem nekontrolisanih varijabli, otežanim razdvajanjem efekata pojedinačnih stresora usled kovariranja faktora u prirodi, kao i povećanim rizikom od oštećenja eksperimentalne postavke (Jacobs i Latimer, 2012; Poorter i sar., 2012; De Boeck i Nijs, 2017). Zbog toga se *ex situ* i *in situ* pristupi u savremenim istraživanjima globalnog zagrevanja posmatraju kao komplementarni, pri čemu njihova kombinacija omogućava potpunije razumevanje biljnih odgovora na povišenu temperaturu (Jacobs i Latimer, 2012; Jagadish i sar., 2021).

U okviru *in situ* eksperimentalnih postupaka manipulacije temperaturom razlikuju se aktivni i pasivni pristupi. Aktivni sistemi direktno kontrolišu protok energije, na primer primenom električnih grejnih kablova, cevi zagrejanih fluidom, infracrvenih grejača ili korišćenjem zatvorenih eksperimentalnih postavki, kao što su mali kontrolisani staklenici, dok se pasivni sistemi zasnivaju na akumulaciji solarne energije, kao što je slučaj sa pokrivačima tla, plastičnim staklenicima i komorama otvorenog vrha (Marion i sar., 1997). Komore otvorenog vrha (OTC, engl. *Open-Top Chamber*) predstavljaju jedan od najčešće korišćenih metoda za manipulaciju temperaturom u prirodnim uslovima (Molau i Mølgaard, 1996; Marion i sar., 1997). OTC-i su poluotvorene konstrukcije, najčešće cilindričnog ili poligonalnog oblika, koje omogućavaju pasivno zagrevanje vazduha, a time i biljaka, unutar komore, usled smanjenog gubitka toplote i izmenjene razmene energije sa okolinom, pri čemu je istovremeno očuvan direktan kontakt sa spoljašnjim uslovima sredine (Marion i sar., 1997). Ovaj tip komora prvobitno je razvijen u okviru međunarodne ITEX inicijative (engl. *International Tundra Experiment*) za proučavanje efekata klimatskog zagrevanja u ekosistemima tundre, ali je kasnije široko primenjen i u drugim prirodnim sistemima, uključujući livadske, stepske, alpske i subarktičke zajednice (Molau i Mølgaard, 1996; Arft i sar., 1999; Hollister i sar., 2023). OTC-i se mogu razlikovati po dimenzijama, broju stranica i korišćenim materijalima, ali im je zajedničko to da omogućavaju umereno pasivno povećanje temperature, najčešće u rasponu od 1 °C do 2 °C iznad ambijentalnih uslova, pri čemu stepen zagrevanja zavisi od lokalne klime i sezonskih uslova (Marion i sar., 1997; Hollister i Webber, 2000). Njihova osnovna prednost ogleda se u mogućnosti dugotrajnog izvođenja eksperimenata direktno u prirodnom staništu, uz nisku cenu i jednostavnu terensku postavku, bez potrebe za aktivnim izvorima energije, što omogućava proučavanje biljnih odgovora u ekološki realističnom kontekstu uz relativno mali

broj eksperimentalnih artefakata (Molau i Mølgaard, 1996; Marion i sar., 1997; Arft i sar., 1999). Istovremeno, poznato je da OTC-i, pored temperature, mogu u određenoj meri uticati i na druge mikroklimatske faktore, uključujući smanjenje brzine vetra, promene u vlažnosti vazduha i/ili zemljišta, kao i modifikaciju svetlosnih uslova, što može otežati razdvajanje direktnih efekata temperature od pratećih promena sredine (Marion i sar., 1997; De Boeck i Nijs, 2017). Međutim, pažljivim dizajnom eksperimenta i paralelnim merenjem relevantnih mikroklimatskih parametara, ovi sporedni efekti mogu se kontrolisati ili svesti na minimum, čime se pouzdanost interpretacije temperaturnih efekata značajno povećava (Hollister i sar., 2023). Uprkos ovim ograničenjima, OTC-i se i dalje smatraju jednim od ključnih alata za proučavanje efekata dugotrajnog umerenog zagrevanja na biljke i biljne zajednice, naročito u istraživanjima usmerenim ka razumevanju biljnih odgovora na globalno zagrevanje u prirodnim uslovima (Arft i sar., 1999; De Boeck i Nijs, 2017; Hollister i sar., 2023).

1.6. Anatomsko-morfološko-fiziološke osobine lista

Pojava istraživačkih pristupa koji polaze od osobine kao osnovne jedinice analize (engl. *trait-based approaches*) značajno je oblikovala oblast savremene ekologije biljake, naročito u istraživanjima koja se odnose na distribuciju vrsta, populacionu dinamiku, funkcionisanje ekosistema i odgovore organizama na promene uslova životne sredine (Cadotte i sar., 2015; Laughlin i Messier, 2015; Moles, 2018; Dawson i sar., 2021; Li i Prentice, 2024; Liu i sar., 2024). U okviru ovih istraživanja pažnja je usmerena na merljive funkcionalne karakteristike biljaka, kao što su površina lista, visina biljke ili masa semena, umesto isključivo na taksonomski identitet vrsta, kako bi se objasnile ekološke strategije biljaka, obrasci organizacije zajednica i funkcionisanje ekosistema. Ovakav pristup omogućava izvođenje širih generalizacija u različitim sredinskim kontekstima, jer povezuje osobine organizama sa njihovim odgovorima na uslove sredine i procesima funkcionisanja ekosistema. Ipak, uprkos širokoj primeni ovih pristupa, definisanje pojmova *osobina* i *funkcionalna osobina* u literaturi nije u potpunosti usaglašeno, jer ih različiti autori koriste u različitim kontekstima i u okviru različitih nivoa biološke organizacije (Dawson i sar., 2021). Načelno, termin *osobina* (engl. *trait*) može se definisati kao svaka morfološka, fiziološka ili fenološka karakteristika merljiva na nivou jedinke, od ćelijskog nivoa do nivoa celog organizma, čije određivanje ne zahteva informacije o spoljašnjoj sredini niti o višim nivoima organizacije, kao što su populacija, zajednica ili ekosistem (Violle i sar., 2007; Dawson i sar., 2021). Ovakvo koncipiranje osobine omogućava jasno razgraničavanje osobine jedinke od pojava i svojstava vezanih za više nivoe biološke organizacije ili sredinski kontekst (Violle i sar., 2007; Dawson i sar., 2021). Pri tome je važno razlikovati osobinu kao koncept od njene konkretne vrednosti (engl. *trait value*), koja može varirati između jedinki iste vrste duž sredinskih gradijenata ili tokom vremena, čime se naglašava značaj varijabilnosti osobina unutar i između vrsta (Violle i sar., 2007).

U funkcionalnoj ekologiji biljaka, razvijen je koncept „spektra ekonomije listova“(LES, engl. *Leaf Economic Spectrum*), koji opisuje globalni spektar koordinisanih osobina listova povezanih sa različitim strategijama korišćenja resursa, od „brzih“, koje se odlikuju visokim stopama rasta i kratkim životnim vekom listova, do „sporih“ koje karakterišu veća ulaganja u očuvanje resursa i duži životni vek (Wright i sar., 2004; Reich, 2014). Osobine koje se koriste u okviru ovog koncepta relativno su jednostavne za merenje, uporedive između populacija i vrsta i ekološki relevantne, jer odražavaju načine na koje biljke usvajaju, koriste i čuvaju resurse (Violle i sar., 2007; Reich, 2014). Ipak, iako se većina ovih karakteristika u literaturi često svrstava u *funkcionalne osobine*, one ne odražavaju nužno isti nivo fizioloških procesa niti imaju jednaku interpretativnu vrednost. Zbog toga su u savremenim istraživanjima predložene detaljnije klasifikacije tipova osobina. U tom kontekstu, Kassout i saradnici (2019) razlikuju funkcionalne i mehanističke osobine. Funkcionalne osobine opisuju opšte strategije biljke povezane sa

rastenjem, razvojem i preživljavanjem, dok mehaničke osobine neposrednije odražavaju konkretne fiziološke procese koji određuju način usvajanja i korišćenja resursa (Kassout i sar., 2019). Ovakva klasifikacija omogućava integraciju morfoloških i fizioloških podataka i može doprineti potpunijem razumevanju strategija biljaka u promenljivim uslovima sredine.

1.6.1. Specifična površina lista (SLA)

Specifična površina lista (SLA, engl. *Specific Leaf Area*), predstavlja odnos projektovane površine lista i njegove suve mase i izražava količinu fotosintetske površine koju biljka dobija po jedinici uloženih resursa u izgradnju lista (Wilson i sar., 1999; Poorter i sar., 2009; Pérez-Harguindeguy i sar., 2016; Pavanetto i sar., 2024; Yan i sar., 2025). Ova osobina odražava odnos između ulaganja u izgradnju lista i dobijene fotosintetske površine, zbog čega se smatra jednim od ključnih pokazatelja strategije korišćenja resursa kod biljaka (Garnier i sar., 2001; Wright i sar., 2004; Reich, 2014). Visoke vrednosti SLA karakteristične su za tanke listove sa manjim strukturnim ulaganjima, visokim fotosintetskim kapacitetom, većim sadržajem azota, manjom otpornošću na herbivore i relativno kratkim životnim vekom, što odgovara strategiji akvizicije resursa u sredinama bogatim resursima. Nasuprot tome, niske vrednosti SLA povezane su sa debljim listovima, većim strukturnim ulaganjima, nižim fotosintetskim stopama i dužim životnim vekom, što je karakteristično za konzervativniju strategiju korišćenja resursa (Reich i sar., 1997; Wright i sar., 2004; Poorter i sar., 2009; Reich, 2014; Shi i sar., 2024). Važno je imati u vidu da se SLA menja i unutar jedinke, u zavisnosti od starosti lista i njegove pozicije na biljci, zbog čega je za poređenja neophodno standardizovano uzorkovanje (Rawson i sar., 1987).

SLA je izrazito osetljiva na promene sredinskih faktora i menja se u odgovoru na različite uslove sredine, uključujući intenzitet svetlosti, dostupnost vode, koncentraciju CO_2 u atmosferi, koncentraciju ozona, plodnost zemljišta i dostupnost hranljivih materija (Larigauderie i sar., 1988; Witkowski i Lamont, 1991; Wilson i sar., 1999; Meziane, 2001; Li i sar., 2005; Bussotti, 2008; Vuleta i sar., 2011; Manitašević Jovanović i sar., 2014; Rosbakh i sar., 2015; Pavanetto i sar., 2024). Odgovor SLA na povišenu temperaturu nije jednoznačan i često zavisi od interakcije temperature sa drugim sredinskim faktorima, kao što su dostupnost vode ili svetlosti (Rosbakh i sar., 2015). Zbog relativno jednostavnog merenja i velike ekološke informativnosti, SLA se široko koristi kao indikator funkcionalnih odgovora biljaka i biljnih zajednica na klimatske promene i stresne uslove (Liu i sar., 2023; Pérez-Harguindeguy i sar., 2016; Sun i sar., 2026).

1.6.2. Sadržaj suve materije u listu (LDMC)

Sadržaj suve materije u listu (LDMC, engl. *Leaf Dry Matter Content*), predstavlja odnos suve mase lista i njegove sveže, odnosno vodom zasićene mase. Ova osobina smatra se važnom funkcionalnom osobinom, jer je povezana sa sadržajem proteina u listu i zapreminom citoplazme u ćelijama lista, te odražava i strukturne karakteristike lista (Garnier i Laurent, 1994; Niemann i sar., 1992; Wilson i sar., 1999). Listovi sa višim vrednostima LDMC imaju kompaktniju građu i manje međućelijskih prostora, što usporava difuziju gasova kroz tkivo i povezano je sa smanjenom transpiracijom i sporijim prometom materije. Nasuprot tome, listove sa nižim vrednostima LDMC karakterišu veći sadržaj vode i intenzivnija razmena gasova (Baribault i sar., 2010; Suter i Edwards, 2013). LDMC je najčešće negativno povezan sa SLA (Wright i sar., 2004; Siefert i Ritchie, 2016), pa se njihova kombinacija često koristi kao pokazatelj odnosa između brzog iskorišćavanja resursa i njihovog dugoročnijeg očuvanja (Reich, 2014). Za razliku od SLA, LDMC varira nezavisno od debljine lista (LT), ali je snažno povezan sa dostupnošću resursa i relativnom stopom rasta (Shipley, 1995; Wilson i sar., 1999; Roche i sar., 2004; Weiher i sar., 1999; Garnier i sar., 2004; Fortunel i sar., 2009). Više vrednosti LDMC povezane su sa dužim životnim vekom lista i nižom potencijalnom relativnom stopom rasta (Ryser, 1996; Wilson i sar., 1999), dok se niže vrednosti češće dovode u vezu sa višom stopom fotosinteze i bržim rastom u uslovima veće dostupnosti resursa (Pietsch i sar., 2014;

Gong i Gao, 2019). Vrednosti LDMC povećavaju se u uslovima suše, što se povezuje sa većim stepenom konzervacije resursa i većom otpornošću na vodni deficit (Smart i sar., 2017). Odnos između LDMC i temperature je složen i u velikoj meri varira između različitih vrsta i ekosistema (Duru i sar., 2008; Liancourt i sar., 2015; Niklas i sar., 2023).

1.6.3. Specifični sadržaj vode u listu (SLWC)

Specifični sadržaj vode u listu (SLWC, engl. *Specific Leaf Water Content*), predstavlja razliku između sveže i suve mase lista podeljenu sa površinom lista. SLWC je važna mehanistička osobina lista koja odražava hidrataciono stanje lisnog tkiva i time pruža uvid u fiziološki status biljke (Kassout i sar., 2019; Wang i sar., 2022). S obzirom na to da voda ima ključnu ulogu u biohemijskim reakcijama i metaboličkim procesima, njen sadržaj u listu direktno utiče na fotosintetsku aktivnost, rastenje i ukupnu produktivnost biljke (Anderson-Teixeira i sar., 2011; Huang i sar., 2020). Na nivou lista, SLWC je povezan i sa drugim funkcionalnim osobinama, uključujući SLA i stopu fotosinteze (Vendramini i sar., 2002). Istovremeno, povezan je i sa strukturnim osobinama lista, pozitivno sa debljinom lista (LT), a negativno sa gustinom tkiva, jer raspodela vode između ćelijskog zida i citoplazmatskog prostora odražava način izgradnje lisnog tkiva (Garnier i Laurent, 1994; Pérez-Harguindeguy i sar., 2016).

SLWC je pod snažnim uticajem klimatskih faktora, naročito temperature i dostupnosti vode, pa njegove vrednosti variraju duž klimatskih gradijenata. Iako se u optimalnim uslovima između temperature i SLWC može uočiti pozitivan odnos, njegov smer i intenzitet zavise od toga u kojoj meri je efekat temperature modifikovan dostupnošću vode i drugim sredinskim faktorima (Wang i sar., 2022). Zbog svoje uloge u termoregulaciji lista i održavanju asimilacije ugljenika, SLWC predstavlja važan pokazatelj fizioloških ograničenja biljaka, ali i njihove sposobnosti aklimacije/aklimatizacije na povišenu temperaturu i promene u dostupnosti vode.

1.6.4. Debljina lista (LT)

Debljina lista, (LT, engl. *Leaf Thickness*), predstavlja mehanističku osobinu lista koja odražava anatomske i fiziološke karakteristike lisnog tkiva i povezana je sa strategijama usvajanja i korišćenja resursa kod biljaka. LT utiče na količinu apsorbovane svetlosti i brzinu difuzije CO_2 kroz mezofil, a time i na fotosintetsku efikasnost i metaboličku aktivnost lista (Agusti i sar., 1994; Syvertsen i sar., 1995). Tanji listovi obično su povezani sa bržim rastom i efikasnijim usvajanjem resursa, dok deblji listovi doprinose većoj dugovečnosti i otpornosti na stres, ali su često povezani sa sporijim rastom (Reich, 2014). Deblji listovi često imaju više ćelijskih slojeva i kompaktniju građu, što može povećati otpornost na stresne uslove, ali istovremeno ograničiti brzinu razmene gasova i fotosintetski kapacitet (Niinemets, 2001; Poorter i sar., 2009). Uočena je negativna povezanost između LT i stope fotosinteze (Garnier i sar., 1999; Enríquez i Sand-Jensen, 2003), kao i između LT i relativne stope rasta (Poorter i sar., 1990; Nielsen i sar., 1996), zbog čega se LT često koristi kao indikator strategije očuvanja resursa i potencijalne produktivnosti biljke (Diaz i sar., 2004; White i Montes-R, 2005). U uslovima povišene temperature može doći do smanjenja vrednosti LT usled pojačane transpiracije i ograničene ćelijske ekspanzije, što može rezultovati formiranjem tanjih listova (Leigh i sar., 2017; Wright i sar., 2017).

1.6.5. Gustina stoma (SD) i Indeks stoma (SI)

Gustina stoma (SD, engl. *Stomatal Density*), predstavlja broj stoma po jedinici površine lista i smatra se mehanističkom osobinom koja odražava anatomski potencijal lista za razmenu gasova i transpiraciju (Franks i Beerling, 2009; Lawson i Blatt, 2014; Pérez-Harguindeguy i sar., 2016). Indeks stoma, (SI, engl. *Stomatal Index*), definiše se kao odnos broja stoma i ukupnog broja epidermalnih ćelija i predstavlja meru udela epidermalnih ćelija diferenciranih u stome (Ferris i sar., 2001; Luomala i sar., 2005; Liu i sar., 2024). Na vrednosti SD utiču promene stope

ekspanzije epidermalnih ćelija i površine lista, dok je SI u manjoj meri pod uticajem promena veličine epidermalnih ćelija, jer predstavlja relativni odnos stoma i ukupnog broja epidermalnih ćelija (Liu i sar., 2024). SD određuje maksimalni difuzioni kapacitet za CO_2 i vodenu paru po jedinici površine lista, dok SI pruža uvid u regulatorne mehanizme diferencijacije stoma. Iako obe osobine odražavaju kapacitet razmene gasova, nijedna ne predstavlja direktnu meru stvarne fotosintetske ili transpiracione aktivnosti, budući da te aktivnosti zavise i od dinamičke regulacije otvaranja i zatvaranja stoma (Lawson i Blatt, 2014; Franks i sar., 2017; Liu i sar., 2024).

Vrednosti SD i SI menjaju se sa promenama temperature, ali njihov odgovor nije jednoznačan. Smer i intenzitet tih promena zavise od vrste, razvojnog stadijuma, trajanja i intenziteta zagrevanja, kao i od interakcije temperature sa vodnim i svetlosnim režimom, pa se efekti temperature na ove osobine ne mogu generalizovati bez razmatranja šireg ekološkog konteksta (Zheng i sar., 2013; Wu i sar., 2018).

1.6.6. RGB Indeks procene sadržaja hlorofila (I_1)

Indeks I_1 predstavlja vegetacioni indeks zasnovan na RGB analizi, koji omogućava nedestruktivnu procenu sadržaja hlorofila u listu. Ovaj indeks obrnuto je proporcionalan koncentraciji hlorofila, tako da više vrednosti I_1 ukazuju na niži sadržaj hlorofila, i obrnuto (Sánchez-Sastre i sar., 2020). S obzirom na to da je hlorofil ključni fotosintetski pigment koji omogućava apsorpciju svetlosne energije i njenu konverziju u hemijsku energiju u obliku ATP-a i NADPH-a, a time i sintezu organskih molekula tokom fotosinteze (Baker i Habershon, 2017; Hu i sar., 2021; Moustakas, 2021), sadržaj hlorofila često se koristi kao fiziološki indikator promena u sredini, odnosno kao pokazatelj stresa (Croft i sar., 2017). Brojni abiotički i biotički stresori, uključujući povišenu temperaturu, sušu, visok intenzitet svetlosti, salinitet, nutritivni deficit, kao i patogene i herbivore, mogu uticati na ravnotežu između biosinteze i razgradnje hlorofila, čime menjaju njegovu koncentraciju i posledično utiču na fotosintetsku efikasnost (Penuelas i sar., 1998; Murchie i Lawson, 2013; Croft i sar., 2017).

Povišena temperatura može ubrzati razgradnju hlorofila i destabilizovati fotosintetski aparat, što se kod mnogih vrsta ispoljava smanjenjem fotosintetske efikasnosti (Penuelas i sar., 1998; Li i sar., 2018). Međutim, smer i intenzitet promena sadržaja hlorofila zavise od vrste, intenziteta i trajanja temperaturnog stresa, kao i od pratećih sredinskih uslova, pa se u pojedinim slučajevima smanjenje sadržaja hlorofila tumači i kao deo aklimacionog/aklimatizacinog odgovora kojim se ograničava apsorpcija svetlosti i smanjuje rizik od fotooksidativnih oštećenja tokom izlaganja visokim temperaturama (Cutolo i sar., 2023).

1.7. Proteini toplotnog stresa

1.7.1. Opšte karakteristike, podela i pregled funkcija

Odgovor na toplotni šok, (HSR, engl. *Heat Shock Response*), prvi je opisao italijanski genetičar Feručo Ritoza (ita. *Ferruccio Ritossa*) (Ritossa, 1962; De Maio i sar., 2012). Proučavajući politene hromozome pljuvačnih žlezda vrste vinske mušice *Drosophila busckii,* uočio je da izlaganje povišenoj temperaturi dovodi do pojave karakterističnih ispupčenja (engl. *puffs*) u pojedinim hromozomskim regionima, koja predstavljaju mesta pojačane transkripcione aktivnosti. Na osnovu ovih zapažanja pretpostavio je da ćelije kao odgovor na povišenu temperaturu započinju sintezu dotad nepoznatih molekula (Ritossa, 1962). Dvanaest godina kasnije identifikovani su proteini toplotnog stresa, (Hsp, engl. *Heat shock proteins*), čija je sinteza dovedena u vezu sa navedenim transkripcionim promenama (Tissiéres i sar., 1974). Danas je poznato da ekspresiju Hsp ne indukuje isključivo povišena temperatura, već i širok

spektar abiotičkih i biotičkih stresora, uključujući oksidativni stres, dehidrataciju, salinitet, UV zračenje i patogene (Feder i Hofmann, 1999; Al-Whaibi, 2011; De Maio i sar., 2012; Ul Haq i sar., 2019; Yurina, 2023). Zbog toga se Hsp smatraju važnom komponentom ćelijskog odbrambenog sistema u uslovima stresa. Međutim, brojni Hsp prisutni su i u fiziološkim uslovima (Welch, 1992; Park i Seo, 2015), što ukazuje na to da termin Hsp obuhvata funkcionalno veoma raznovrsnu grupu proteina (Park i Seo, 2015).

Sinteza Hsp predstavlja jedan od evoluciono najkonzervisanijih mehanizama zaštite kod živih organizama. Geni koji kodiraju ove proteine univerzalno su zastupljeni i pokazuju mali stepen variranja među vrstama, što ukazuje na njihovu značajnu evolucionu ulogu u zaštiti ćelije, kako tokom trajanja stresa, tako i nakon njegovog prestanka (Lindquist, 1986; Feder i Hofmann, 1999). Takođe se smatra da je struktura Hsp spada među najočuvanije proteinske strukture u živom svetu (Welch, 1992).

Na funkcionalnom nivou, brojni Hsp doprinose održavanju proteinske homeostaze, odnosno proteostaze, funkcionišući kao pratioci proteina, tj. molekularni šaperoni. Vezujući se za nestabilne konformacije drugih proteina, oni omogućavaju da novosintetisani polipeptidi dostignu stabilnu trodimenzionalnu strukturu. Pored toga, sprečavaju pogrešno savijanje i agregaciju proteina, olakšavaju njihovo pravilno savijanje i sklapanje proteinskih kompleksa, učestvuju u translokaciji proteina kroz membrane i njihovom usmeravanju u odgovarajuće ćelijske odeljke, doprinose reaktivaciji agregiranih proteina, kao i kontroli kvaliteta proteina usmeravanjem nepovratno oštećenih supstrata ka degradaciji (Hendrick i Hartl, 1993; Ellis, 1998; Forreiter i Nover, 1998; Rosenzweig i sar., 2019; Waters i Vierling, 2020; Kumar i sar., 2020). Molekularni šaperoni ne nose strukturnu informaciju neophodnu za pravilno savijanje proteina. Njihovo delovanje zasniva se na selektivnom prepoznavanju i privremenom vezivanju izloženih hidrofobnih regiona nestabilnih polipeptida, čime se sprečavaju neproduktivne interakcije i formiranje nefunkcionalnih agregata, bilo direktnim vezivanjem za očuvane domene nascentnih ili delimično denaturisanih proteina, bilo obezbeđivanjem unutrašnjeg prostora u sopstvenoj trodimenzionalnoj strukturi, u kojem se odvija spontano savijanje proteina (Hendrick i Hartl, 1993; Ellis, 1998; Kim i sar., 2013). Iako se u literaturi termini *Hsp* i *molekularni šaperoni* često upotrebljavaju kao sinonimi, njihovo značenje nije potpuno podudarno, budući da postoje šaperoni koji ne pripadaju Hsp, kao i Hsp bez klasične šaperonske funkcije (Finka i sar., 2011).

Najveći deo regulacije sinteze Hsp odvija se na nivou transkripcije, posredstvom transkripcionih faktora, (HSF, engl. *Heat Shock transcription Factors*), koji se vezuju za specifične *cis*-regulatorne elemente u promotorima *hsp* gena, poznate kao elementi toplotnog šoka, (HSE, engl. *Heat Shock Elements*). Ovi elementi, poznati i kao Pelhamovi (engl. *Pelham*) blokovi, sastoje se od promenljivog broja ponovaka konsenzusne sekvence 5'-CnnGAAnnTTCnnG-3' (Pelham, 1982; Wu, 1984; Ohama i sar., 2017). U fiziološkim uslovima, HSF-ovi se nalaze u citosolu u neaktivnom ili slabo aktivnom stanju, sa niskim afinitetom prema DNK, najčešće u formi monomera koji ostvaruju kratkotrajne interakcije sa Hsp40, Hsp70 i Hsp90. U uslovima stresa, prelaze u aktivnu formu oligomerizacijom u trimere, akumuliraju se u jedru i vezuju za HSE, čime pokreću ili pojačavaju transkripciju *hsp* gena i drugih komponenti odgovora na toplotni stres. Tokom faze prigušivanja, odnosno atenuacije, aktivnost HSF-ova se smanjuje kako bi se sprečila prekomerna ekspresija Hsp, nakon čega se vraćaju u neaktivno stanje u citosol (Wu, 1984; Cotto i sar., 1996; Scharf i sar., 2012; Ohama i sar., 2017; Bakery i sar., 2024). Aktivnost HSF-ova strogo je i dinamično regulisana: brza aktivacija neophodna je za preživljavanje ćelije, dok je pravovremeno prigušivanje odgovora važno za njen oporavak (Bakery i sar., 2024). Biljke poseduju naročito brojnu i raznovrsnu familiju HSF-ova, čiji se članovi razlikuju po strukturi, obrascu ekspresije i funkciji, te čine deo složenog signalnog sistema odgovora ne samo na visoku temperaturu već i na druge stresore (Ohama i sar., 2017;

Andrási i sar., 2021; Bakery i sar., 2024). Pored transkripcione regulacije, ekspresija Hsp kontroliše se i na posttranskripcionom i posttranslacionom nivou (Guerra i sar., 2015).

Nomenklatura Hsp zasniva se na njihovoj molekulskoj masi, izraženoj u kilodaltonima (kDa), a kod biljaka se razlikuje pet glavnih familija: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 i sHsp (Gupta i sar., 2010). Ove familije razlikuju se po strukturi funkcionalnih domena, unutarćelijskoj lokalizaciji i specifičnim ulogama u održavanju proteostaze, a njihovo koordinisano delovanje ključno je za očuvanje ćelijske homeostaze kako u fiziološkim uslovima, tako i tokom stresa. Intenzitet i obrazac indukcije pojedinih članova Hsp familija pri istom nivou toplotnog stresa značajno se razlikuju među organizmima. Tako kod biljaka dominira sinteza malih Hsp i Hsp101, dok kod vrsta roda *Drosophila* preovlađuje ekspresija Hsp70 (Gurley, 2000; Kumar i sar., 2020; Waters i Vierling, 2020). Pored toga, čak i unutar iste vrste, termotolerantni genotipovi često ispoljavaju jaču ili dugotrajniju indukciju Hsp transkripata i/ili proteina kao odgovor na povišenu temperaturu nego osetljivi genotipovi (Qin i sar., 2008; Bita i sar., 2011; Fernández-Crespo i sar., 2022).

1.7.2. Hsp101

Hsp101 je citosolni predstavnik familije Hsp100/ClpB (AAA+ proteini), čije je osnovno svojstvo disagregazna aktivnost, odnosno sposobnost razdvajanja proteinskih agregata nastalih tokom toplotnog stresa, čime se omogućava povratak proteina u funkcionalno stanje (Queitsch i sar., 2000; Hong i Vierling, 2001; Al-Whaibi, 2011; Mogk i sar., 2018; Kumar i sar., 2020). Strukturno, Hsp101/ClpB je veliki ATP-zavisni protein sa dva nukleotid-vezujuća domena i izraženim središnjim regionom značajnim za interakciju sa drugim Hsp. Ovaj protein funkcioniše kao prstenasti heksamer kroz koji se, uz utrošak ATP-a, provlači razvijeni polipeptidni lanac, što omogućava razdvajanje proteinskih agregata (Lee i sar., 2006; Mogk i sar., 2018; Kumar i sar., 2020). Tipični supstrati Hsp101 jesu proteini koji su tokom stresa delimično odvijeni i/ili se nalaze u proteinskim agregatima. Svoju disagregaznu aktivnost Hsp101 ostvaruje u koordinaciji sa sistemom Hsp70/Hsp40 i malim Hsp, čime se obezbeđuje efikasna reaktivacija agregiranih proteina (Lee i sar., 2006; Kumar i sar., 2020; Waters i Vierling, 2020). U optimalnim uslovima rastenja, količina Hsp101 u vegetativnim organima može biti veoma niska i teško se detektuje standardnim biohemijskim metodama, dok se pri porastu temperature za nekoliko stepeni iznad optimuma ekspresija Hsp101 brzo i snažno indukuje, a nivo proteina dodatno raste sa intenzitetom toplotnog stresa (Young i sar., 2001; Tonsor i sar., 2008; Mishra i Grover, 2019). Pokazano je da je Hsp101 esencijalan i za bazalnu i za stečenu termotoleranciju (Queitsch i sar., 2000; Hong i Vierling, 2001; Mishra i Grover, 2016). Pored uloge u odgovoru na stres, utvrđeno je da Hsp101 može imati funkcije i u fiziološkim uslovima, na primer u podsticanju početka cvetanja (Qin i sar., 2021).

1.7.3. Hsp70

Familija Hsp70 predstavlja jednu od evoluciono najstarijih i najkonzervisanijih grupa molekularnih šaperona, prisutnu kod prokariota i eukariota, a kod biljaka obuhvata veći broj izoformi koje se razlikuju prema unutarćelijskoj lokalizaciji i obrascu ekspresije (Sung i sar., 2001; Wang i sar., 2004; Usman i sar., 2017). U biljkama se razlikuju konstitutivne (Hsc70) i inducibilne izoforme, pri čemu konstitutivne učestvuju u bazalnom održavanju proteostaze, dok se inducibilne forme znatno akumuliraju tokom toplotnog i drugih stresova (Vierling, 1991; Sung i sar., 2001). Biljni Hsp70 lokalizovani su u citosolu i jedru, ali i u mitohondrijama, plastidima i endoplazmatičnom retikulumu, gde učestvuju u pravilnom savijanju proteina, sklapanju proteinskih kompleksa i transportu polipeptida kroz membrane (Boston i sar., 1996; Sung i sar., 2001; Su i Li, 2008).

Strukturno, Hsp70 su proteini mase oko 70 kDa i sastoje se od N-terminalnog ATP-vezujućeg domena i C-terminalnog domena za vezivanje supstrata, čija se konformacija menja u zavisnosti od ciklusa vezivanja i hidrolize ATP-a (Mayer i Bukau, 2005; Rosenzweig i sar., 2019). Hsp70 prepoznaju kratke hidrofobne sekvence izložene na novosintetisanim ili delimično odvijenim proteinima i, u saradnji sa košaperonima iz porodice Hsp40/DnaJ, omogućavaju njihovo pravilno savijanje i sprečavaju agregaciju (Fourie i sar., 1994; Mayer i Bukau, 2005).

Tokom toplotnog i drugih abiotičkih stresova, Hsp70 se među prvima indukuju u okviru šaperonske mreže i deluju koordinisano sa Hsp90, malim Hsps i sistemom Hsp101/ClpB u očuvanju stabilnosti proteoma i oporavku ćelije nakon stresa (Kotak i sar., 2007; Bita i Gerats, 2013; Waters i Vierling, 2020). Povećana akumulacija Hsp70 povezuje se sa razvojem bazalne i stečene termotolerancije, a termotolerantni genotipovi često ispoljavaju jaču ili stabilniju indukciju Hsp70 pri povišenim temperaturama (Feder i Hofmann, 1999; Zhang i sar,, 2005; Su i Li, 2008; Zhang i sar., 2010; Bita i Gerats, 2013). Zahvaljujući centralnoj ulozi u šaperonskoj mreži, Hsp70 predstavljaju važnu komponentu ćelijskog odgovora na temperaturni stres, jer povezuju procese savijanja, transporta i reaktivacije proteina u jedinstven proteostatski sistem.

1.7.4. Hsp17.6

Familiju malih Hsp (sHsp/Hsp20) čine brojni i strukturno raznovrsni proteini prisutni u gotovo svim unutarćelijskim odeljcima biljnih ćelija. Kod angiospermi se razlikuje jedanaest klasa sHsp gena, pri čemu neke biljne vrste poseduju više od 20 pojedinačnih sHsp, što ukazuje na njihovu veliku raznovrsnost u odnosu na druge eukariote. Lokalizovani su, u citosolu, jedru, mitohondrijama, hloroplastima i endoplazmatičnom retikulumu (Waters i Vierling, 2020). Organelarni sHsp su svojstveni biljkama, dok su među ostalim organizmima gotovo svi sHsp citosolni ili jedarni proteini. Izuzetak predstavlja rod *Drosophila*, kod koga je opisan specifičan sHsp lokalizovan u mitohondrijama (Santhanagopalan i sar., 2015). Osnovnu strukturnu jedinicu sHsp čini monomer molekulske mase 12–42 kDa, pri čemu je većina biljnih sHsp mase od 15 do 22 kDa, zbog čega se ova familija često označava i kao Hsp20 proteini (Waters, 2013). Monomeri sadrže konzervisani α-kristalinski domen, okružen varijabilnim N-terminalnim regionom i kratkim C-terminalnim repom (De Jong i sar., 1998; Waters, 2013). U ćeliji funkcionišu kao dinamični oligomeri, najčešće građeni od 12 ili više podjedinica, čija se organizacija menja u zavisnosti od sredinskih uslova, čime se omogućava izlaganje hidrofobnih površina za vezivanje destabilizovanih proteina (Mogk i sar., 2019).

Hsp17.6 je citosolni predstavnik ove familije koji deluje kao ATP-nezavisni molekularni šaperon sa holdaznom funkcijom (engl. *holdase*). Tokom toplotnog i drugih abiotičkih stresova, ovaj protein se brzo akumulira i vezuje za delimično odvijene proteine, sprečavajući njihovu nepovratnu agregaciju i održavajući ih u stanju pogodnom za naknadno pravilno savijanje (Waters i Vierling, 2020). U fazi oporavka, komplekse sHsp-supstrat dalje obrađuju ATP-zavisni sistemi Hsp70/Hsp40 i Hsp101/ClpB, čime se omogućava ponovno uspostavljanje funkcije proteina. Pokazano je da povećana ekspresija Hsp17.6 doprinosi većoj osmotoleranciji (Sun i sar., 2001), kao i da učestvuje u odgovoru na oksidativni stres i H_2O_2-signalizaciji tokom toplotnog stresa (Volkov i sar., 2006). Hsp17.6 ima važnu ulogu u aklimaciji/aklimatizaciji na toplotni stres. Iako je kod pojedinih vrsta, kao što su citrusi, pokazano da Hsp17.6 nije centralni regulator dugotrajne aklimacije/aklimatizacije na visoke temperature (Balfagón i sar., 2018), dostupni podaci ukazuju na to da ovaj protein ima značajnu ulogu u ranoj fazi odgovora na stres i stabilizaciji proteina pri naglim temperaturnim promenama (Waters i Vierling, 2020; Yamaguchi i sar., 2021).

1.8. Antioksidativna zaštita: enzimski mehanizmi

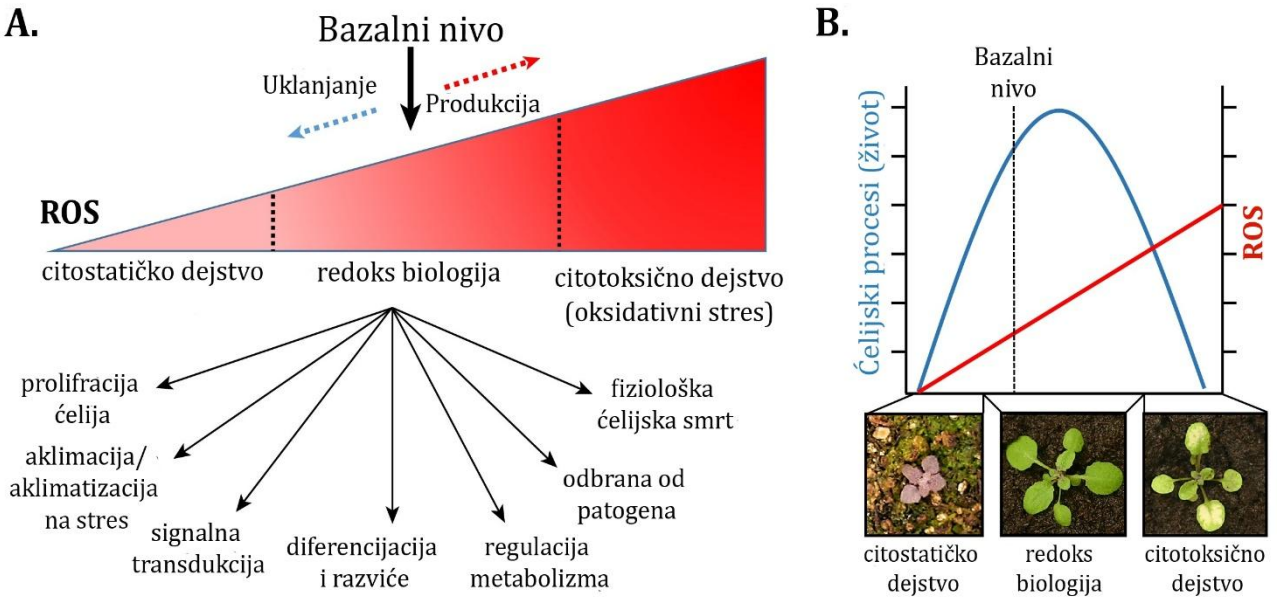
1.8.1. Reaktivne vrste kiseonika (ROS) i njihova uloga

Reaktivne vrste kiseonika (ROS, engl. *Reactive Oxigen Species*), obuhvataju delimično redukovane ili ekscitovane forme kiseonika, odnosno, molekule koji su energetski reaktivniji od atmosferskog kiseonika (O_2) (Mittler, 2002; Abouzari i Fakheri, 2015; Mittler, 2017). ROS su neizbežni produkti aerobnog metabolizma i kod biljaka nastaju prvenstveno u hloroplastima, mitohondrijama i peroksizomima, ali i u drugim ćelijskim odeljcima putem prenosa energije na molekulski kiseonik ili njegovom parcijalnom redukcijom usled prenosa elektrona (Karuppanapandian i sar., 2011; Mittler, 2017; Waszczak i sar. 2018). ROS nastaju fizičkom ili hemijskom aktivacijom molekulskog kiseonika: njegovom ekscitacijom formira se singletni kiseonik ($^1O_2$), dok tokom sukcesivnih monovalentnih redukcija nastaju superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksil radikal ($OH^{\bullet}$) (Møller i sar., 2007; Karuppanapandian i sar., 2011). Ove vrste međusobno se razlikuju po reaktivnosti, stabilnosti, mestu nastanka i prostornom dometu delovanja unutar ćelije (Das i Roychoudhury, 2014; Abouzari i Fakheri, 2015; Mittler, 2017). Produkcija ROS-a neizbežna je posledica prenosa elektrona u aerobnim uslovima, tokom fotosinteze, fotorespiracije i aktivnosti različitih enzima (Møller i sar., 2007; Garg i Manchanda, 2009; Mittler, 2017). Povećana aktivnost mitohondrija, peroksizoma, lipoksigenaza, NADPH oksidaza i citohroma P450, kao i smanjena aktivnost antioksidativnih enzima, doprinose povećanoj produkciji i akumulaciji ROS-a u biljnoj ćeliji (Abouzari i Fakheri, 2015; Medina i sar., 2021). Akumulacija ROS-a u različitim koncentracijama i u različitim ćelijskim odeljcima dovodi do formiranja specifičnih obrazaca njihove raspodele, odnosno „ROS potpisa“, koji omogućavaju razlikovanje pojedinih ćelijskih odeljaka i menjaju se u zavisnosti od razvojnog stadijuma i nivoa stresa (Medina i sar., 2021). U optimalnim uslovima koncentracija ROS-a je relativno niska, dok se u uslovima abiotičkog i biotičkog stresa značajno povećava (Suzuki i Mittler, 2006; Suzuki i sar., 2014; Abouzari i Fakheri, 2015; Mittler, 2017; Waszczak i sar., 2018; Hasanuzzaman i sar., 2020; Samat i sar., 2025). Iako su dugo smatrane isključivo štetnim nusproduktima metabolizma, danas je dobro poznato da ROS imaju i važnu ulogu kao signalni molekuli (Mittler i sar., 2022).

Pretpostavlja se da je prvobitna signalna uloga ROS-a bila u detekciji štetnih nivoa atmosferskog kiseonika i praćenju različitih metaboličkih procesa, ali su oni tokom evolucije postali uključeni u regulaciju gotovo svih aspekata života kod biljaka, životinja i većine eukariota (Mittler i sar., 2011). Različite ROS vrste imaju važnu ulogu u brojnim aspektima rastenja i razvića biljaka, uključujući regulaciju ćelijskog ciklusa, programiranu ćelijsku smrt, hormonsku signalizaciju, remodelovanje ćelijskog zida, pokrete stoma, klijanje semena, rast korenskih dlaka, gravitropski rast korena, razviće polenske cevi, oplođenje, razviće ploda i senescenciju (Garg i Manchanda, 2009; Sierla i sar., 2016; Singh i sar., 2016; Mittler, 2017; Huang i sar., 2019). Pored toga, ROS imaju značajnu ulogu u pokretanju i regulaciji odgovora biljaka na abiotičke i biotičke stresore. U ranim fazama stresnog odgovora, kontrolisano povećanje njihove koncentracije deluje kao signalni mehanizam koji aktivira odbrambene i aklimacione/aklimatizacione procese, dok u kasnijim fazama prekomerna akumulacija ROS-a dovodi do sekundarnog oksidativnog stresa i ćelijskih oštećenja (Garg i Manchanda, 2009; Mittler, 2017; Waszczak i sar., 2018; Medina i sar., 2021; Mittler i sar., 2022). Nivo ROS-a u ćeliji zavisi od ravnoteže između njihove produkcije i uklanjanja. Mitller (2017) je ove nivoe podelio u tri koncentraciona raspona (Slika 1.8.1).

Niske koncentracije ROS-a u biljnoj ćeliji imaju signalnu ulogu i učestvuju u regulaciji ćelijske proliferacije i diferencijacije. Bazalni nivo ROS-a omogućava ćeliji kontrolu brojnih procesa, kao što su proliferacija ćelija, rastenje i razviće biljnih tkiva, regulacija metaboličkih puteva i programirana ćelijska smrt (Mittler i sar., 2011; Abouzari i Fakheri, 2015; Mittler, 2017).

Nasuprot tome, pri prekomernoj akumulaciji ROS-a dolazi do oksidativnog stresa, pri čemu ROS ispoljavaju citotoksično dejstvo (Mittler, 2017). U visokim koncentracijama ROS oštećuju ćelijske membrane, oksiduju proteine i lipide, smanjuju enzimsku aktivnost, oštećuju DNK, mogu narušiti strukturu i funkciju novosintetisanih proteina i, u krajnjem ishodu, biti letalni za biljnu ćeliju (Abouzari i Fakheri, 2015; Mittler, 2017; Hasanuzzaman i sar., 2020; Medina i sar., 2021).



Slika 1.8.1. Uloga ROS u biljnoj ćeliji pri različitim koncentracijama

(**A.**) Efekat različitih koncentracija ROS-a na regulaciju različitih ćelijskih procesa. ROS i redoks signalizacija odvijaju se unutar definisanog opsega koncentracija ROS-a: preniski nivoi ROS-a imaju citostatičko dejstvo, a previsoki nivoi ROS-a su citotoksični. Zbog toga je bazalni nivo ROS-a neophodan za pravilnu ROS i redoks signalizaciju u ćeliji, a održava se ravnotežom između produkcije i uklanjanja ROS-a.; (**B.**) Zavisnost ćelijskih funkcija i vijabilnosti od koncentracije ROS-a. Zvonasta kriva prikazuje zavisnost održavanja pravilnog odvijanja ćelijskih procesa od porasta koncentracije ROS-a. Metabolizam biljke u fiziološkim uslovima zahteva optimalan ospeg koncentracija ROS-a, koji biljci omogućavaju da ostvari maksimalan rast i razvojni potencijal (Preuzeto i prevedeno: Mitller, 2017).

Zbog dualne prirode ROS-a, koji mogu delovati i kao štetni, toksični molekul i kao korisni signalni molekuli, njihova koncentracija u ćeliji mora biti strogo regulisana (Suzuki i Mittler, 2006; Abouzari i Fakheri, 2015). Da bi održale redoks homeostazu i sprečile prekomernu akumulaciju ROS-a, biljke su razvile složen sistem antioksidativne zaštite koji obuhvata enzimske i neenzimske komponente. Među najvažnijim enzimskim komponentama ovog sistema izdvajaju se superoksid dismutaze (SOD), askorbat peroksidaze (APX) i katalaze (CAT), dok neenzimsku komponentu antioksidativne zaštite pre svega čine askorbinska kiselina i glutation, a značajnu ulogu imaju i α-tokoferol, karotenoidi i flavonoidi (Mittler, 2002; Gill i Tuteja, 2010; Abouzari i Fakheri, 2015; Hasanuzzaman i sar., 2020).

1.8.2. Superoksid dismutaza (SOD)

Enzimi superoksid dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1) smatraju se prvom linijom odbrane od ROS-a nastalih usled abiotičkog stresa (Gill i sar., 2015). Obuhvataju grupu multimernih metaloenzima

koji imaju centralnu ulogu u metabolizmu superoksid anjon radikala, katalizujući njegovu dismutaciju do vodonik peroksida i kiseonika, prema jednačini (Gill i Tuteja, 2010):

$O_2^{\bullet-} + \cdot O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$

Uklanjanjem superoksid anjon radikala, ovi enzimi smanjuju mogućnost nastanka visoko toksičnog hidroksil radikala u Haber-Vajsovoj i Fentonovoj reakciji, koje su katalizovane jonima metala (Mittler, 2002; Gill i Tuteja, 2010; Gill i sar., 2015). Prema metalnom kofaktoru prisutnom u aktivnom centru, kod viših biljka razlikuju se tri tipa superoksid dismutaza: Cu/ZnSOD, FeSOD i MnSOD (Gill i sar., 2015). Cu/ZnSOD su najzastupljenija klasa biljnih SOD, prisutne su u obliku monomera, homodimera i homotetramera i lokalizovane su u citoplazmi, hloroplastima, peroksizomima i jedru (Kanematsu i Asada, 1989; Alscher, 2002; Gill i sar., 2015). FeSOD su kod viših biljaka uglavnom aktivne kao homotetrameri, primarno su lokalizovane u hloroplastima, ali se mogu naći i u peroksizomima i apoplastu (Corpas i sar., 2006; Gill i sar., 2015). Kod viših biljaka MnSOD su u formi homotetramera i lokalizovane su u mitohondrijama (Corpas i sar., 2006; Gill i sar., 2015; Schmidt i Husted, 2019). Geni za sve tri forme SOD nalaze se u jedarnom genomu, dok se transport proteina u odgovarajuće ćelijske odeljke odvija posredstvom signalnih sekvenci (Alscher, 2002; Gill i sar., 2015). Smatra se da MnSOD i FeSOD potiču od zajedničkog predačkog enzima i da predstavljaju evoluciono starije forme u odnosu na Cu/ZnSOD, koja je evoluirala nezavisno (Smith i Doolittle, 1992). Zbog univerzalne rasprostranjenosti među aerobnim organizmima, SOD se smatraju ključnim komponentama u odgovoru na primarni i sekundarni oksidativni stres (Alscher, 2002; Del Río i sar., 2018; Hasanuzzaman i sar., 2020).

Antioksidativna uloga SOD potvrđena je u odgovoru biljaka na različite abiotičke stresore, uključujući teške metale, salinitet, sušu, temperaturne ekstreme, oksidativni i fotooksidativni stres (Mittova i sar., 2003; Myouga i sar., 2008; Fernández-Ocaña i sar., 2011; Bhaduri i Fulekar, 2012; Signorelli i sar., 2013; Shafi i sar., 2015; Wang i sar., 2016; Del Río i sar., 2018; Hasanuzzaman i sar., 2020). Osim važne uloge u odgovoru na stres, SOD učestvuju i u regulaciji razvića biljaka, uključujući formiranje bočnih korenova, klijanje i cvetanje (Morgan i sar., 2008; Myouga i sar., 2008; Dvořák i sar., 2021).

Kada je reč o ulozi SOD u odgovoru biljaka na povišenu temperaturu, dostupni podaci ukazuju na to da promene njihove aktivnosti nisu uniformne, već da u velikoj meri zavise od biljne vrste, tipa tkiva, razvojnog stadijuma, kao i intenziteta i trajanja izlaganja povišenoj temperaturi (Del Río i sar., 2018). U skladu s tim, u literaturi su opisani različiti obrasci odgovora SOD tokom toplotnog stresa, uključujući odsustvo značajnih promena aktivnosti (Jiang i Huang, 2001; Snider i sar., 2009), njeno smanjenje (Camejo i sar., 2007; Djanaguiraman i sar., 2018; Lasorella i sar., 2022) ili povećanje (Tsang i sar., 1991; Chaitanya i sar., 2002; Soengas i sar., 2018; Fortunato i sar., 2023; Chen i sar., 2024).

1.8.3. Askorbat peroksidaza (APX)

Askorbat-peroksidaze (APX, EC 1.11.1.11) pripadaju klasi I superfamilije peroksidaza, sadrže hem grupu kao kofaktor i predstavljaju ključne enzime za finu modulaciju ćelijskog nivoa vodonik peroksida, kako tokom normalnog životnog ciklusa biljke tako i u različitim stresnim uslovima (Shigeoka i sar., 2002; Mittler, 2006; Pandey i sar., 2017). Ovi enzimi katalizuju redukciju H_2O_2 uz korišćenje askorbata (Asc) kao specifičnog donora elektrona, prema jednačini:

$H_2O_2 + Asc \rightarrow 2H_2O + DHA$

pri čemu nastaju voda i monodehidroaskorbat (MDHA), koji se zatim može redukovati nazad u askorbat ili spontano dismutovati do askorbata i dehidroaskorbata (DHA) (Shigeoka i sar.,

2002). Stabilnost i aktivnost APX-a zavise od dostupnosti askorbata, pri čemu su hloroplastne izoforme posebno osetljive na smanjenje njegove koncentracije, što može dovesti do njihove brze inaktivacije i posredno uticati na efikasnost fotosinteze u stresnim uslovima (Foyer i Shigeoka, 2011). Ova osobina jasno razlikuje APX od drugih biljnih peroksidaza (Shigeoka i sar., 2002; Foyer i Shigeoka, 2011; Dvořák i sar., 2021).

U višim biljkama prisutna je multigenska familija APX izoenzima, čije se izoforme razlikuju po unutarćelijskoj lokalizaciji i pokazuju različita strukturna i kinetička svojstva, uključujući molekulsku masu, optimalni pH, stabilnost, katalitičku efikasnost i supstratnu specifičnost (Pandey i sar., 2017). Na osnovu unutarćelijske lokalizacije razlikuju se slobodne izoforme askorbat peroksidaze prisutne u citosolu (cAPX), mitohondrijama (mitAPX) i stromi hloroplasta (sAPX), kao i izoforme vezane za membrane peroksizoma i glioksizoma (mAPX) i tilakoidnu membranu hloroplasta (tAPX) (Caverzan i sar., 2012).

APX predstavljaju jednu od centralnih komponenti antioksidativne mreže jer, zahvaljujući visokom afinitetu prema H_2O_2, učestvuju u njegovom brzom uklanjanju u više unutarćelijskih odeljaka i time doprinose održavanju redoks-homeostaze (S. Li, 2023). Utvrđeno je da se aktivnost APX povećava u prisustvu drugih antioksidativnih enzima, poput SOD i GR, što ukazuje na funkcionalnu povezanost različitih komponenti antioksidativnog sistema (Pandey i sar., 2017). Kao esencijalni enzimi askorbat-glutation ciklusa, APX učestvuju i u brojnim prosecima rastenja i razvića biljaka, kao što su formiranje bočnih korenova, razvoj nodusa, klijanje semena i programirana ćelijska smrt (S. Li, 2023). Širok spektar abiotičkih i biotičkih faktora, uključujući sušu, salinitet, temperaturne ekstreme, UV zračenje, teške metale, infekcije patogenima i fizička oštećenja, indukuje ekspresiju i menja aktivnost APX, (Rao i sar., 1996; Mittler i sar., 1999; Wang i sar., 2005; An i sar., 2009; Bhaduri i Fulekar, 2012; Kausar i sar., 2012; Pandey i sar., 2017). Intenzitet ovog odgovora zavisi od izoforme, njene unutarćelijske lokalizacije, razvojnog stadijuma biljke, kao i intenziteta i trajanja stresora, pri čemu i ista vrsta stresa može izazvati diferencijalnu regulaciju pojedinih izoformi u različitim ćelijskim odeljcima (Shigeoka i sar., 2002; Pandey i sar., 2017). Pokazano je i da APX imaju važnu ulogu u aklimaciji biljaka na kombinovano delovanje povišene temperature i suše (Rizhsky i sar., 2002; Koussevitzky i sar., 2008; Zandalinas i sar., 2017; Balfagón i sar., 2018).

Kada se posmatra odgovor biljaka na povišenu temperaturu, u velikom broju studija zabeleženo je povećanje aktivnosti i/ili ekspresije APX (Shi i sar., 2001; Chaitanya i sar., 2002; Koussevitzky i sar., 2008; Tang i sar., 2006; Almeselmani i sar., 2009; Zandalinas i sar., 2017; Balfagón i sar., 2018). Međutim, intenzitet i smer ovog odgovora zavise od jačine i trajanja temperaturnog stresa, pa su u pojedinim studijama zabeleženi i drugačiji obrasci, uključujući odsustvo promena aktivnosti ili njeno kratkotrajno smanjenje neposredno nakon izlaganja visokim temperaturama (Vacca i sar., 2004; Kaushal i sar., 2011; Awasthi i sar., 2015). Pokazano je i da pojedini transkripcioni faktori toplotnog šoka (HSFA2, HSFA4), pored regulacije ekspresije Hsp, učestvuju i u regulaciji ekspresije pojedinih izoformi APX tokom HSR odgovora (Scharf i sar., 2012), što ukazuje na funkcionalnu povezanost Hsp i antioksidativnog sistema u okviru jedinstvene mreže odgovora na toplotni stres. Dodatno, novija istraživanja pokazuju da pojedine citosolne izoforme APX (AtAPX1 i OsAPX2), osim enzimske antioksidativne funkcije, mogu ispoljavati i šaperonsku funkciju u stabilizaciji proteina (S. Li, 2023). Funkcija APX zavisi od posttranslacionih modifikacija i strukturne konformacije. Pri tome dimeri pretežno ispoljavaju antioksidativnu, a multimerni kompleksi šaperonsku funkciju; povišena temperatura može podsticati formiranje multimernih kompleksa i povećavati udeo APX sa šaperonskom funkcijom (Kaur i sar., 2021).

1.8.4. Katalaza (CAT)

Katalaze (CAT, EC 1.11.1.6) su tetramerni enzimi koji sadrže hem kao kofaktor i katalizuju razgradnju H_2O_2 do vode i kiseonika prema jednačini (Gill i Tuteja, 2010):

$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

CAT se izdvajaju od ostalih antioksidativnih enzima po tome što za ovu reakciju ne zahtevaju spoljni redukujući supstrat, odnosno dodatni donor elektrona (Willekens, 1997; Garg i Manchanda, 2009; Gill i Tuteja, 2010; Das i Roychoudhury, 2014). Katalaze su pretežno lokalizovane u peroksizomima, gde učestvuju u regulaciji nivoa H_2O_2 nastalog tokom fotorespiracije, β-oksidacije masnih kiselina i purinskog katabolizma, kao i u reakcijama različitih peroksizomalnih oksidaza. Na taj način imaju centralnu ulogu u održavanju ćelijske redoks-ravnoteže i regulaciji unutarćelijske i međućelijske signalizacije (Willekens, 1997; Gill i Tuteja, 2010; Baker i sar., 2023). Pored toga, dokumentovano je prisustvo CAT i u citoplazmi i mitohondrijama (Mhamdi i sar., 2010; Das i Roychoudhury, 2014; Sharma i Ahmad, 2014; Verma i sar., 2023). Iako CAT pokazuju relativno nizak afinitet prema H_2O_2, odlikuju se jednom od najviših brzina katalitičke reakcije među enzimima, što im omogućava efikasno uklanjanje velikih količina H_2O_2, naročito u uslovima pojačanog oksidativnog stresa (Mittler, 2002; Gill i Tuteja, 2010; Mhamdi i sar., 2010). Kod viših biljaka CAT su kodirane malom multigenskom familijom, najčešće sa tri gena kod monokotila, dok je usled različitih transkripcionih i posttranskripcionih modifikacija ukupan broj izoenzima veći i zavisi od biljne vrste (Mhamdi i sar., 2010; Das i Roychoudhury, 2014; Baker i sar., 2023; Verma i sar., 2023). Prema klasifikaciji koju su predložili Willekens i saradnici (1995), zasnovanoj na imenima *cat* gena kod duvana, CAT klase I snažno su eksprimirane u fotosintetskim tkivima, CAT klase II povezane su sa vaskularnim tkivima, dok se CAT klase III značajno eksprimiraju u semenu i reproduktivnim tkivima. Iako nomenklatura pojedinačnih gena varira između biljnih vrsta, očuvanost funkcionalne specijalizacije i strukturna sličnost katalaza iste klase podržavaju primenu ove podele (Willekens i sar., 1995; Iwamoto i sar., 2000; Mhamdi i sar., 2010).

Pokazano je da kod biljaka dolazi do povećanja ekspresije i/ili promene aktivnosti CAT u odgovoru na različite abiotičke i biotičke faktore, kao što su salinitet, suša, ekstremne temperature, UV zračenje, visok intenzitet svetlosti, stres izazvan teškim metalima, visoka pH vrednost zemljišta, napad patogena, virusa i insekata (Su i sar., 2014; Vighi i sar., 2016; Zandalinas i sar., 2017). Pored uloge u detoksifikaciji ROS-a, CAT učestvuju i u regulaciji redoks-signalizacije i programirane ćelijske smrti, čime doprinose usklađivanju metaboličkih i razvojnih odgovora biljaka na promene sredine (Mittler, 2002; Baker i sar., 2023).

Kada je u pitanju odgovor biljaka na povišenu temperaturu, promene aktivnosti i/ili ekspresije CAT zavise od intenziteta i trajanja stresa, kao i od tolerancije biljne vrste na toplotni stres (Hasanuzzaman i sar., 2020; Baker i sar., 2023). Uopšteno, umereno povećanje temperature dovodi do povećanja aktivnosti i/ili ekspresije CAT kao dela antioksidativnog odgovora i uspostavljanja redoks-homeostaze (Dash i Mohanty, 2002; Li i sar., 2014; Ergin i sar., 2016; Soengas i sar., 2018; Wang i sar., 2023), dok se aktivnost CAT smanjuje pri ekstremno povišenim temperaturama, koje dovode do oštećenja enzima i destabilizacije ćelijskog metabolizma (Dash i Mohanty, 2002; Li i sar., 2014).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Fenotipska plastičnost predstavlja važnu komponentu odgovora biljaka na promene uslova životne sredine, ali njen intenzitet i obrazac zavise od analizirane osobine, genotipa, populacije i konkretnog sredinskog konteksta. Budući da u prirodnim staništima temperatura varira zajedno sa drugim abiotičkim faktorima, *in situ* eksperimenti omogućavaju da se fenotipski odgovor na njeno povećanje sagleda u okviru prirodne prostorno-vremenske varijabilnosti uslova sredine.

Opšti cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispitaju fenotipski odgovori prirodnih populacija *Iris pumila* na blago eksperimentalno povećanje temperature *in situ*, kroz analizu promena anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista, fenologije cvetanja i komponenti reproduktivnog uspeha. Poseban akcenat stavljen je na analizu nivoa i vremenske dinamike fenotipske plastičnosti osobina lista, kao i obrazaca njihove međusobne povezanosti i stepena fenotipske integracije. Pored toga, u *ex situ* uslovima sa precizno kontrolisanom temperaturom ispitano je da li se i u kojoj meri obrasci odgovora odabranih anatomsko-morfoloških osobina lista, utvrđeni *in situ*, ponavljaju pri blagom povećanju temperature.

U skladu sa opštim ciljem, definisani su sledeći specifični ciljevi ove doktorske disertacije:

- Utvrđivanje uticaja eksperimentalnog *in situ* povećanja temperature za prosečno 1,5° C na fenotipsku ekspresiju anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila*. Anatomsko-morfološke osobine obuhvatale su SLA, LDMC, SLWC, LT, SD i SI, a biohemijske relativnu količinu proteina toplotnog stresa Hsp101, Hsp70 i Hsp17.6 i antioksidativnih enzima SOD, APX i CAT.

- Utvrđivanje sezonske i međugodišnje dinamike fenotipske ekspresije anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u ambijentalnim i eksperimentalno povišenim temperaturnim uslovima.

- Utvrđivanje razlika u fenotipskom odgovoru anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista na eksperimentalno povećanje temperature između dve prirodne populacije *I. pumila*.

- Ispitivanje povezanosti mikroklimatskih faktora sa variranjem anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u ambijentalnim uslovima i pri eksperimentalnom zagrevanju.

- Utvrđivanje uticaja blagog povećanja temperature na odabrane anatomsko-morfološke osobine lista *I. pumila* u kontrolisanim *ex situ* uslovima i poređenje obrazaca njihovog odgovora sa obrascima utvrđenim *in situ*.

- Utvrđivanje uticaja eksperimentalnog povećanja temperature na fenologiju cvetanja i komponente reproduktivnog uspeha genotipova *I. pumila* i ispitivanje razlika u odgovoru između dve prirodne populacije.

- Utvrđivanje uticaja blagog povećanja temperature na apsolutnu adaptivnu vrednost klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije i procena smera i intenziteta fenotipske selekcije na biohemijske osobine lista u različitim temperaturnim uslovima.

- Kvantifikovanje nivoa i obrazaca fenotipske plastičnosti anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista u odgovoru na temperaturno i sezonsko variranje uslova sredine, kao i utvrđivanje razlika u plastičnosti između osobina, grupa funkcionalno povezanih osobina, populacija i godina istraživanja.

- Utvrđivanje obrazaca međusobne povezanosti i stepena fenotipske integracije funkcionalno povezanih osobina lista, kao i njihovih promena između temperaturnih tretmana i tokom eksperimentalnog perioda.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Opis staništa

Deliblatska peščara, najveća evropska kontinentalna peščara, nalazi se u južnom Banatu, između reke Dunav i zapadnih padina Karpata, i pruža se u pravcu jugoistok-severozapad između 44° 47' i 45° 02' severne geografske širine i 20° 55' i 21° 18' istočne geografske dužine (podaci dobijeni putem Google earth.com). Peščara predstavlja geomorfološku formaciju eolskog porekla, elipsastog je oblika i zahvata površinu od oko 350 km^2, dužine približno 35 km i širine oko 15 km, sa prosečnom nadmorskom visinom od 138 m (Ducić i Milovanović, 2004; Kadovic i sar., 2014). Osnovna karakteristika reljefa jesu peščane dine, koje se pružaju u pravcu jugoistok-severozapad i mogu dostići dužinu i do 1 km (Ćuk, 2019). Dine se sastoje od žutog i sivog peska, prekrivenog slojem lesno-humusnog zemljišta (Ducić i Milovanović, 2004; Pavlović i sar., 2017). Mikroreljef Deliblatske peščare oblikovan je kretanjem slobodnog peska vejača, pri čemu je ovaj proces zaustavljen pre oko sto godina usled meliorativnih aktivnosti i pošumljavanja, koji su doveli do fiksiranja većine slobodnog peska vegetacijom (Milenković i sar., 2018; Ćuk, 2019). Deliblatsku peščaru karakterišu četiri vegetacijska tipa: peščarski, stepski, šumski i močvarni, pri čemu je stepski najrasprostranjeniji (Slika 3.1.1) (Ducić i Milovanović, 2004).



Slika 3.1.1. Deliblatska peščara

Prikazan je stepski tip vegetacije, koji je najrasprostranjeniji u okviru ove geomorfološke oblasti

Klima u Deliblatskoj peščari je umereno-kontinentalna, uz izraženo mikroklimatsko variranje usled uticaja kontinentalno-stepske, crnomorsko-mediteranske i karpatske klime (Ducić i Radovanović, 2005). Preplitanje različitih klimatskih uticaja doprinosi formiranju specifičnih mikroklimatskih uslova u ovom području. Oblast peščare je generalno hladnija u odnosu na svoju okolinu, dok prekrivenost dina vegetacijom dodatno doprinosi snižavanju maksimalnih dnevnih temperatura tokom leta (Ducić i Milovanović, 2004; Ćuk, 2019).

Prema podacima meteorološke stanice Banatski Karlovac za period 1991–2024, prosečna godišnja temperatura vazduha iznosila je 12,2 °C (RHMZ, 2025). Prosečna godišnja amplituda temperature vazduha iznosila je 53 °C, pri čemu je najhladniji mesec bio januar (0,9 °C), a najtoplji jul (22,7 °C) (RHMZ, 2025). Apsolutna izmerena amplituda temperature vazduha premašuje 75 °C. Apsloutna maksimalna temperatura vazduha (42,8 °C) zabeležena je u Beloj Crkvi u julu 2007. godine (RHMZ, 2025), dok je apsolutna minimalna temperatura vazduha (-32,8 °C) izmerena na Flamundi u januaru 1963. godine (Ducić i Milovanović, 2004).

Tokom vegetacionog perioda prosečne vrednosti temperature zemljišta na dubini od 5-50 cm kreću se od 17,8 °C do 20,9 °C (Ćuk, 2019). Prosečna godišnja količina sunčevog zračenja iznosi 2218 sati, a oblačnost je manja nego u okolini i u proseku iznosi 90 oblačnih dana godišnje (RHMZ, 2025).

Zbog velike vodopropustljivosti zemljišta, na području Deliblatske peščare nema stalnih izvora niti površinskih vodotokova. Atmosferske vode brzo poniru u niže slojeve, zbog čega površinski slojevi zemljišta ostaju bez dovoljno vlage. Podzemne vode se nalaze na dubini od 2-10 m u jugoistočnom, odnosno 100-150 m u severozapadnom delu peščare (Ćuk i sar., 2023). Tokom leta, zemljište se dodatno isušuje usled duvanja košave, a prosečna vlažnost zemljišta na dubini od 0,5 m iznosi svega 4 % (Ducić i Radovanović, 2005). Za period 1991-2024. godine, prosečna godišnja količina padavina na meteorološkoj stanici Banatski Karlovac iznosila je 617 mm (RHMZ, 2025). Najveća količina padavina registrovana je u maju i junu, dok je najmanjau februaru i martu, pri čemu je proleće kišovitije od jeseni (Ćuk, 2019; RHMZ, 2025).

Velika dnevno-noćna i sezonska kolebanja temperature, mrazevi koji počinju u septembru i traju do kasnog proleća, kao i košava koja može dostići brzinudo 180 km/h, predstavljaju značajne odlike mikroklime Deliblatske peščare i limitirajuće faktore staništa (Ducić i Milovanović, 2004; Kadović i sar., 2016; Ćuk, 2019).

Ekstremni ekološki uslovi staništa karakteristični za Deliblatsku peščaru uslovili su prisustvo specifičnog živog sveta, koji pretežno čine vrste prilagođene stepskim i peščarskim uslovima (Ćuk, 2019). Uredbom Vlade Republike Srbije iz 2002. godine, Deliblatska peščara je proglašena za Specijalni rezervat prirode, zbog bogatstva i specifičnosti biljnog i životinjskog sveta, uključujući prisustvo retkih i zaštićenih vrsta ("Službeni glasnik RS", br. 3/2002, 81/2008-5).

3.2. Ispitivana vrsta

Iris pumila L., patuljasta bradata perunika, pripada familiji *Iridaceae*. Ova višegodišnja klonalna biljka naseljava livadsko-stepske predele (red stepske vegetacije *Festucetalia valesiacae*) i rasprostranjena je od Austrije na zapadu, preko centralne i jugoistočne Evrope, do zapadnog Sibira na istoku (Willner i sar., 2017; Ćuk, 2019). U Srbiji se može naći pretežno u istočnim i severnim oblastima, a nazastupljenija je u Deliblatskoj peščari, gde naseljava otvorena dinska, kao i zasenčena šumska staništa (Stjepanović-Veseličić, 1953; Tucić i sar., 1988). Prirodne populacije *I. pumila* sastoje se od klonova karakterističnog kružnog oblika (Slika 3.2.1). Ovakva prostorna struktura posledica je vegetativnog razmnožavanja i načina grananja rizoma (podzemnih stabala), koje se odvija bočno u odnosu na centralni roditeljski izdanak. Na taj način nastaju grane prvog reda (primarni segmenti), koje se dalje granaju, što rezultira formiranjem sekundarnih, tercijarnih i segmenata višeg reda (Tucić i sar., 1989). Klonovi rastu radijalno od centra ka periferiji, a gusto pakovani rizomi, prosečne veličine oko 2,5 cm, mogu ostati fiziološki povezani tokom više godina. Izumiranjem strarijih segmenata u centralnom delu klona formira se karakterističan kružni oblik. Prečnik klona varira od 30-120 cm, a s obzirom na to da godišnji prirast klona iznosi približno 50 mm (Tucić i sar., 1989), na osnovu prečnika moguće je proceniti približnu starost klona. Jedinka nastala vegetativnom reprodukcijom rizoma naziva se ramet, ona je genetički identična materinskoj biljci i, u zavisnosti od starosti klona, može biti delimično ili potpuno autonomna.



Slika 3.2.1. Pojedinačni klon *I. pumila*

Prikaz karakterističnog kružnog oblika klona *I. pumila*

Pored vegetativnog, *I. pumila* se odlikuje i polnim načinom razmnožavanja. Cvetanje se odvija u rano proleće i traje nekoliko nedelja (Tucić i sar., 1988). Pojedinačni, krupni, dvopolni cvetovi izrazito su polimorfni u pogledu boje (bela, žuta i različite nijanse plave i ljubičaste). Polimorfizam boje cveta nastaje kao rezultat segregacije alela na većem broju genskih lokusa, što omogučava lako prepoznavanje klonalnih genotipova u prirodnim populacijama, budući da se različiti cvetni fenotipovi mogu smatrati kao različiti klonalni genotipovi (Tucić i sar., 1988). Ova vrsta je isključivo stranooplodna (Tarasjev, 2005) oprašuju je insekti, među kojima su najčešći oprašivači iz rodova *Bombus* (bumbari), *Apis* (pčele), *Halictus* i *Andrena* (male solitarne pčele) (Vuleta i sar., 2022). Plod je lokulicidna čaura sa zašiljenim vrhom, koja pucanjem oslobađa nekoliko desetina krupnih semena u neposrednoj blizini matične biljke.

I. pumila je kserotermni relikt (Ćuk, 2019) i nalazi se u Crvenoj knjizi flore Srbije (tom I - preliminarna lista najugroženijih biljaka) (Stevanović i sar., 1999). Vrsta je zaštićena na teritoriji Republike Srbije na osnovu Pravilnika o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta bijaka, životinja i gljiva (Prilog II - zaštićene vrste) („Službeni glasnik RS“, br. 5/2010).

Kao model organizam za ekološko-genetička i evoluciona istraživanja, *I. pumila* su početkom osamdesetih godina XX veka uveli dr Branka Tucić (Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu) i prof. dr Vladimir Stevanović (Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu) (Tarasjev i sar., 2012). Više od četrdeset godina istraživanja na ovoj vrsti pokazalo je da poseduje niz karakteristika koje je čine pogodnim model organizmom. Krupni dvopolnicvetovi omogućavaju lako kontrolisano oprašivanje, što je naročito pogodno za istraživanja genetičkih, sredinskih i/ili materinskih efekata na ukupno fenotipsko variranje (Tucić i Avramov, 1996). Seme ove vrste pogodno je za formiranje banki semena (engl. *seed banks*), jer su relativno stabilna za skladištenje (da bi došlo do prekida dormancije semena neophodan je tretman 96 % sumpornom kiselinom (Tucić i Avramov, 1996)). Sačuvana semena se mogu koristiti u tzv. studijama „vaskrsenja“ (engl. *resurection studies*), koje omogućavaju poređenje adaptivnih strategija predaka i potomaka u odgovoru na klimatske promene (Tarasjev i sar., 2012; Franks i sar., 2014). U odnosu na druge vrste istog roda, prirodne populacije *I. pumila* odlikuju se visokim nivoom genetičke varijabilnosti što ovu vrstu čini pogodnim modelom za populaciono-genetička istraživanja (Tucić i sar., 1984). Vegetativno razmnožavanje omogućava dobijanje velikog broja genetički identičnih jedinki (rameta), što je posebno pogodno za proučavanje uticaja sredinskih faktora na evoluciju anatomskih, morfoloških, fizioloških i biohemijskih osobina, kao i osobina životne istorije (Tucić i sar., 1990; Manitašević i sar., 2007; Tucić i Miljković, 2010; Vuleta i Tucic, 2009; Manitašević Jovanović i sar., 2011). Sesilni način života, kao i izražena heterogenost mikrosredine koju *I. pumila* naseljava, omogućavaju ispitivanje odgovora vegetativnih i/ili repodutivnih organa na mikrosredinske promene, čime ova vrsta predstavlja adekvatan model za proučavanje fenotipske plastičnosti (Tucić i sar., 1998; Avramov i sar., 2007; Tucić i sar., 2009; Manitašević Jovanović i sar., 2011, 2023; Vuleta i sar., 2016; Hočevar i sar., 2022, 2023, 2025).

Tokom svoje evolucione istorije, usled heterogenosti životne sredine, *I. pumila* je razvila sposobnost detekcije promena sredinskih signala i formiranja funkcionalno adekvatnog (adaptivnog) plastičnog odgovora u odnosu na različite aspekte svog fenotipa: biohemijskog, fiziološkog, anatomskog i morfološkog (Tucić i sar., 1998, Tucić i sar, 1999; Manitašević i sar., 2007; Manitašević Jovanović i sar., 2023; Hočevar i sar., 2025).

3.3. Eksperimentalni dizajn

3.3.1. Eksperiment I: Eksperimentalno povećanje temperature *in situ*

U ovom eksperimentu korišćeni su klonalni genotipovi *I. pumila* iz dve prirodne populacije koje naseljavaju otvorena dinska staništa u Deliblatskoj peščari. Populacija 1 prostirala se padinom jedne dine, dok je Populacija 2 nastanjivala vrh druge dine, pri čemu su populacije bile međusobno udaljene 4 km. Eksperiment povećanja temperature vazduha u prirodnim uslovima, *in situ*, izveden je upotrebom komora sa otvorenim vrhom (OTC, engl. *Open Top Chamber*), koje pasivnim zagrevanjem tj. „zarobljavanjem" sunčeve energije simuliraju uslove globalnog zagrevanja (Slika 3.3.1). Za konstrukciju četvorostranih OTC-a (dimenzija 50 x 50 x 50 cm) formiran je ram od 4 metalna L-profila, oko koga je obmotana providna termalna folija. Ova folija je na bazi etilen vinil acetata (Guarniflon S.p.a., Treviso, Italija) i ne utiče na spektralni sastav propuštene svetlosti, tako da odnos crvene i tamno-crvene svetlosti (R:FR) unutar OTC-a ostaje nepromenjen. OTC-i su postavljeni preko jedne polovine svakog od nasumično odabranih kružnih klonova *I. pumila*, dok je druga polovina ostala izložena ambijentalnim uslovima. Na ovaj način rameti istog klonalnog genotipa razvijali su se pod različitim temperaturnim uslovima, sa prosečnom razlikom od 1,5 °C tokom cele godine.



Slika 3.3.1. Eksperimentalno zagrevanje *in situ* u prirodnim populacijama *I. pumila*

Na gornjoj fotografiji prikazane su komore otvorenog vrha (OTC) postavljene preko dela pojedinačnih klonova *I. pumila* koji prirodno rastu na padini dine u Deliblatskoj peščari. Na donjim fotografijama prikazani su izgled OTC-a iz neposredne blizine (levo) i položaj OTC-a u odnosu na klon *I. pumila*, posmatran odozgo (*desno).*

U proleće 2017. godine nasumično je odabrano ukupno 68 velikih, kružnih klonova (po 34 u svakoj populaciji) pri čemu je boja cveta korišćena kao marker za razlikovanje klonalnih genotipova (Tucić i sar., 1988). Svaki klon obeležen je drvenim kočićem sa identifikacionom

oznakom. Da bi se sprečilo mešanje sa susednim genotipovima, uklonjeni su svi cvetni rameti drugačije boje cveta u okruženju od 30 cm oko odabranog klona. U maju 2017. godine, OTC-i su postavljeni preko polovine svakog odabranog klona, dok je druga polovina ostala netaknuta. Tokom proleća i leta 2018. i 2019. godine sa rameta 45 velikih kružnih klonova (24 u Populaciji 1 i 21 u Populaciji 2), izvan i unutar OTC-a, u obe populacije, uzorkovani su listovi za biohemijske i anatomsko-morfološke analize. Uzorkovanje je obavljano tokom najtoplijeg dela dana, u periodu od 10^{30} do 14^{30} h. Prvi i drugi potpuno formiran najmlađi list su odmah po uzorkovanju pakovani u aluminijumsku foliju i zamrzavani u tečnom azotu i transportovani do laboratorije, gde su čuvani na temperaturi od -70 °C do pripreme tkivnih ekstrakata za biohemijske analize. Treći potpuno formiran list je odmah po odsecanju, pakovan u plastične bočice koje su zatim zaptivene parafilmom i potom transportovan na hladnom do laboratorije gde je obavljeno merenje anatomsko-morfoloških osobina lista. Treći potpuno formiran list sa drugog vegetativnog rameta istog klona, premazivan je bezbojnim lakom za nokte, a nakon sušenja uzorkovan i u papirnoj kesi transportovan do laboratorije, gde je korišćen za izradu preparata otiska epidermisa. Skraćenice i opis analiziranih osobina prikazani su u Tabeli 3.3.1. Tokom 2019. godine, kod svih 68 odabranih klonova (34 po populaciji) praćene su fenologija cvetanja i komponente reproduktivnog uspeha rameta razvijenih izvan i unutar OTC-a. Period cvetanja trajao je od 28. marta do 12. aprila, ukupno 16 dana. Terenski obilasci obavljani su svakog drugog dana. Prilikom svakog obilaska beleženi su novootvoreni cvetovi za svaku kombinaciju klona i temperaturnog tretmana, dok je za cvetove koji su se otvorili između dva uzastopna obilaska dan otvaranja procenjen na osnovu njihovog izgleda.Oprašenost cveta utvrđivana je na osnovu prisustva polenovih zrna na žigu tučka. Cvet je smatran oprašenim kada su polenova zrna uočena na žigu najmanje jedne od tri grane tučka. Svaki evidentirani cvet obeležen je spajalicom postavljenom na list cvetnog rameta, čime je omogućeno praćenje sudbine pojedinačnih cvetova i njihovo povezivanje sa naknadno formiranim čaurama. Formirane čaure sakupljane su u papirne kese i transportovane u laboratoriju, gde su sušene na vazduhu. Za svaku čauru određen je broj semena i njihova ukupna masa.

3.3.2. Eksperiment II: Eksperimentalno povećanje temperature *ex situ*

Kako bi se razdvojio uticaj temperature na odgovore biljaka od uticaja ostalih abiotičkih faktora koji se istovremeno javljaju u prirodnom okruženju, postavljen je eksperiment u kontrolisanim uslovima eksperimentalne sobe za gajenje biljaka. U eksperimentu su korišćene jedinke *I. pumila* dobijene iz rizoma genotipova poreklom iz Deliblatske peščare, koje su prethodno više godina gajene u eksperimentalnoj sobi za gajenje biljaka pri intenzitetu svetlosti od 110 μmol m^{-2} s^{-1}, fotoperiodu od 16/8 h (dan/noć) i ambijetalnoj temperaturi od 23/19 °C (dan/noć). Zalivanje je vršeno jednom nedeljno rastvorom mikrobiološkog tečnog đubriva (Slavol, Agrounik, Šimanovci, Srbija) u koncentraciji od 10 ml/l destilovane vode. Kako bi se smanjio efekat položaja (korelacija genotip-sredina), biljke su rotirane dva puta nedeljno. Za potrebe eksperimenta odabrano je 40 genotipova u istoj fazi razvića, sa potpuno formiranim najmlađim listom. Osim na kontrolnoj temperaturi od 23/19 °C (dan/noć), označenoj kaoT_K, biljke su gajene i na temperaturi povišenoj za 1 °C (24/20 °C, dan/noć), označenoj kao T_P. Ovaj temperaturni tretman odabran je tako da odgovara nižem projektovanom scenariju globalnog zagrevanja tokom ovog veka (IPCC, 2021). Uzorkovanje najmlađeg potpuno formiranog lista obavljeno je jednom na obe temperature, Nakon prvog uzorkovanja, obavljenog na kontrolnoj temperaturi, ambijentalna temperatura povećana je za 1 °C, a po formiranju novih listovaizvršeno je drugo uzorkovanje. Na uzorkovanim listovima potom su merene anatomsko-morfološke osobine.

Tabela 3.3.1. Opis skraćenica ispitivanih osobina lista u ovoj studiji (Eksperimenti I i II)

Skraćenica	Pun naziv skraćenice (jedinica mere)	Eksperiment
APX	Askorbat peroksidaza (Arbitrarna jedinica (AJ))	I
CAT	Katalaza (Arbitrarna jedinica (AJ))	I
Hsp101	Protein toplotnog stresa, 101 kDa (Arbitrarna jedinica (AJ))	I
Hsp70	Protein toplotnog stresa, 70 kDa (Arbitrarna jedinica (AJ))	I
Hsp17.6	Protein toplotnog stresa, 17.6 kDa (Arbitrarna jedinica (AJ))	I
I_1	RGB Indeks I_1	II
LDMC	Sadržaj suve materije u listu (gg^{-1})	I i II
LT	Debljina lista	I i II
MnSOD	Mn-superoksid dismutaza (Arbitrarna jedinica (AJ))	I
SD	Gustina stoma ($\#/mm^2$)	I i II
SI	Indeks stoma (%)	I
SLA	Specifična površina lista ($cm^2\ g^{-1}$)	I i II
SLWC	Specifični sadržaj vode u listu (gcm^{-2})	I i II
Cu/ZnSOD	Cu/Zn-superoksid dismutaza (Arbitrarna jedinica (AJ))	I

3.4. Merenje abiotičkih parametara staništa

Temperatura vazduha izvan i unutar OTC-a merena je korišćenjem data-logera - termometara sa dve spoljašnje sonde (NTC senzori) (ThermaData® logger TB2F, Electronic Temperature Instruments Ltd, UK). Sonde su postavljene na visini od 25 cm, u nivou listova *I. pumila*, jedna izvan komore, a druga unutar nje. U svakoj populaciji postavljena su po tri data-logera, koji su beležili temperaturu vazduha na svakih 30 min tokom celog eksperimentalnog perioda.

Radi procene mikroklimatskih uslova, pre uzorkovanja listova, u neposrednoj blizini odabranih klonova, izvan i unutar svakog OTC-a, mereni su sledeći parametri sredine: (1) Fotosintetski aktivna radijacija (PAR, engl. *Photosynthetically Active Radiation*, μmol $m^{-2}\ s^{-1}$), pomoću „quantum" senzora (LI-190SA, LI-COR, Inc., Linkoln, SAD); (2) Odnos crvene i tamno-crvene svetlosti (R:FR), u visini listova, pomoću R:FR senzora (Skye SKR-110, Skye Instruments Ltd., Povis, UK); (3) Vlažnost zemljišta, na dubini od 5 cm, pomoću ubodnog senzora za vlažnost zemljišta (ML3 ThetaProbe, Delta-T Devices Ltd., Kembridž, UK); (4) Temperatura zemljišta, na dubini od 5 cm, pomoću ubodnog digitalnog termometra (SuperFast Thermapen, Electronic Temperature Instruments Ltd., Worting, UK); (5) Temperatura vazduha na visini od 15 cm od tla pomoću laserskog infracrvenog termometra (Crop TRAK, Spectrum Technologies, Inc., Plainfield, SAD) i (6) Temperatura lista pomoću istog laserskog infracrvenog termometra kojim je merena i temperatura vazduha.

3.5. Merenje anatomsko-morfoloških osobina lista

U okviru ove studije analizirane su sledeće osobine: funkcionalne: specifična površina lista (SLA, engl. *Specific Leaf Area*) i sadržaj suve materije lista (LDMC, engl. *Leaf Dry Matter Content*); i mehaničke: specifični sadržaj vode u listu (SLWC, engl. *Specific Leaf Water Content*), debljina

lista (LT, engl. *Leaf Thickness*), gustina stoma (SD, engl. *Stomatal Density*), indeks stoma (SI, engl. *Stomatal Index*) i RGB Indeks I_1.

Za određivanje anatomsko-morfoloških osobina lista korišćeni su zdravi, potpuno formirani listovi. Nakon uzorkovanja i adekvatnog transporta do laboratorije, izmerena je sveža masa lista (LFM, engl. *Leaf Fresh Mass*), a listovi su zatim skenirani optičkim skenerom (HP ScanJet 3800; 600DPI). Zatim su listovi sušeni do konstantne mase u sušnici na 60 °C, nakon čega je izmerena suva masa (LDM, engl. *Leaf Dry Mass*). Na osnovu digitalnih prikaza svežih listova dobijenih skeniranjem određena je površina lista (LA, engl. *Leaf Area*), u programu ImageJ (National Institutes of Health, Merilend, SAD).

Specifična površina lista, SLA izračunata je kao količnik projektovane površine svežeg lista i njegove suve mase, i izražena je u $cm^2\ g^{-1}$:

SLA = LA/LDM

Sadržaj suve materije lista, LDMC određen je kao količnik suve i sveže mase lista, i izražen je u $g\ g^{-1}$:

LDMC = LDM/LFM

Specifični sadržaj vode u listu, SLWC izračunat je kao razlika između sveže i suve mase lista podeljena sa površinom lista, i izražen u $g\ cm^{-2}$:

SLWC = (LFM – LDM)/LA

Debljina lista, LT određena je po uzoru na rad Vile i sar. (2005), prema formuli:

LT= 1 / SLA x LDMC

Gustina stoma, SD određena je mikroreljefnom metodom, po Hilu i Randallu (1984). Središnji deo epidermisa adaksijalne površine svakog lista premazan je bezbojnim lakom za nokte u dužini od oko 1 cm. Nakon sušenja, otisak epidermisa je skinut pomoću selotejp trake i zalepljen na mikroskopsku pločicu. Preparati su posmatrani na svetlosnom mikroskopu sa kamerom (Leica, Wetzlar, Nemačka), pri uveličanju objektiva od 20x. Broj stoma (kao i broj epidermalnih ćelija) određivan je na 10 slučajno izabranih i fotografisanih mikroskopskih polja, pri čemu su izbegavani veći snopovi provodnih sudova, a u analizu su uključene samo potpuno vidljive stome. Površina vidnog polja je iznosila 0,161 mm^2. Gustina stoma izražena je kao prosečan broj stoma po mm^2:

SD= broj stoma/mm^2

Gustina epidermalnih ćelija, ECD (engl. *Epidermal Cell Density*) izražena je kao prosečan broj epidermalnih ćelija po mm^2:

ECD=broj epidermalnih ćelija/mm^2

Indeks stoma, SI izračunat je kao odnos gustine stoma i zbira gustine stoma i gustine epidermalnih ćelija, pomnožen sa 100 i izražen u %:

SI= SD/(SD + ECD) x 100

Sadržaj hlorofila u listovima procenjen je nedestruktivnom metodom, analizom intenziteta zelene boje na digitalnim slikama skeniranih listova, primenom RGB modela u programu *ImageJ*. RGB Indeks I_1 određen je po uzoru na rad Sánchez-Sastre i sar. (2020) prema formuli:

I_1= R + G – 2B

gde R, G i B predstavljaju numeričke vrednosti crvene (engl. *Red*), zelene (engl. *Green*) i plave (engl. *Blue*) komponente svetlosti dobijene iz RGB digitalne slike lista. Validnost ovog pristupa potvrđena je u pilot eksperimentu (Hočevar i sar., 2025) u kome je dokazana značajna negativna linearna korelacija između indeks I_1 i koncentracije hlorofila određene standardnom destruktivnom DMSO metodom (Wellburn, 1994).

3.6. Biohemijske metode

3.6.1. Priprema tkivnih ekstrakata

Listovi korišćeni za biohemijsku analizu Hsp i antioksidativnih enzima (Eksperiment I) ručno su usitnjeni, a zatim pulverizovani u avanu uz dodavanje tečnog azota, do finog praha. Za svaki od 30 analiziranih genotipova *I. pumila* (15 po populaciji) u svakoj vremenskoj tački pripremljena su po dva uzorka: jedan od listova rameta koji su se razvijali izvan OTC-a, a drugi od listova rameta koji su se razvijali unutar OTC-a (ukupno 240 uzoraka). Svaki uzorak predstavljao je smešu listova tri različita rameta istog genotipa. Dobijeni homogenat sonifikovan je na ledu, u dve zapremine (w/v) 0,1 mol L^{-1} Tris pufera, pH 7,6 koji je sadržavao 1 mmol L^{-1} EDTA i 1 mmol L^{-1} DTT i 1 mmol L^{-1} PMSF. Sonifikacija je vršena pri amplitudi od 30 %, četiri puta po 15 s, uz pauze od 30 s, korišćenjem ultrasoničnog procesora (LABSONIC M, Sartorius AG, Göttingen, Nemačka). Nakon inkubacije na ledu uz mešanje, u trajanju od 10 min, uzorci su centrifugirani dva puta (15 min, 12000 x g, 4 °C). Supernatant je potom zamrznut u tečnom azotu i čuvan na temperaturi od -70 °C do daljeg korišćenja.

3.6.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima određena je kolorimetrijskom metodom po Spektor-u (1978), modifikovanoj za merenje u mikrotitar pločama od 96 mesta. Za konstruisanje standardne krive korišćen je rastvor albumina iz goveđeg seruma, BSA (engl. *Bovine Serum Albumin*, Sigma Aldrich, UK), u opsegu koncentracija 15-250 µg/mL. Absorbanca je merena na talasnoj dužini od 595 nm, pomoću spektrofotometra Multiskan Spectrum (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

3.6.3. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS- PAGE)

Uzorci ekstrakata lista pripremani su kuvanjem u jednakoj zapremini redukujućeg pufera za pripremu uzoraka (0,125 M Tris, pH 6,95, 4 % SDS, 20 % glicerol, 10 % β-merkaptoetanol), u trajanju od 5 min na 100 °C. Nakon dodavanja 5 % bromfenol plavog kao markera boje, uzorci koji su sadržali 10 µg proteina nanošeni su na poliakrilamidni gel, uporedo sa smešom proteina poznatih molekulskih masa (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fhisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD). Proteini su razdvajani po molekulskoj masi denaturišućom poliakrilamidnom elektroforezom (SDS-PAGE) na diskontinuiranim gelovima: 5 % gelom za koncetrovanje proteina i 7,5 % odnosno 12 % gelovima za razdvajanje proteina (Tabela 3.6.1).

Tabela 3.6.1. Formulacije poliakrilamidnih gelova različitih koncentracija korišćenih za SDS-PAGE.

	Gel za koncetrovanje	**Gel za razdvajanje**	
Koncentracija gela	**5 %**	**7,5 %**	**12 %**
30 % Akrilamid	1,67 ml	3,5 ml	5,6 ml
Pufer*	1,25 ml	3,5 ml	3,5 ml
10 % SDS	100 µl	140 µl	140 µl
0.2 M EDTA	100 µl	140 µl	140 µl
H_2O	6,73 ml	6,65 ml	4,54 ml
10 % AMPS	157 µl	78,5 µl	78,5 µl
TEMED	17 µl	8,5 µl	8,5 µl

*Puferi za gel za koncetrovanje: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,95; puferi za gel za razdvajanje: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,95.

Elektorforeza je izvođena u aparaturi za vertikalnu elektroforezu Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Labaratories, Hercules, Kalifornija, SAD) u puferu za rezervoare (0,192 M glicin, 0,1 % SDS i 0,025 M Tris-HCl, pH8,3), na 4 °C, pri konstatnom naponu od 80 V dok su se proteini nalazili u gelu za koncetrovanje, odnosno 120 V nakon prelaska proteina u gel za razdvajanje.

3.6.4. Western blot

Nakon elektroforeze, izvršen je prenos razdvojenih proteina na poliviniliden-difluoridne (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore, Burlington, MA, SAD), polusuvim transferom pomoću aparature Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD). Transfer je izvođen pri konstantnom naponu od 25 V i jačini struje do 1 A, u trajanju od 40 min, na sobnoj temperaturi. Neposredno pre transfera, gelovi i membrane ekvilibrisani su inkubiranjem u puferu za transfer (0,025 M Tris, pH 8,3, 0,192 M glicin, 20 % metanol) u trajanju od 20 min uz mešanje, na sobnoj temperaturi.

3.6.5. Detekcija proteina na membrani

Efikasnost transfera proveravana je bojenjem membrana rastvorom Ponceau S (0,1 % u 1 % sirćetnoj kiselini). Nakon toga su membrane snimane na aparatu iBright FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific., Waltham, MA, SAD) radi kvantifikacije ukupnih proteina, a zatim odbojavane destilovanom vodom. Nespecifično vezivanje antitela za membrane sprečeno je blokiranjem u 1 % rastvoru odmašćenog mleka u fosfatnom puferu (PBS, engl. *Phosphate Buffer Saline*; 1,5 mM KH_2PO_4, 6,5 mM Na_2HPO_4, 2,7 mM KCl, 0,14 M NaCl, pH7,2) u trajanju od 60 min, uz mešanje, na sobnoj temperaturi. Zatim su membrane inkubirane sa odgovarajućim rastvorima zečijih primarnih antitela (Tabela 3.6.2), 90 min, uz blago mešanje, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sa primarnim antitelom, membrane su temeljno ispirane 0,1 % rastvorom deterdženta Tween 20 u PBS-u (PBS-T), pod vakuumom, korišćenjem aparata SNAP (Millipore, Burlington, MA, SAD). Potom su membrane inkubirane sa sekundarnim anti-zečjim IgG antitelom, konjugovanim sa peroksidazom iz rena (1:20000, AS10667, Agrisera, Švedska), u trajanju od 90 min, uz blago mešanje, na sobnoj temperaturi, nakon čega je usledilo ponovno ispiranje PBS-T rastvorom na aparatu SNAP. Imunospecifične trake vizualizovane su hemiluminiscentnom metodom, pri čemu je za pobuđivanje aktivnosti peroksidaze korišćen 1 % rastvor vodonik peroksida u luminolu. Imunoreakcija za svaki ciljni protein snimana je na iBright-u. Nakon snimanja, membrane su inkubirane prvo u 10 % rastvoru za uklanjanje vezanih antitela (Re-Blot Plus Mild Solution, Milipore, Burlington, MA, SAD) u trajanju od 20

min, a zatim ispirane u PBS-u, dva puta po 10 min, uz jače mešanje, na sobnoj temperaturi. Tako pripremljene membrane korišćene su u narednom ciklusu imunodetekcije.

Tabela 3.6.2. Karakteristike primarnih antitela korišćenih za detekciju ciljnih proteina metodom *Western blot*.

Ciljni proteini	Molekulska masa (kDa)	Razblaženje primarnog antitela	Koncentracija gela za razdvajanje (%)	Proizvođač i kataloški broj
Hsp101	101	1:2000	7,5	Agrisera, AS07 253
Hsp70	70	1:1500	7,5	Agrisera, AS08 371
Hsp17.6	17,6	1:2000	12	Agrisera, AS07 254
CAT	55-57	1:1000	12	Agrisera, AS09 501
APX	25-38	1:2000	12	Agrisera, AS08 368
MnSOD	25	1:2000	7,5	Agrisera, AS09 524
Cu/ZnSOD	19-22	1:1000	12	Agrisera, AS06 170

3.6.6. Analiza imunospecifičnih traka

Relativna optička gustina (intenzitet) imunospecifičnih traka, kao i intenzitet traka ukupnih ćelijskih proteina bojenih Ponceau S bojom, određivane su u softveru ImageQuant (verzija 5.2, 1999., Molecular dynamic, Sanvil, Kalifornija, SAD), u triplikatu, a rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AJ). Kako bi se umanjio uticaj varijabilnosti samih tehnika elektroforeze i Western blota i obezbedilo pouzdano poređenje intenziteta imunospecifičnih traka između različitih membrana, na svaki gel je, paralelno sa uzorcima, nanošena i interna kontrola (IK). Interna kontrola je pripremljena kao smeša svih ekstrakata korišćenih u eksperimentu, i nanošena je u pet ponavljanja.

Za normalizaciju intenziteta traka primenjena su dva uzastopna koraka, sa ciljem eliminisanja spoljašnjih izvora variranja i povećanja uporedivosti dobijenih rezultata. U prvom koraku, intenzitet svake imunospecifične trake normalizovan je deljenjem sa prosečnom vrednošću intenziteta traka interne kontrole (IK) na istoj membrani. Na isti način normalizovani su i intenziteti traka ukupnih proteina bojenih Ponceau S bojom, tako što je intenzitet trake ukupnih proteina svakog uzorka podeljen sa prosečnim intenzitetom traka interne kontrole ukupnih proteina na istoj membrani. Ovaj postupak omogućio je poređenje rezultata između različitih membrana i kompenzovao tehničke razlike u efikasnosti transfera i vezivanja antitela.

U drugom koraku, izvršena je dodatna normalizacija deljenjem vrednosti dobijene za imunospecifičnu traku (normalizovane na IK) vrednošću dobijenom za ukupne proteine istog uzorka (takođe normalizovanom na IK). Na ovaj način umanjene su greške koje mogu nastati tokom određivanja koncentracije proteina i prilikom nanošenja uzoraka na gel. Dvostepena normalizacija omogućila je da se uočene razlike u intenzitetu imunospecifičnih traka pripišu isključivo razlikama u količini ispitivanih proteina.

3.7. Statističke metode za obradu podataka

Osnovni parametri deskriptivne statistike (aritmetička sredina, standardna greška, standardna devijacija i koeficijent varijacije) izračunati su za sve analizirane osobine u oba eksperimenta u programskom okruženju R, korišćenjem softvera RStudio (R verzija 4.5.1, RStudio verzija 2025.05.1, R Core Team 2025). Prisustvo odstupajućih (ekstremnih) vrednosti proveravano je

izračunavanjem z-vrednosti i modifikovanih z-vrednosti, uz dodatnu vizuelnu procenu pomoću „box plot“ dijagrama. Odluka o zameni ekstremnih vrednosti donosila se uzimajući u obzir veličinu uzorka i stepen odstupanja u odnosu na ostale podatke unutar svake grupe. Odabrane ekstremne vrednosti zamenjene su aritmetičkom sredinom grupe (kada je potvrđena normalnost raspodele), ili medijanom (kada pretpostavka normalnosti podataka nije potvrđena). Pretpostavka normalnosti raspodele podataka proverenaje Šapiro-Vilk testom (engl. *Shapiro-Wilk*), pozivanjem funkcije *shapiro_test()* iz paketa 'rstatix' (verzija 0.7.2, Kassambara, 2023), kao i grafički korišćenjem Q-Q dijagrama.

3.7.1. Sezonska i godišnja dinamika anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u odgovoru na eksperimentalno povećanje temperature *in situ* (Eksperiment I)

Zavisne varijable u ovom eksperimentu (Eksperiment I) bile su pojedinačne vrednosti anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila*, dobijene merenjem na istim klonalnim genotipovima u dve temperaturne sredine (izvan i unutar OTC-a), u dve prirodne populacije, tokom dve sezone (proleće i leto), i dve uzastopne godine (2018. i 2019.). Pošto su vrednosti analiziranih osobina više puta određivane na istim biljkama tokom vremena, eksperimentalni dizajn spada u dizajn ponovljenih merenja (engl. *repeated measures*). Prema terminologiji ponovljenih merenja, individua na kojoj se vrše merenja u više vremenskih tačaka i/ili sredinskih uslova označava se kao subjekat, faktori čiji nivoi obuhvataju nezavisne grupe subjekata nazivaju se faktori između subjekata (engl. *between-subjects factors*), dok se vremenske tačke ili sredinski uslovi nazivaju ponovljeni faktori, odnosno faktori unutar subjekta (engl. *within-subject factors*) (O’Brien i Kaiser, 1985; Von Ende, 2001). U ovom eksperimentalnom dizajnu svaki klonalni genotip predstavljao je subjekat, temperaturni tretman (T) i populacija (P) su predstavljali faktore između subjektaa, a dok su sezona (S) i godina (G) predstavljale faktore unutar subjekata. Kako bi se ispitala dinamika promena osobina tokom vremena i razlike između grupa (temperaturnih tretmana i populacija), primenjena je analiza profila (engl. *profile analysis*), korišćenjem GLM procedure u statističkom softveru SAS (SAS Institute 9.1.3, 2011). Ovaj pristup predstavlja proširenu verziju multivarijatne analize varijanse (MANOVA) za slučajeve sa ponovljenim merenjima i fokusira se na analizu profila (tj. vektora) multivarijatnih podataka dobijenih višestrukim merenjima iste varijable kod istog subjekta u različitim vremenskim tačkama (Potvin i sar., 1990; Von Ende, 2001; Bulut i Desjardins, 2020). U okviru ovog pristupa, ponovljena merenja na svakom subjektu tretiraju se kao skup zavisnih varijabli. Analiza profila se zasniva na sledećim statističkim pretpostavkama: (1) zavisne varijable imaju višedimenzionalno normalnu raspodelu; (2) matrica varijanse i kovarijanse je homogena; (3) zavisne varijable su linearno povezane (Von Ende, 2001; Bulut i Desjardins, 2020). Ova analiza omogućava uvid u to da li različite grupe imaju slične ili različite obrasce odgovora kroz vreme, pri čemu kvantifikuje varijacije u nivou i obrascu odgovora. Prosečna vrednost vektora ponovljenih merenja predstavlja nivo profila odgovora, dok vektor odstupanja pojedinačnih vrednosti od prosečnog nivoa opisuje obrazac profila odgovora (Bulut i Desjardins, 2020). Analiza profila testira tri hipoteze: hipotezu „paralelizma“, hipotezu „nivoa“, i hipotezu „jednoličnosti“ prosečne krive odgovora.

Test „paralelizma“ ispituje da li je obrazac promena kroz vreme isti u svim grupama. U slučaju ovog eksperimentalnog dizajna, testira se da li je oblik prosečnog profila odgovora tokom sezona i godina isti za ramete koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a. Ova hipoteza se proverava MANOVA-om i odgovara interakcijama faktora između subjekta i faktora unutar subjekta (T x S, T x G i T x S x G). Odbacivanje nulte hipoteze ukazuje na to da prosečni profili odgovora nisu paralelni, tj. da se grupe razlikuju u obrascu promena kroz vreme. Ukoliko se hipoteza

paralelizma odbaci, testiranje preostale dve hipoteze gubi interpretativnu validnost i ne sprovodi se (Von Ende, 2001; Bulut i Desjardins, 2020).

Test „nivoa“ ispituje da li grupe imaju isti prosečni nivo odgovora. U ovom eksperimentalnom dizajnu, to znači da li se rameti istog genotipa razlikuju u prosečnim vrednostima ispitivanih osobina između temperaturnih tretmana (izvan i unutar OTC-a), kao i da li postoji razlika između populacija. Ova hipoteza se testira univarijantnim testom i u praksi odgovara glavnim efektima između subjekata: tretmana (T) i populacije (P). Ukoliko je efekat faktora bilo kog od ovih faktora značajan, nulta hipoteza o jednakim nivoima se odbija za taj faktor.

Test „jednoličnosti“ ispituje da li dolazi do promena kroz vreme, tj. da li su ponovljena merenja unutar grupe na istom nivou. Konkretno, proverava se postojanje sezonske i/ili godišnje dinamike u prosečnim vrednostima ispitivanih osobina. Ova hipoteza testira se MANOVA-om i odgovara glavnim efektima faktora unutar subjekta: sezone (S) i godine (G). Odbacivanje hipoteze o jednoličnosti ukazuje na postojanje značajnih promena srednjih vrednosti tokom vremena.

Kada su hipoteze o nivou i/ili jednoličnosti značajne, analiza profila je dodatno proširena unapred definisanim kontrastima, kako bi se preciznije utvrdilo u kojim vremenskim intervalima postoje razlike između tretmana. Za svaki kontrast sprovedene su pojedinačne ANOVA-e (*F*-testovi), pri čemu su kontrastne varijable dobijene transformacijom profila, kao razlike između susednih vremenskih tačaka tj. između proleća i leta u okviru svake godine (Von Ende, 2001).

Za osobine kod kojh je odbačena hipoteza paralelizma, testovi nivoa i jednoličnosti (koji pretpostavljaju paralelne profile odgovora) nisu dalje primenjivani. Umesto toga, sprovedene su analize kontrasta u statističkom softveru SAS (SAS Institute 9.1.3, 2011) (između subjekata i unutar subjekata) kako bi se odvojeno procenili glavni efekti i izbegla njihova međusobna interakcija. (Razlike između temperaturnih tretmana u svakoj vremenskoj tački (kontrasti *između subjekata) testirane* su korišćenjem GLM procedure, pri čemu je razlika između rameta izvan i unutar OTC-a definisana pomoću CONTRAST i ESTIMATE naredbi (koeficijenti 1 i -1). Razlike između sezona unutar svakog tretmana (kontrasti *unutar subjekata*) analizirane su korišćenjem PROC MIXED procedure, pri čemu su razlike između proleća i leta testirane odvojeno za svaku godine i tretman, primenom LSMEANS naredbe uz opciju SLICE = treatment**.**

Kako bi se procenila povezanost između merenih mikroklimatskih parametara i ispitivanih osobina lista, primenjena je robusna regresiona analiza u programskom okruženju R (RStudio). Ovaj pristup ne zahteva pretpostavke o normalnosti raspodele podataka niti o homogenosti varijanse, zbog čega je pogodan za analizu bioloških podataka sa velikom varijabilnošću i mogućim ekstremnim vrednostima. Robusna regresiona analiza izvedena je primenom funkcije *rlm()* iz paketa 'MASS' (Ripley i Venables, 2023), dok je značajnost regresionih koeficijenata testirana korišćenjem paketa 'lmtest' (Hothorn i sar., 2022) i 'sandwich' (Zeileis i Lumley, 2004). Paket 'dplyr' (Wickham i Henry, 2023) korišćen je za obradu i filtriranje podataka. Analize su sprovedene odvojeno za svaki temperaturni tretman (ambijentalna i povišena temperatura), kako bi se sagledale potencijalne razlike u odgovoru genotipova na lokalne abiotičke uslove. Nivo statističke značajnosti koeficijenata regresije (b) postavljen je na $P < 0,05$. U robusnim regresionim analizama korišćena su dva seta prediktora, u zavisnosti od analiziranih osobina lista. Prosečna temperatura vazduha tokom razvića lista, očitana sa data logera (TV_{DL}), korišćena je kao prediktor za anatomsko-morfološke osobine lista, budući da one odražavaju odgovor lista na uslove sredine tokom razvića. Parametri sredine mereni neposredno pre uzorkovanja, temperatura lista (T_L), temperatura zemljišta (T_Z) i vlažnost zemljišta (V_Z), korišćeni su kao prediktori za biohemijske osobine, jer reflektuju kratkoročni odgovor biljke na aktuelne mikroklimatske uslove.

Za ispitivanje povezanosti analiziranih osobina lista primenjena je Pirsonova korelaciona analiza korišćenjem funkcije *cor()* paketa 'stats' (R Core Team, 2025). Analize su sprovedene posebno za svaki temperaturni tretman (ambijentalna i povišena temperatura), kako bi se sagledale razlike u obrascima međuzavisnosti osobina pod različitim temperaturnim uslovima. U okviru svakog tretmana, korelacije su određene na celokupnom uzorku, kao i zasebno za svaki termin uzorkovanja (proleće i leto, 2018. i 2019. godine), čime je omogućen uvid u sezonsku i godišnju dinamiku odnosa između osobina. Pored toga, korelacije su analizirane i unutar svake od tri grupe funkcionalno povezanih osobina (anatomsko-morfološke osobine, Hsp i antioksidativni enzimi), kako bi se procenio stepen unutrašnje povezanosti osobina u okviru svakog funkcionalnog modula. Sličnost obrazaca korelacionih matrica između temperaturnih tretmana testirana je Mantelovim testom primenom funkcije *mantel()* iz paketa 'vegan' (Oksanen i sar., 2022).

3.7.2. Odgovori anatomsko-morfoloških osobina lista na eksperimentalno povećanje temperature *ex situ* (Eksperiment II)

Zavisne varijable u ovom eksperimentu (Eksperiment II) predstavljale su pojedinačne vrednosti anatomsko-morfoloških osobina lista genotipova *I. pumila* gajenih u kontrolisanim (*ex situ*) uslovima u dva različita temperaturna tretmana. Jednakost varijansi između temperaturnih tretmana proverena je *F*-testom korišćenjem paketa 'stats' (R Core Team, 2025). S obzirom na to da su merenja osobina lista vršena na istim genotipovima, uticaj temperature na izučavane osobine procenjen je analizom varijanse sa ponovljenim merenjima (engl. *repeated measures ANOVA*), korišćenjem odgovarajućih funkcija iz paketa 'stats'.

Povezanost između analiziranih osobina lista *I. pumila* u okviru svakog temperaturnog tretmana procenjena je Pirsonovim koeficijentom korelacije (r), korišćenjem funkcije *cor()* iz paketa 'stats'. Različitost obrazaca korelacija između temperaturnih tretmana testirana je Mantelovim testom (homogenost korelacionih matrica).

Pored analize pojedinačnih osobina lista, dodatno su analizirane i funkcionalna i mehanistička kategorija osobina, posmatrane kao celine. U kategoriju funkcionalnih osobina uključene su normalizovane vrednosti SLA i LDMC, dok su u kategoriju mehanističkih osobina uključene normalizovane vrednosti SLWC, LT, SD, I_1. Normalizacija je izvršena min–max metodom, prema formuli:

Xnorm = (X - Xmin) / (Xmax - Xmin)

gde je Xnorm normalizovana vrednost osobine, Xmin minimalna a Xmax maksimalna vrednost te osobine. Nakon normalizacije pojedinačnih vrednosti, izračunata je prosećna vrednost svih osobina unutar svake kategorije za svaki genotip i svaki temperaturni tretman. Nad ovim vrednostima sprovedene su iste statističke analize kao i za pojedinačne osobine: *F*-test za ispitivanje jednakost varijansi, analiza varijanse sa ponovljenim merenjima i Pirsonova korelaciona analiza.

3.7.3. Analiza fenologije cvetanja i reproduktivnog uspeha *I. pumila* u različitim temperaturnim sredinama (Eksperiment I)

Fenologija cvetanja praćena je tokom proleća 2019. godine u *in situ* ekperimentu. Za opis promena fenologije cvetanja u odgovoru na povećanje temperature određeni su ukupan broj cvetova, broj cvetova po klonalnom genotipu, proporcija klonalnih genotipova koji su cvetali, prosečan dan cvetanja, početak cvetanja (T0) i trajanje centralnog perioda cvetanja (T90-T10). Ovi parametri određeni su za svaki temperaturni tretman, za obe populacije zajedno kao i za svaku populaciju zasebno. Prosečan dan cvetanja izračunat je za svaku kombinaciju klonalnog genotipa i temperaturnog tretmana (klon–tretman jedinicu) kao zbir proizvoda dana cvetanja

i broja novootvorenih cvetova tog dana, podeljen ukupnim brojem cvetova te jedinice. Za svaku klon-tretman jedinicu koja je cvetala izračunat je kumulativni procenat otvorenih cvetova po danima tokom celog perioda cvetanja. T10 i T90 predstavljali su prve dane kada je dostignuto najmanje 10 %, odnosno 90 % ukupnog broja cvetova date klon-tretman jedinice, dok je trajanje centralnog perioda cvetanja izračunato kao razlika između T90 i T10. Početak cvetanja (T0) definisan je kao dan kada je zabeležen prvi otvoreni cvet za svaku kombinaciju temperaturnog tretmana i populacije.

Efekti temperaturnog tretmana (T), populacije (P) i njihove interakcije (T x P) na analizirane parametre fenologije cvetanja (ukupan broj cvetova, verovatnoću cvetanja, prosečan dan cvetanja i T90-T10) ispitani su različitim mešovitim modelima. U svim modelima, temperaturni tretman, populacija i njihova interakcija uključeni su kao fiksni efekti, dok je identitet klonalnog genotipa uključen kao slučajni efekat, čime je uzeta u obzir međusobna zavisnost podataka dobijenih iz dve klon-tretman jedinica istog genotipa (Bolker i sar., 2009; Brooks i sar., 2017).

Za ispitivanje efekata na ukupan broj cvetova po klon-tretman jedinici i verovatnoću cvetanja primenjeni su generalizovani linearni mešoviti modeli (GLMM, engl. *Generalized Linear Mixed Models*). GLMM omogućavaju analizu zavisnih promenljivih koje ne moraju imati normalnu raspodelu, uključujući podatke izražene kao broj događaja (engl. *count data*) i binarne podatke, uz istovremeno uključivanje fiksnih i slučajnih efekata (Bolker i sar., 2009). Pošto je broj cvetova diskretna zavisna promenljiva izražena celobrojnim vrednostima, za izbor odgovarajuće raspodele fitovana su tri puna modela sa identičnom strukturom fiksnih i slučajnih efekata, koji su se razlikovali samo prema pretpostavljenoj raspodeli: Poasonovoj, negativno-binomnoj tipa 1 (NB1) i negativno-binomnoj tipa 2 (NB2). Modeli su upoređeni na osnovu Akaikeovog informacionog kriterijuma, AIC (engl. *Akaike Information Criterion*), koji omogućava poređenje konkurentnih modela uzimajući u obzir njihovu prilagođenost podacima i složenost (Akaike, 1974; Tredennick i sar., 2021). Najnižu AIC vrednost imao je model sa NB2 raspodelom (Poasonova: AIC = 673,96; NB1: AIC = 657,42; NB2: AIC = 654,81), pa je ova raspodela korišćena u daljoj analizi. Cvetanje je definisano kao binarna zavisna promenljiva (0 = klon-tretman jedinica nije cvetala; 1 = klon-tretman jedinica je cvetala), a efekti T, P i T × P ispitani su binomnim GLMM-om sa logit funkcijom veze, koja omogućava modelovanje verovatnoće binarnog ishoda. GLMM-ovi za obe zavisne promenljive sprovedeni su na svih 136 klon-tretman jedinica.

Za ispitivanje efekata T, P i T × P na prosečan dan cvetanja i trajanje centralnog perioda cvetanja (T90-T10) primenjeni su linearni mešoviti modeli, (LMM, engl. *linear mixed-effects models*) sa Gausovom raspodelom reziduala. LMM omogućavaju analizu kontinuiranih zavisnih promenljivih uz istovremeno uključivanje fiksnih i slučajnih efekata (Bates i sar., 2015). LMM-ovi su sprovedeni samo na 108 klon-tretman jedinica koje su proizvele najmanje jedan cvet. Svi navedeni GLMM i LMM modeli fitovani su funkcijom *glmmTMB()* iz paketa 'glmmTMB' (verzija 1.1.14; Brooks i sar., 2017). Za svaku analiziranu zavisnu promenljivu značaj interakcije temperaturnog tretmana i populacije (T x P) procenjen je testom odnosa verodostojnosti (LRT, engl. *likelihood-ratio test*), poređenjem punog modela, koji je uključivao T, P i T × P efekte, sa redukovanim modelom koji je sadržao samo glavne efekte T i P. Puni modeli zadržani su za konačnu procenu efekata T i P. Za GLMM-e, puni i redukovani modeli fitovani su metodom maksimalne verodostojnosti (ML, engl. *maximum likelihood*). Za LMM-e su puni i redukovani modeli najpre fitovani ML metodom radi poređenja modela, a nakon testiranja interakcije puni modeli ponovo su fitovani metodom ograničene maksimalne verodostojnosti (REML, engl. *restricted maximum likelihood*) radi konačne procene parametara modela (Harville, 1977).

Efekti temperaturnog tretmana i populacije, kao i efekat temperaturnog tretmana unutar svake populacije, procenjeni su iz punih modela pomoću funkcija *emmeans()* i *contrast()* iz paketa

'emmeans' (verzija 2.0.4; Lenth i Piaskowski, 2026). Efekat temperaturnog tretmana predstavljao je poređenje eksperimentalno povišene i ambijentalne temperature, prosečno za obe populacije, dok je efekat populacije predstavljao poređenje Populacije 1 i Populacije 2, prosečno za oba temperaturna tretmana. Za model ukupnog broja cvetova veličina efekta izražena je kao odnos očekivanih stopa (IRR, engl. *incidence rate ratio*), dok je za model binarnog ishoda cvetanja izražena kao odnos šansi (OR, engl. *odds ratio*). Za prosečan dan cvetanja i T90-T10 efekti su izraženi kao razlike modelovanih vrednosti (Δ), u danima. Za svaku zavisnu promenljivu dodatno je procenjen efekat temperaturnog tretmana zasebno u Populaciji 1 i Populaciji 2. Za ova dva kontrasta *P*-vrednosti korigovane su Holmovom metodom pomoću funkcije *p.adjust()* iz paketa 'stats'. Za sve procene efekata određeni su 95 % intervali poverenja na osnovu procenjenog efekta i njegove standardne greške pomoću paketa 'emmeans'. Adekvatnost modela proverena je analizom simuliranih reziduala (DHARMa, engl. *residual Diagnostics for HierARchical Models*) pomoću paketa 'DHARMa' (verzija 0.5.0; Hartig, 2026), na osnovu 1000 simulacija. Funkcijama *testUniformity()*, *testDispersion()* i *testOutliers()* provereni su uniformnost raspodele reziduala, disperzija i prisustvo ekstremnih vrednosti. Za model ukupnog broja cvetova funkcijom *testZeroInflation()* dodatno je provereno da li je broj nultih vrednosti odstupao od očekivanog prema modelu. Kod modela prosečnog dana cvetanja test uniformnosti ukazao je na statistički značajno odstupanje ($P = 0{,}024$), zbog čega je sproveden dodatni test kvantila pomoću funkcije *testQuantiles()*, koji nije pokazao značajno odstupanje ($P = 0{,}117$). Ostali dijagnostički testovi nisu ukazali na statistički značajna odstupanja od očekivanja modela ($P > 0{,}05$), pa su konačni modeli, na osnovu ukupne rezidualne dijagnostike, ocenjeni kao adekvatni.

Za ispitivanje efekata temepraturnog tretmana i populacije na dnevnu dinamiku cvetanja tokom čitavog perioda cvetanja primenjen je generalizovani aditivni mešoviti model (GAMM, engl. *Generalized Additive Mixed Model*). GAMM je omogućio da se promena broja novootvorenih cvetova tokom vremena modeluje kao glatka (engl. *smooth*) nelinearna funkcija, čiji je oblik procenjen na osnovu podataka pomoću regresionih splajnova (engl. *regression splines*), odnosno glatkih funkcija sastavljenih od polinomskih delova koji su međusobno spojeni, uz penalizaciju složenosti funkcije (Lin i Zhang, 1999; Wood, 2017). Ovaj pristup bio je pogodan za analizirane podatke jer je zavisna promenljiva predstavljala dnevni broj novootvorenih cvetova po klon-tretman jedinici, dinamika cvetanja tokom vremena bila je nelinearna, a ponovljena dnevna opažanja poticala su od istih klon-tretman jedinica (Lin i Zhang, 1999; Pedersen i sar., 2019). Analiza je sprovedena na svih 2176 dnevnih opažanja (136 klon–tretman jedinica × 16 dana). Modeli su fitovani funkcijom *gam()* iz paketa 'mgcv' (verzija 1.9-4; Wood, 2017). Za izbor odgovarajuće raspodele zavisne promenljive fitovana su dva puna GAMM-a sa identičnom strukturom parametarskih, glatkih i slučajnih efekata, koji su se razlikovali samo prema pretpostavljenoj raspodeli zavisne promenljive: Poasonovoj ili negativno-binomnoj. Oba modela fitovana su metodom maksimalne verodostojnosti (ML) i upoređena na osnovu AIC vrednosti. Iako je Poasonov model imao nižu AIC vrednost (2022,67) od negativno-binomnog modela (2036,49), analiza simuliranih reziduala pokazala je statistički značajno odstupanje broja nultih vrednosti od očekivanog prema Poasonovom modelu ($P < 0{,}0001$). Kod negativno-binomnog modela broj nultih vrednosti nije značajno odstupao od očekivanog prema modelu ($P = 0{,}916$), pa je, na osnovu analize reziduala, negativno-binomna raspodela korišćena u daljoj analizi Konačni puni model može se prikazati sledećom jednačinom:

$$\log(\mu_{ijkt}) = \beta_0 + \beta_P P_i + \beta_T T_j + \beta_{PT} P_i T_j + f_i(t) + q_{ij}(t) + h_{ijk}(t) + b_k + u_t$$

gde je μ_{ijkt} očekivani broj novootvorenih cvetova genotipa k, iz populacije i, u temperaturnom tretmanu j, tokom dana t; Parametar β_0 predstavlja odsečak modela, dok su β_P, β_T i β_{PT} regresioni koeficijenti populacije, temperaturnog tretmana i njihove interakcije; P_i i T_j predstavljaju

odgovarajuće indikatorske promenljive populacije i temperaturnog tretmana; Glatka funkcija f_i(t) opisuje osnovnu vremensku dinamiku cvetanja specifičnu za populaciju, dok glatka funkcija q_{ij}(t) opisuje promenu oblika krive cvetanja povezanu sa temperaturnim tretmanom; Slučajni efekti: h_{ijk}(t) predstavlja slučajnu glatku vremensku putanju specifičnu za svaku klon–tretman jedinicu, čime su uzeta u obzir ponovljena dnevna opažanja iste eksperimentalne jedinice; b_k je slučajni efekat klonalnog genotipa, kojim je uzeta u obzir povezanost dve klon-tretman jedinice istog genotipa; u_t je slučajni efekat dana, zajednički svim klon–tretman jedinicama, kojim su obuhvaćena odstupanja specifična za pojedine dane koja nisu opisana glatkim vremenskim funkcijama. Struktura promene krive cvetanja usled temperaturnog tretmana određena je poređenjem tri negativno-binomna GAMM-a koji su se razlikovali prema načinu na koji je modelovan uticaj temperaturnog tretmana na oblik krive. U osnovnom modelu nije bila uključena dodatna glatka funkcija temperaturnog tretmana, odnosno q_{ij}(t)=0, pa je model omogućavao razlike između tretmana u opštem nivou broja cvetova preko parametarskih efekata, ali ne i razlike u obliku krive. U modelu sa zajedničkom promenom usled temperaturnog tretmana uvedena je dodatna glatka funkcija q_{ij}(t)=$T_j g$(t), čime je omogućeno da eksperimentalno povišena temperatura menja oblik krive cvetanja na isti način u obe populacije. U punom modelu promena oblika krive cvetanja usled temperaturnog tretmana bila je specifična za populaciju, q_{ij}(t)=$T_j g_i$(t), čime je omogućeno da efekat eksperimentalno povišene temperature na dnevnu dinamiku cvetanja ima različit vremenski oblik u Populaciji 1 i Populaciji 2.

U svim glatkim funkcijama koje su opisivale vremensku dinamiku cvetanja i promenu krive usled temperaturnog tretmana dimenzija baze bila je postavljena na k = 12, dok je stvarna složenost glatkih funkcija određivana penalizacijom tokom fitovanja modela (Wood, 2017). Tri navedena modela fitovana su metodom ML i upoređena na osnovu AIC vrednosti. Najnižu AIC vrednost imao je puni model (AIC = 2036,49), dok je model sa zajedničkom tretmanskom promenom imao sličnu podršku (AIC = 2037,82; ΔAIC = 1,33), a osnovni model slabiju podršku (AIC = 2041,21; ΔAIC = 4,72). S obzirom na to da je jedno od centralnih bioloških pitanja bilo da li se odgovor dinamike cvetanja na povišenu temperaturu razlikuje između populacija, a dva najbolje rangirana modela imala su sličnu AIK podršku, za konačnu procenu zadržan je puni model. Time je omogućeno da promena krive usled temperaturnog tretmana bude specifična za populaciju, umesto da se unapred pretpostavi isti oblik temperaturnog odgovora u obe populacije. Nakon izbora strukture, puni model ponovo je fitovan metodom REML. U konačnom modelu procenjena je statistička značajnost osnovnih glatkih funkcija dana cvetanja f_i(t) i glatkih funkcija promene usled temperaturnog tretmana specifičnih za populaciju q_{ij} (t).

Za procenu efekata temperature i populacije na ukupnu dinamiku cvetanja, pored testiranja pojedinačnih glatkih članova, izvedeni su i kontrasti celih modelovanih krivih. Za svaku kombinaciju populacije i temperaturnog tretmana procenjena je modelovana kriva na nivou populacije (ukupno 4 krive), pri čemu su iz predikcija isključene individualne glatke putanje klon–tretman jedinica i slučajni efekti klonalnog genotipa i dana. Kontrastima su ispitane razlike između modelovanih krivih: između temperaturnih tretmana uz jednaku zastupljenost obe populacije, između populacija uz jednaku zastupljenost oba temperaturna tretmana, između temperaturnih tretmana unutar svake populacije zasebno, kao i razlika u odgovoru na temperaturni tretman između populacija (T x P). Kontrasti su formirani na skali linearnog prediktora konačnog modela. Nesigurnost procenjenih kontrasta određena je na osnovu 5000 simuliranih skupova koeficijenata iz multivarijatne normalne raspodele definisane procenjenim koeficijentima modela i njihovom kovarijacionom matricom. Za svaki kontrast izračunato je maksimalno apsolutno standardizovano odstupanje između poređenih krivih tokom celog perioda cvetanja (T_{max}), a *P*-vrednost procenjena je kao udeo simulacija u kojima je simulirana vrednost T_{max} bila jednaka ili veća od opažene. Adekvatnost konačnog modela proverena je analizom simuliranih reziduala. Na osnovu 5000 simulacija, testovi uniformnosti,

disperzije, usklađenosti broja nultih vrednosti sa očekivanim prema modelu i prisustva ekstremnih reziduala nisu pokazali statistički značajna odstupanja (sve $P > 0,05$). Na osnovu ukupne dijagnostike reziduala, model je ocenjen kao adekvatan za analizu dnevne dinamike cvetanja. Za grafički prikaz, modelovane krive prikazane su na nivou populacije i temperaturnog tretmana, bez doprinosa individualnih glatkih putanja klon-tretman jedinica i ostalih slučajnih članova modela, a 95 % intervali poverenja procenjeni su na osnovu 1000 simulacija koeficijenata konačnog modela. Za zajednički prikaz obe populacije, modelovane vrednosti Populacije 1 i Populacije 2 sabrane su unutar svake simulacije.

Reproduktivni uspeh na nivou pojedinačne čaure procenjen je na osnovu broja i ukupne mase razvijenih semena. Analize su sprovedene na 123 pojedinačne čaure sa pouzdano utvrđenim brojem i masom razvijenih semena, koje su poticale od 56 klon–tretman jedinica i 43 klonalna genotipa. U oba modela, temperaturni tretman (T), populacija (P) i njihova interakcija (T × P) uključeni su kao fiksni efekti, dok su identitet klonalnog genotipa i identitet klon-tretman jedinice uključeni kao slučajni efekti, čime je uzeta u obzir zavisnost opažanja koja potiču od istog klonalnog genotipa, kao i zavisnost podataka o čaurama iste klon–tretman jedinice. Za ispitivanje efekata T, P i T x P na broj razvijenih semena po čauri ispitani primenjen je GLMM. Odgovarajuća raspodela izabrana je poređenjem dva puna modela sa istom strukturom fiksnih i slučajnih efekata, koji su se razlikovali samo prema pretpostavljenoj raspodeli: Poasonovoj i NB2. Model sa NB2 raspodelom imao je znatno nižu AIC vrednost (NB2: AIC = 1021,61; Poasonova: AIC = 1157,01), zbog čega je korišćen u daljoj analizi.

Efekti T, P i T x P na ukupnu masu razvijenih semena po čauri ispitani su LMM-om sa Gausovom raspodelom reziduala. Početni model pretpostavljao je jednaku rezidualnu varijansu u obe populacije, dok je alternativni, heteroskedastični model omogućavao različite rezidualne varijanse u Populaciji 1 i Populaciji 2. Alternativni model imao je nižu AIC vrednost (AIC =-38,15) od modela sa zajedničkom rezidualnom varijansom (AIC = -24,78), a njegovu bolju prilagođenost podacima potvrdio je i test odnosa verodostojnosti, LRT ($P < 0,001$), zbog čega je ova struktura rezidualne varijanse zadržana u konačnom modelu. Za obe zavisne promenljive značaj interakcije T x P procenjen je LRT-om, poređenjem punog modela sa odgovarajućim redukovanim modelom bez interakcije, pri čemu su modeli fitovani metodom maksimalne verodostojnosti (ML). Puni modeli zadržani su za konačnu procenu efekata T i P, kao i efekta T unutar svake populacije. Za LMM je, nakon poređenja punog i redukovanog modela, konačni puni model ponovo fitovan metodom ograničene maksimalne verodostojnosti (REML).

Efekti T i P, kao i efekat T unutar svake populacije, procenjeni su iz punih modela pomoću funkcija *emmeans()* i *contrast()* iz paketa 'emmeans'. Za broj razvijenih semena veličina efekta izražena je kao odnos očekivanog broja semena (IRR), dok je za ukupnu masu razvijenih semena izražena kao razlika modelovanih vrednosti (Δ), u gramima. Za dva kontrasta temperaturnog tretmana unutar populacija, *P*-vrednosti korigovane su Holmovom metodom. Za sve procene efekata određeni su intervali poverenja od 95 %. Adekvatnost konačnih modela proverena je analizom simuliranih reziduala, na osnovu 5000 simulacija. Na osnovu ukupne dijagnostike reziduala oba modela su ocenjena kao adekvatna. Odnos između broja i veličine semena ispitan je Spearmanovom korelacijom između prosečnog broja semena po čauri i prosečne mase pojedinačnog semena. Za svaki klonalni genotip i temperaturni tretman prethodno izračunate srednje vrednosti ovih osobina na nivou svih čaura sa izmerenim semenom, a analize su sprovedene odvojeno za svaki temperaturni tretman, kako za obe populacije zajedno, tako i za svaku populaciju zasebno.

3.7.4. Procena adaptivne vrednosti i analiza fenotipske selekcije na biohemijske osobine lista *I. pumila* u različitim temperaturnim sredinama (Eksperiment I)

Kao mera adaptivne vrednosti korišćen je broj semena po cvetnom rametu. Za svaku kombinaciju klonalnog genotipa i temperaturnog tretmana (klon-tretman jedinicu), apsolutna adaptivna vrednost (W) izračunata je kao količnik ukupnog broja razvijenih semena i ukupnog broja cvetnih rameta. Klon-tretman jedinice koje su cvetale, ali nisu formirale seme, zadržane su u analizi sa vrednošću $W = 0$, dok jedinice koje nisu cvetale nisu uključene u analizu. Analiza apsolutne adaptivne vrednosti obuhvatila je 108 klon-tretman jedinica koje su cvetale tokom 2019. godine, odnosno 63 klonalna genotipa. U Populaciji 1, analizirano je 27 klon-tretman jedinica izvan i 30 unutar OTC-a, a u Populaciji 2, 28 jedinica izvan i 23 unutar OTC-a. Efekti temperaturnog tretmana, populacije i njihove interakcije na apsolutnu adaptivnu vrednost ispitani su GLMM-om sa negativno-binomnom raspodelom tipa 2 (NB2) i logaritamskom funkcijom veze. U ovom modelu, ukupan broj semena predstavljao je zavisnu promenljivu, dok je logaritam broja cvetnih rameta uključen kao korekcioni član sa koeficijentom fiksiranim na 1 (engl. *offset*). Na taj način procenjivana je produkcija semena po cvetnom rametu, uz zadržavanje raspodele odgovarajuće za podatke izražene kao broj događaja (engl. *count data*). Temperaturni tretman, populacija i njihova interakcija uključeni su kao fiksni efekti, dok je identitet klonalnog genotipa uključen kao slučajni efekat, čime je uzeta u obzir zavisnost podataka dobijenih iz dve klon-tretman jedinice istog genotipa. Model je fitovan funkcijom *glmmTMB()* iz paketa 'glmmTMB', a statistička značajnost glavnih efekata i njihove interakcije procenjena je Valdovim (engl. *Wald*) χ^2 testom tipa III. Razlike između temperaturnih tretmana unutar svake populacije dodatno su procenjene kontrastima korišćenjem paketa 'emmeans', pri čemu su P-vrednosti za dva kontrasta korigovane Holmovom metodom.

Analiza fenotipske selekcije sprovedena je prema pristupu Landea i Arnolda (1983) regresijom relativne adaptivne vrednosti na standardizovane vrednosti biohemijskih osobina. Relativna adaptivna vrednost (w_i) izračunata je posebno za svaku kombinaciju populacije i temperaturnog tretmana, kao količnik apsolutne adaptivne vrednosti pojedinačne klon-tretman jedinice (W_i) i prosečne apsolutne adaptivne vrednosti svih jedinica uključenih u selekcionu analizu u istoj grupi ($\overline{W}$):

$$w_i = W_i / \overline{W}$$

Na ovaj način prosečna relativna adaptivna vrednost unutar svake kombinacije populacije i temperaturnog tretmana iznosila je 1.

Biohemijske osobine standardizovane su posebno unutar svake kombinacije populacije i temperaturnog tretmana na srednju vrednost 0 i standardnu devijaciju 1:

$$z_i = (x_i - \bar{x}) / s_x$$

gde je x_i vrednost osobine pojedinačne klon-tretman jedinice, $\bar{x}$ srednja vrednost, a s_x standardna devijacija osobine unutar odgovarajuće kombinacije populacije i temperaturnog tretmana.

Za selekcione analize korišćene su vrednosti biohemijskih osobina lista uzorkovanih u proleće 2019. godine (G2S1). Analiza je obuhvatila ukupno 49 klon–tretman jedinica koje su cvetale i za koje su određene vrednosti biohemijskih osobina. U Populaciji 1, analizirano je 12 klon-tretman jedinica izvan i 14 unutar OTC-a, a u Populaciji 2, 12 jedinica izvan i 11 unutar OTC-a. Pre selekcionih analza, vrednosti pojedinačnih izoformi Hsp17.6, APX i SOD najpre su normalizovane min-max metodom na celokupnom uzorku, a zatim sabrane kako bi se dobile njihove objedinjene vrednosti. Za procenu linearne fenotipske selekcije na pojedinačne

biohemijske osobine sprovedene su dve odvojene multivarijatne selekcione analize za svaku kombinaciju populacije i temperaturnog tretmana. U prvi model istovremeno su uključeni Hsp101, Hsp70 i ukupni Hsp17.6, dok su u drugi model uključeni CAT, ukupni APX i ukupni SOD. Parcijalni regresioni koeficijenti (β) predstavljali su linearne selekcione gradijente, odnosno povezanost pojedinačne osobine sa relativnom adaptivnom vrednošću kada su ostale osobine uključene u isti model (Lande i Arnold, 1983). Multikolinearnost prediktora u multivarijatnim modelima procenjena je na osnovu faktora inflacije varijanse (VIF, engl. *Variance Inflation Factor*). Da bi se ispitalo da li se linearni selekcioni gradijenti za pojedinačne Hsp proteine i antioksidativne enzime razlikuju između populacija i temperaturnih tretmana, sprovedena su dva odvojena linearna mešovita modela (LMM), jedan za Hsp, a drugi za antioksidativne enzime. U oba modela, relativna adaptivna vrednost predstavljala je zavisnu promenljivu, dok su populacija, temperaturni tretman, standardizovane biohemijske osobine i interakcije svake osobine sa populacijom, temperaturnim tretmanom, uključujući trostruku interakciju osobina x populacija x temperaturni tretman, tretirani su kao fiksni efekti. Identitet klonalnog genotipa predstavljao je slučajni efekat. Modeli su fitovani metodom ograničene maksimalne verodostojnosti (REML), primenom funkcije *lme()* iz paketa 'nlme' (Pinheiro i sar., 2026), a statistička značajnost interakcija procenjena je marginalnim *F*-testovima, pri čemu je svaki interakcioni efekat testiran uz ostale članove zadržane u modelu.

Pored pojedinačnih biohemijskih osobina, analizirane su i ukupne vrednosti Hsp i antioksidativnih enzima. Za njihovo formiranje, Hsp101, Hsp70 i ukupni Hsp17.6, odnosno CAT, ukupni APX i ukupni SOD normalizovani su min-max metodom na celokupnom uzorku, a zatim sabrani kako bi se dobile ukupne vrednosti Hsp, odnosno, antioksidativnih enzima. Dobijene ukupne vrednosti zatim su standardizovane unutar svake kombinacije populacije i temperaturnog tretmana, na isti način kao pojedinačne osobine. Za ukupne vrednosti Hsp i antioksidativnih enzima odvojeno su sprovedene univarijantne selekcione analize, u kojima je relativna adaptivna vrednost regresirana na jednu standardizovanu osobinu. Dobijeni regresioni koeficijent predstavljao je linearni selekcioni diferencijal (S) i opisivao ukupnu linearnu povezanost analizirane osobine sa relativnom adaptivnom vrednošću. Zatim je sprovedena multivarijatna selekciona analiza, u kojoj su ukupne vrednosti Hsp i antioksidativnih enzima istovremeno uključene kao prediktori, a njihovi parcijalni regresioni koeficijenti predstavljali su linearne selekcione gradijente (β).

Zbog relativno malog broja jedinica unutar pojedinačnih kombinacija populacije i temperaturnog tretmana, nesigurnost procenjenih selekcionih diferencijala i gradijenata procenjena je neparametarskim bootstrap postupkom sa 2000 ponavljanja (Efron i Tibshirani, 1993). U svakom bootstrap uzorku ponovo je izračunata relativna adaptivna vrednost, a biohemijske osobine su ponovo standardizovane. Na osnovu bootstrap raspodela određeni su 95 % intervali poverenja i *P*-vrednosti selekcionih koeficijenata.

3.7.5. Određivanje indeksa fenotipske plastičnosti

Kvantifikovanje fenotipske plastičnosti analiziranih osobina izvršeno je je izračunavanjem indeksa plastičnosti (*PI*) prema Valladares i sar. (2006), po formuli:

$PI = |X_1 - X_2| / (X_1 + X_2)$

gde X_1 i X_2 predstavljaju vrednosti date osobine istog genotipa u dva različita uslova. Indeks plastičnosti računat je: 1) između dva temperaturna tretmana (PI_T) i 2) između dve sezone, odnosno proleća i leta ($PI_{P\text{-}L}$). Vrednosti *PI* kreću se u rasponu od 0 (nepostojanje plastičnosti) do 1 (maksimalna plastičnost), čime se razlike između uslova normalizuju i omogućava poređenje osobina izraženih u različitim jedinicama i skalama. Da bi se utvrdilo da li se stepen fenotipske plastičnosti u odgovoru na povišenu temperaturu razlikuje između analiziranih

osobina, sprovedena je Fridmanova analiza varijanse nad vrednostima PI_T korišćenjem funkcije *friedman.test()* iz paketa 'stats' (R Core Team, 2025). Kao *post hoc* test za poređenje vrednosti *PI* između osobina, primenjen je Vilkoksonov test označenih rangova (engl. *Wilcoxon sign rank test*), korišćenjem funkcije *pairwise.wilcox.test()* iz paketa 'stats', uz argument paired = TRUE. *P*-vrednosti su korigovane Bendžamini-Hočbergovom (engl. Benjamini-Hochberg), (BH) metodom (p.adjust.method = "BH"), koja kontroliše stopu lažno pozitivnih rezultata, (engl. *False Discovery Rate,* FDR).

Razlike u vrednostima PI_T između proleća i leta testirane su Vilkoksonovim testom označenih rangova koristeći *wilcox.test()* sa argumentom paired = TRUE, iz paketa 'stats' (R Core Team, 2025), odvojeno za svaku godinu u okviru svake populacije. Razlike u vrednostima PI_T između populacija, za svaku kombinaciju sezone i godine (G1S1, G1S2, G2S1 i G2S2) testirane su Man-Vitni-Vilkoksonovim testom (engl. *Mann–Whitney Wilcoxon*) koji se još naziva i Vilkoksonov test suma rangova (engl. *Wilcoxon rank-sum test*), primenom funkcije *wilcox.test()* bez uparivanja (paired = FALSE), takođe iz paketa 'stats'.

Razlike u vrednostima $PI_{P\text{-}L}$ između temperaturnih tretmana (izvan OTC-a i unutar OTC-a) procenjene su Vilkoksonovim testom označenih rangova, odvojeno za svaku populaciju kao i objedinjeno za obe populacije, zatim odvojeno za svaku godinu kao i objedinjeno za obe godine. Isti test korišćen je i za ispitivanje razlika u vrednostima $PI_{P\text{-}L}$ između godina (2018. i 2019.) unutar svakog temperaturnog tretmana, za svaku populaciju zasebno kao i za obe populacije objedinjeno. Razlike između populacija u sezonskoj plastičnosti ($PI_{P\text{-}L}$) testirane su Man-Vitni-Vilkoksonovim testom, u okviru svakog temperaturnog tretmana, zasebno za svaku godinu i za obe godine objedinjeno.

S obzirom na to da su primenjeni neparametarski testovi uključivali višestruka poređenja u okviru svake analizirane osobine, *P*- vrednosti su korigovane Bendžamini-Hodžbergovom procedurom odvojeno za svaku osobinu u okviru svakog testa.

Kako bi se ispitao stepen koordinacije fenotipskog odgovora analiziranih osobina na temperaturni tretman, sprovedena je korelaciona analiza indeksa plastičnosti. U Eksperimentu I, povezanost *PI* procenjena je Pirsonovim koeficijentom korelacije. Zbog odstupanja od normalne raspodele *PI* vrednosti u Eksperimentu II, povezanost *PI* anatomsko-morfoloških osobina procenjena je Spirmanovim koeficijentom korelacije primenom funkcije *cor.test()*, metod = "spearman", iz paketa 'stats' (R Core Team, 2025).

Dodatno, kako bi se ispitalo da li se sa porastom prosečnog indeksa plastičnosti smanjuje varijabilnost fenotipskog odgovora sprovedena je Spearmanova korelaciona analiza između vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ i njihovih CV%. Za svaku pojedinačnu osobinu izračunate su prosečna vrednost $PI_{P\text{-}L}$ i odgovarajuća vrednost CV% odvojeno za svaki temperaturni tretman, populaciju i godinu, čime je dobijeno osam parova vrednosti po osobini, odnosno četiri para u okviru svakog temperaturnog tretmana. Dobijeni parovi vrednosti potom su, prema funkcionalnoj povezanosti osobina, objedinjeni u grupe: anatomsko-morfološka i biohemijska: Hsp i antioksidativni enzimi) Spearmanova korelaciona analiza između prosečnih vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ i odgovarajućih vrednosti CV% sprovedena je odvojeno za svaku funkcionalnu grupu u okviru svakog temperaturnog tretmana.

3.7.6. Određivanje indeksa integracije

U cilju procene integracije funkcionalno povezanih osobina lista kod genotipova *I. pumila,* sprovedena je analiza glavnih komponenti (PCA, engl. *Principal Component Analysis*), na korelacionim matricama analiziranih osobina. PCA je korišćena za identifikovanje obrazaca kovarijacije i proveru da li se osobine unutar iste funkcionalne grupe projektuju na iste glavne komponente. Analiza je sprovedena na celokupomn uzorku, kao i odvojeno po temperaturnim

tretmanima, radi procene stabilnosti obrazaca opterećenja glavih osa u različitim uslovima. Izvedena je u programskom R okruženju korišćenjem funkcije *prcomp()* iz paketa 'stats' (R Core Team, 2025).

Stepen integracije funkcionalno povezanih osobina kvantifikovan je pomoću relativne varijanse sopstvenih vrednosti, r*VE* (Pavlicev i sar., 2009). Sopstvene vrednosti (λ) dobijene su iz PCA rezultata na korelacionim matricama, a r*VE* je definisana kao odnos varijanse sopstvenih vrednosti i maksimalne moguće varijanse :

$r_{VE} = Var(\lambda) / Var_{max}(\lambda)$

Za korelacione matrice maksimalna varijansa sopstvenih vrednosti iznosi (N-1), gde je N broj analiziranih osobina, pa je r*VE* izračunata prema formuli:

$r_{VE} = Var(\lambda) / (N-1)$

Vrednosti r*VE* izračunate su za svaku od grupa funkcionalno povezanih osobina lista (anatomsko-morfološke i biohemijske: Hsp i antioksidativni enzimi), posebno za ramete koji su rasli u različitim temperaturnim uslovima (izvan i unutar OTC-a) korišćenjem funkcija *prcomp()* i *var()* iz paketa 'stats' (R Core Team, 2025). Time je omogućena procena da li temperaturni tretman utiče na stepen integracije, kao i da li se taj efekat menja u zavisnosti od sezone i godine. Zbog toga su r*VE* vrednosti računate za celokupan uzorak, kao i odvojeno za svaku kombinaciju sezone i godine.

Intervali poverenja za r*VE* procenjeni su metodom bootstrap (10.000 ponavljanja), nezavisno za svaki temperaturni tretman i svaku vremensku tačku. Pošto je svaki genotip istovremeno rastao u dve temperaturne sredine, razlike u r*VE* vrednostima između temperaturnih tretmana testirane su permutacionim testovima za uparene podatke (10000 permutacija), čime je procenjen uticaj temperaturnog tretmana na integraciju osobina na nivou ukupnog uzorka i pojedinačnih vremenskih tačaka. Sve analize su sprovedene u R okruženju, uz korišćenje funkcija za permutacije i ponovna uzorkovanja, kao i paketa 'dplyr' i 'purrr' za obradu i organizaciju podataka (Wickham i sar., 2023; Wickham i Henry, 2023).

3.7.7. Grafički prikaz podataka

Za izradu grafičkih prikaza korišćeni su različiti softverski alati, u zavisnosti od vrste analize i tipa grafika. Grafici koji prikazuju norme reakcija i boks-plotovi korišćeni za prikaz indeksa plastičnosti izrađeni su u programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, SAD). U programskom R okruženju, u okviru softvera RStudio (R verzija 4.5.1, RStudio verzija 2025.05.1, R Core Team 2025), korišćen je paket 'corrplot' (Wei i Simko, 2021) za izradu toplotnih mapa korelacionih odnosa, dok je paket 'ggplot2' (Wickham i sar., 2023) korišćen za prikaz procentualnih udela proteina i vizuelizaciju razlika u indeksu integracije (*rVE*). Završna grafička obrada i formatiranje figura izvršeni su u programima Adobe Illustrator CC 2015 (Adobe, SAD), Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe, SAD) i CorelDRAW X8 2016 (Corel Corporation, Kanada).

4. REZULTATI

4.1. Vremenska dinamika fenotipskih odgovora anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* na povećanje temperature *in situ*

4.1.1. Abiotički uslovi staništa

Klimatski parametri koji ilustruju mikrosredinske uslove koji su vladali u okruženju svakog klona u vreme uzorkovanja prikazani su u Tabeli 4.1.1. Merenje trenutne temperature površine listova, vazduha i zemljišta, kao i procenat vlage u zemljištu, izvršeno je neposredno pre uzorkovanja, dok je merenje temperature vazduha data logerima, izvan i unutar OTC-a, vršeno na svakih 30 minuta tokom čitavog perioda razvića lista.

Prosečne vrednosti trenutne temperature vazduha (T_V) i zemljišta (T_Z) razlikovale su se između alternativnih temperaturnih staništa, izvan i unutar OTC-a. U obe sezone tokom dve godine, prosečne vrednosti trenutne temperature vazduha bile su više, a prosečne vrednosti temperature zemljišta niže unutar OTC-a, u odnosu na odgovarajuće vrednosti zabeležene izvan OTC-a. Slično trenutnoj temperaturi vazduha (T_V), i prosečna vrednost temperature vazduha očitanih sa data logera (T_{VDL}) bila je konstantno viša unutar OTC-a nego izvan njih. Takođe, prosečna vrednost trenutne temperature lista (T_L) konstantno je bila viša kod rameta koji su se razvijali unutar OTC-a u odnosu na ramete koji su se razvijali izvan njih, što je bilo u skladu sa uočenim obrascem prosečnih vrednosti temperatura vazduha (T_V i T_{VDL}). Temperaturni trendovi uočeni tokom celog eksperimentalnog perioda, tj. tokom dve sezone, proleća i leta, i dve uzastopne godine, 2018. i 2019. bili su slični u obe prirodne populacije *I. pumila*. Prosečna vrednost vlažnosti zemljišta, Vz (%), bila je relativno konstantna u okviru svakog klona, bez obzira na to da li je u pitanju bio deo izvan odnosno unutar OTC-a (Tabeli 4.1.1).

Obrazac sezonskog variranja prosečnih vrednosti trenutne temperature vazduha i vlažnosti zemljišta, izvan i unutar OTC-a, razlikovao se između dve analizirane godine. Tokom 2018. godine, prosečna vrednost temperature vazduha bila je viša u proleće nego u leto, dok je tokom 2019. godine, prosečna vrednost temperature vazduha bila viša u leto nego u proleće. Istovremeno, prosečna vrednost vlažnosti zemljišta je tokom 2018. godine bila viša u leto nego u proleće, a tokom 2019. godine u proleće nego u leto. Osim toga, prosečna vrednost trenutne temperature vazduha izmerena tokom proleća 2018. godine bila je viša od one izmerene u proleće 2019. godine, dok je prosečna vrednost vlažnosti zemljišta izmerena u proleće 2018. godine bila niža od one izmerene u proleće 2019. godine. Što se tiče letnjih prosečnih vrednosti temperatura vazduha i vlažnosti zemljišta, vazduh je bio topliji a zemljište suvlje u leto 2019. nego u leto 2018. godine. Što se temperature zemljišta tiče, prosečne vrednosti su uvek bile više u leto nego u proleće. Sumarno, klimatske uslove u Deliblatskoj peščari tokom 2018. godine karakterisali su izuzetno suvo, toplo proleće i kišovito leto, dok su 2019. godinu obeležili kišovito proleće i vruće, suvo leto. (Tabeli 4.1.1).

Tabela 4.1.1. Mikroklimatski parametri ($\bar{X}$ ± SE): trenutna temperatura vazduha (T_V), temperatura vazduha očitana sa data logera (T_{VDL}), trenutna temperatura lista (T_L), trenutna temperatura zemljišta (T_Z), trenutna vlažnost zemljišta (V_Z), izmereni izvan i unutar OTC-a, tokom dve sezone (proleće i leto) i dve uzastopne godine (2018. i 2019) u dve prirodne populacije *I. pumila* u Deliblatkoj peščari (Populacija 1, *n* = 24 i Populacija 2, *n* = 21). Statistička značajnost razlika utvrđena je *t*-testom: ns- nije značajno, **P* < 0,05; ** *P* < 0,01; *** *P* < 0,001; **** *P* < 0,0001.

Mikroklimatski parametri	**Godina 1**						**Godina 2**					
	Proleće			**Leto**			**Proleće**			**Leto**		
	Izvan OTC-a	**Unutar OTC-a**	***P***	**Izvan OTC-a**	**Unutar OTC-a**	***P***	**Izvan OTC-a**	**Unutar OTC-a**	***P***	**Izvan OTC-a**	**Unutar OTC-a**	*P*
T_V (^{0}C)												
Populacija1	32,3 ± 0,3	34,3 ± 0,3	****	29,4 ± 0,1	29,7 ± 0,2	ns	28,2 ± 0,2	28,5 ± 0,2	ns	32,2 ± 0,3	33,5 ± 0,3	****
Populacija2	31,7 ± 0,4	34,1 ± 0,4	****	31,4 ± 0,4	32,3 ± 0,4	***	26,7 ± 0,2	27,1 ± 0,2	ns	31,5 ± 0,3	32,5 ± 0,4	****
Obe populacije	32,0 ± 0,4	34,2 ± 0,4	****	30,4 ± 0,3	31,0 ± 0,3	***	27,4 ± 0,2	27,8 ± 0,2	*	31,9 ± 0,3	33,0 ± 0,4	****
T_{VDL} (^{0}C)												
Populacija1	20,0 ± 0,1	21,4 ± 0,2	***	26,9 ± 0,2	27,7 ± 0,2	****	23,9 ± 0,1	24,7 ± 0,1	****	26,4 ± 0,1	28,5 ± 0,2	***
Populacija2	19,9 ± 0,1	21,0 ± 0,1	***	27,0 ± 0,2	29,4 ± 0,2	**	20,7 ± 0,2	23,0 ± 0,5	**	28,1 ± 0,2	29,4 ± 0,4	**
Obe populacije	20,0 ± 0,1	21,2 ± 0,2	***	27,0 ± 0,2	28,5 ± 0,2	***	22,3 ± 0,2	23,8 ± 0,3	***	27,2 ± 0,2	29,0 ± 0,3	***
T_L (^{0}C)												
Populacija1	30,9 ± 0,4	31,5 ± 0,3	ns	29,4 ± 0,5	30,8 ± 0,6	**	27,2 ± 0,5	28,2 ± 0,4	*	32,9 ± 0,3	33,6 ± 0,3	*
Populacija2	31,3 ± 0,7	31,7 ± 0,6	ns	30,3 ± 0,4	31,7 ± 0,4	**	27,4 ± 0,4	27,5 ± 0,4	ns	31,9 ± 0,4	32,6 ± 0,5	**
Obe populacije	31,1 ± 0,6	31,6 ± 0,5	ns	29,8 ± 0,5	31,3 ± 0,5	*	27,3 ± 0,5	27,8 ± 0,4	ns	32,4 ± 0,4	33,1 ± 0,4	*
T_Z (^{0}C)												
Populacija1	18,0 ± 0,2	17,5 ± 0,2	*	23,5 ± 0,3	23,0 ± 0,2	**	13,8 ± 0,3	13,6 ± 0,3	ns	24,7 ± 0,3	24,8 ± 0,3	ns
Populacija2	20,6 ± 0,3	19,3 ± 0,3	****	24,1 ± 0,3	23,7 ± 0,3	*	14,1 ± 0,4	12,9 ± 0,4	****	24,1 ± 0,4	23,8 ± 0,3	ns
Obe populacije	19,3 ± 0,3	18,4 ± 0,3	****	23,8 ± 0,3	23,4 ± 0,3	***	14,0 ± 0,4	13,3 ± 0,4	***	24,4 ± 0,4	24,3 ± 0,3	ns
V_Z (%)												
Populacija1	5,0 ± 0,1	4,8 ± 0,1	ns	9,2 ± 0,4	9,2 ± 0,4	ns	8,5 ± 0,3	8,6 ± 0,3	ns	4,6 ± 0,1	4,6 ± 0,1	ns
Populacija2	5,3 ± 0,3	5,4 ± 0,3	ns	7,4 ± 0,3	7,0 ± 0,3	ns	8,8 ± 0,3	8,5 ± 0,3	ns	4,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2	ns
Obe populacije	5,2 ± 0,2	5,1 ± 0,2	ns	8,3 ± 0,4	8,1 ± 0,4	ns	8,6 ± 0,3	8,6 ± 0,3	ns	4,6 ± 0,2	4,7 ± 0,2	ns

4.1.2. Fenotipski odgovori funkcionalnih i mehanističkih osobina lista u različitim temperaturnim sredinama

Kako bi se ispitali fenotipski odgovori funkcionalnih i mehanističkih osobina lista na povećanje temperature, vrednosti SLA, LDMC, SLWC i LT određivane su na istim klonalnim genotipovima *I. pumila* iz dve prirodne populacije, koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a tokom dve sezone (proleće i leto) i dve godine (2018. i 2019.).

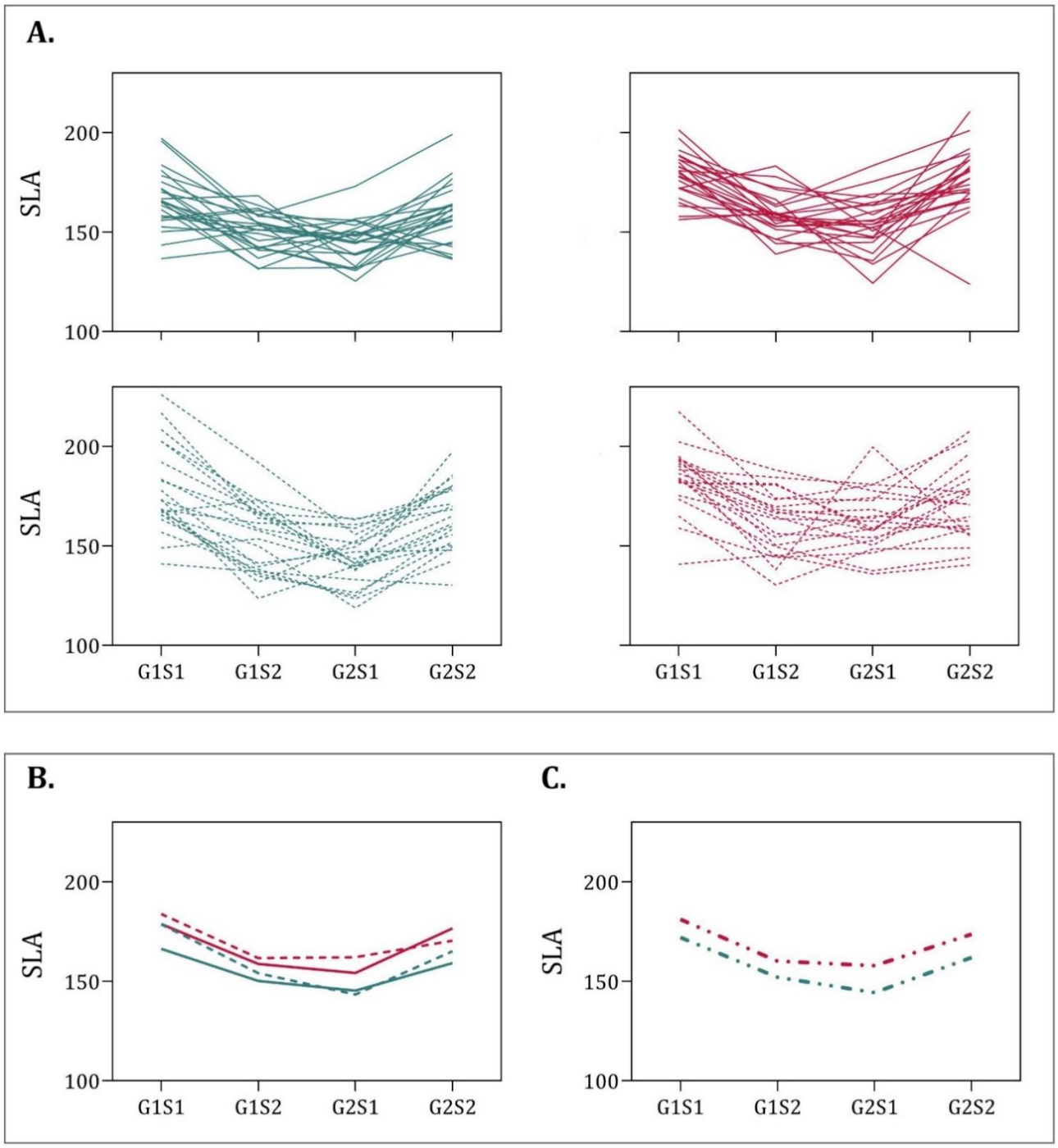
Prosečne vrednosti ($\bar{X}$) i odgovarajuće standardne greške (SE) za funkcionalne (SLA i LDMC) i mehanističke (SLWC i LT) osobine lista prikazane su u Tabeli 4.1.2. Kao što se može uočiti, vrednosti ispitivanih osobina lista menjale su se sa porastom temperature vazduha, a obrazac njihovog variranja bio je specifičan za svaku osobinu. Posmatrajući funkcionalne osobine lista, tokom celog vegetacionog perioda u obe populacije prosečne vrednosti SLA bile su više (do 9 %) a prosečne vrednosti LDMC niže (do 4 %) kod rameta koji su se razvijali unutar OTC-a, na eksperimentalno povišenoj temperaturi, u poređenju sa rametima istog klona koji su se razvijali izvan OTC-a, na ambijentalnoj temperaturi. Kada su u pitanju mehanističke osobine, prosečne vrednosti SLWC i LT bile su niže (do 8 % odnosno 9 %,) kod razvijali unutar OTC-a u odnosu na one koji su se razvijali izvan OTC-a. Svi opisani obrasci promena bili su slični tokom obe eksperimentalne godine (Slike 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3. i 4.1.4; Tabele 4.1.2. i 4.1.6). Dodatno je uočeno da se prosečne vrednosti funkcionalnih osobina (SLA i LDMC) nisu značajno razlikovale između populacija, dok su prosečne vrednosti mehanističkih osobina (SLWC i LT) bile više kod rameta iz Populacije 1 u poređenju sa rametima iz Populacije 2 (Tabele 4.1.2. i 4.1.6).

Osim što su analizirane pojedinačno, funkcionalne i mehanističke osobine lista su analizirane i na nivou kategorija kao celine (Slike 4.1.5. i 4.1.6; Tabela 4.1.3). Utvrđeno je da su, nezavisno od sezone i godine, prosečne vrednosti kategorije funkcionalnih osobina bile više (do 15 %) dok su prosečne vrednosti kategorije mehanističkih osobina bile niže (do 30 %) kod rameta koji su se razvijali na povišenoj temperaturi u odnosu na ramete koji su se razvijali na ambijentalnoj temperaturi (Tabela 4.1.3). Dodatno, za obe kategorije osobina, nezavisno od temperaturnog tretmana, uočeno je i sezonsko variranje koje je bilo suprotnog trenda. Tako su prosečne vrednosti za kategoriju funkcionalnih osobina bile više u leto nego u proleće, dok su prosečne vrednosti za kategoriju mehanističkih osobina bile više u proleće nego u leto (Slike 4.1.5. i 4.1.6). Prosečne vrednosti kategorija osobina razlikovale su se između populacija: rameti iz Populacije 1 imali su više vrednosti mehanističkih osobina dok su rameti iz Populacije 2 imali više vrednosti funkcionalnih osobina (Slike 4.1.5. i 4.1.6; Tabela 4.1.3).

Imajući u vidu da su stome ključni regulatori transpiracije i razmene gasova, i da njihova uloga u termalnoj aklimatizaciji biljaka još uvek nije u potpunosti razjašnjena, u okviru mehanističkih osobina dodatno su analizirani i morfološki parametri stoma: gustina stoma (SD) i indeks stoma (SI). Ove osobine praćene su kod 11 istih klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve populacije, izvan i unutar OTC-a, tokom proleća i leta 2019. godine. Reprezentativne mikrografije otisaka epidermisa listova, na osnovu kojih su određene vrednosti SD i SI, prikazane su na Slici 4.1.7, dok su prosečne vrednosti ($\bar{X}$), odgovarajuće standardne greške (SE) kao i koeficijenti varijacije (CV%) prikazani u Tabeli 4.1.4.

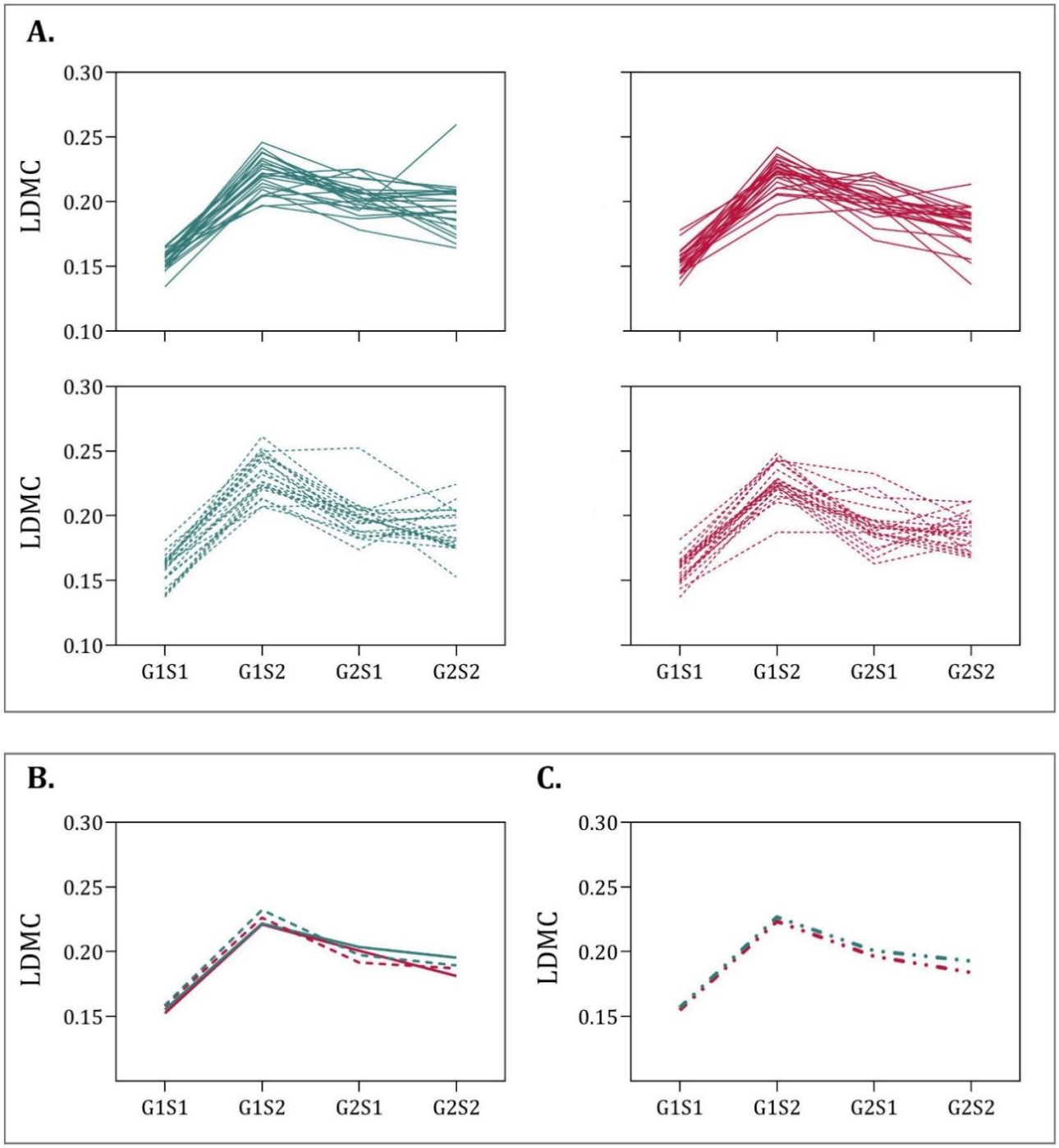
Tabela 4.1.2. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SE) anatomsko-morfoloških osobina lista genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 24 i Populacija 2, *n* = 21), ispoljene tokom dve sezone (proleće i leto) i dve uzastopne godine (2018. i 2019), izvan i unutar OTC-a. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Osobine lista	Godina 1								Godina 2							
	Proleće				Leto				Proleće				Leto			
	Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a	
	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE
Populacija 1																
SLA	164,97	2,65	177,78	2,36	151,03	1,85	157,75	1,84	144,12	1,79	155,52	2,43	157,56	2,46	178,83	2,49
LDMC	0,156	0,001	0,151	0,002	0,223	0,003	0,222	0,002	0,205	0,002	0,202	0,002	0,193	0,003	0,183	0,003
SLWC	0,033	0,001	0,032	0,001	0,024	0,001	0,022	0,001	0,027	0,001	0,026	0,001	0,026	0,001	0,026	0,001
LT	0,039	0,001	0,037	0,001	0,030	0,001	0,028	0,001	0,034	0,001	0,032	0,001	0,032	0,001	0,031	0,001
Populacija 2																
SLA	176,3	4,22	186,06	2,70	152,17	3,30	163,25	3,14	144,6	2,62	160,23	2,79	166,87	3,19	168,60	3,58
LDMC	0,157	0,002	0,157	0,002	0,231	0,003	0,228	0,002	0,195	0,002	0,190	0,003	0,191	0,003	0,186	0,003
SLWC	0,030	0,001	0,029	0,001	0,022	0,001	0,021	0,001	0,029	0,001	0,026	0,001	0,026	0,001	0,025	0,001
LT	0,036	0,001	0,034	0,002	0,028	0,001	0,027	0,001	0,036	0,001	0,032	0,001	0,032	0,001	0,031	0,001
Obe populacije																
SLA	170,26	2,54	181,64	2,14	151,56	1,81	160,32	1,79	144,34	1,53	157,72	1,85	161,92	2,08	174,06	2,25
LDMC	0,157	0,001	0,154	0,001	0,227	0,002	0,225	0,002	0,200	0,002	0,196	0,002	0,192	0,002	0,184	0,002
SLWC	0,032	0,001	0,030	0,001	0,023	0,001	0,022	0,001	0,028	0,001	0,026	0,001	0,026	0,001	0,026	0,001
LT	0,037	0,001	0,036	0,001	0,029	0,001	0,028	0,001	0,035	0,002	0,032	0,001	0,032	0,001	0,031	0,001



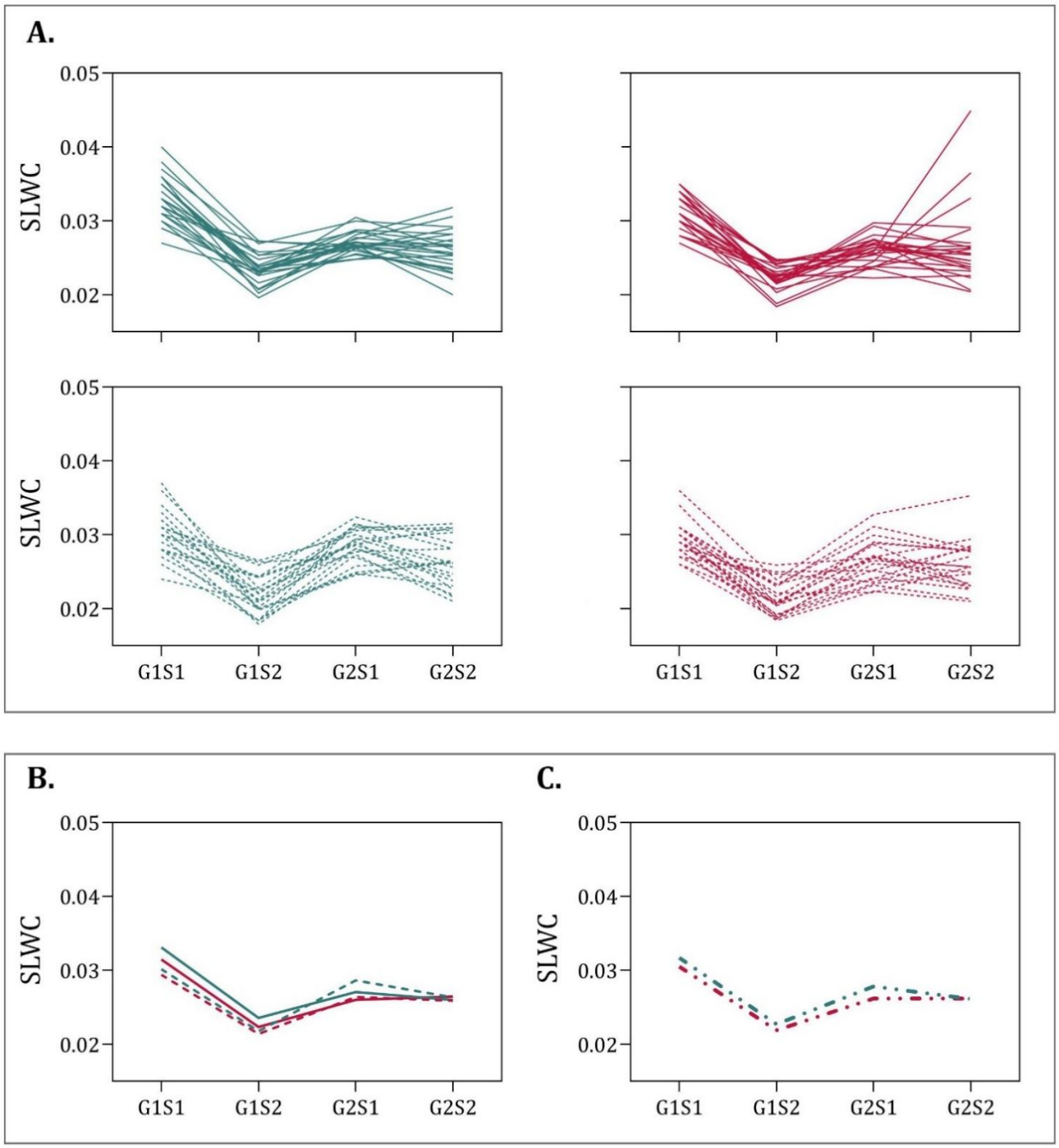
Slika 4.1.1. Sezonsko variranje SLA *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.



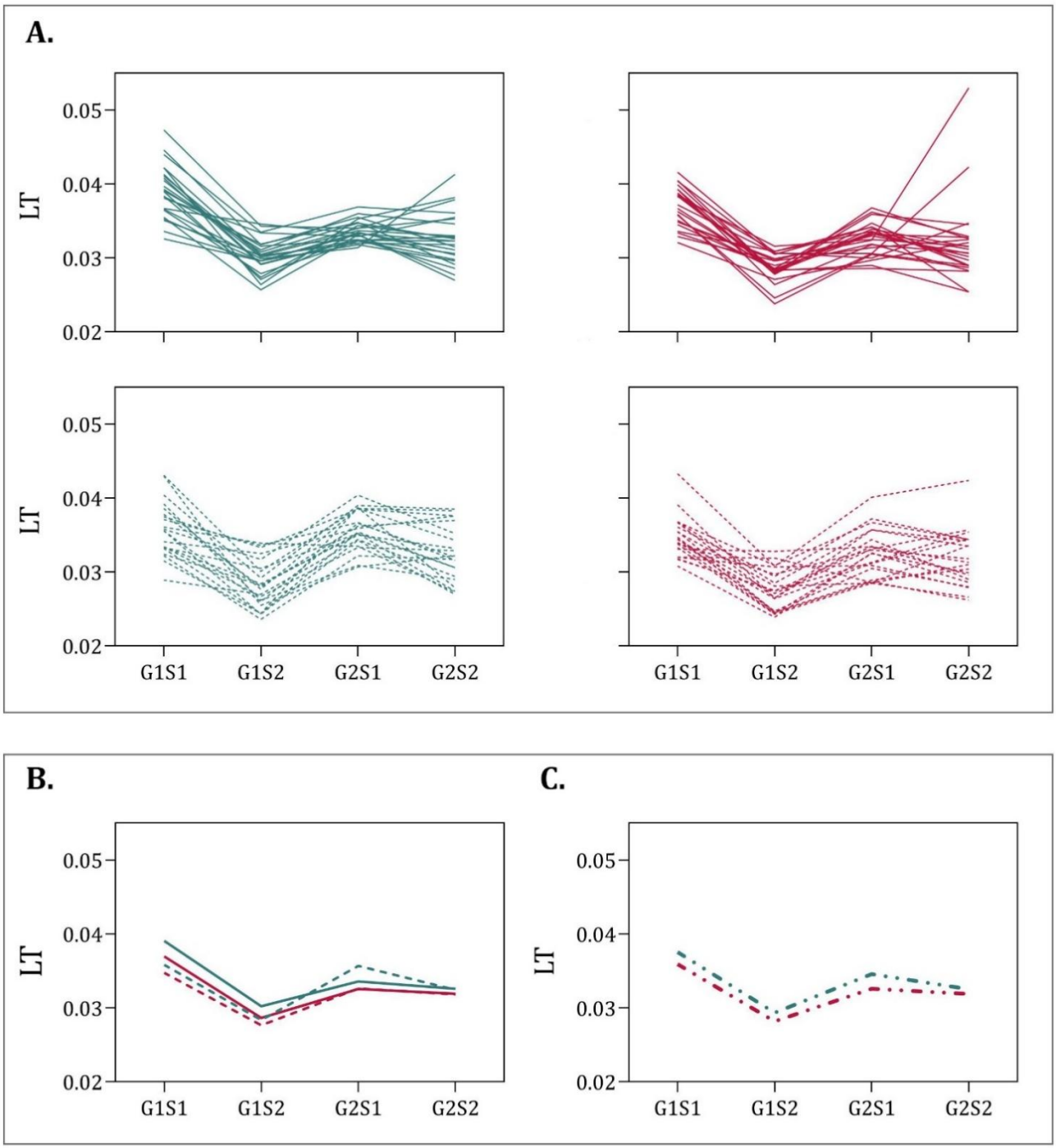
Slika 4.1.2. Sezonsko variranje LDMC *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.



Slika 4.1.3. Sezonsko variranje SLWC *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

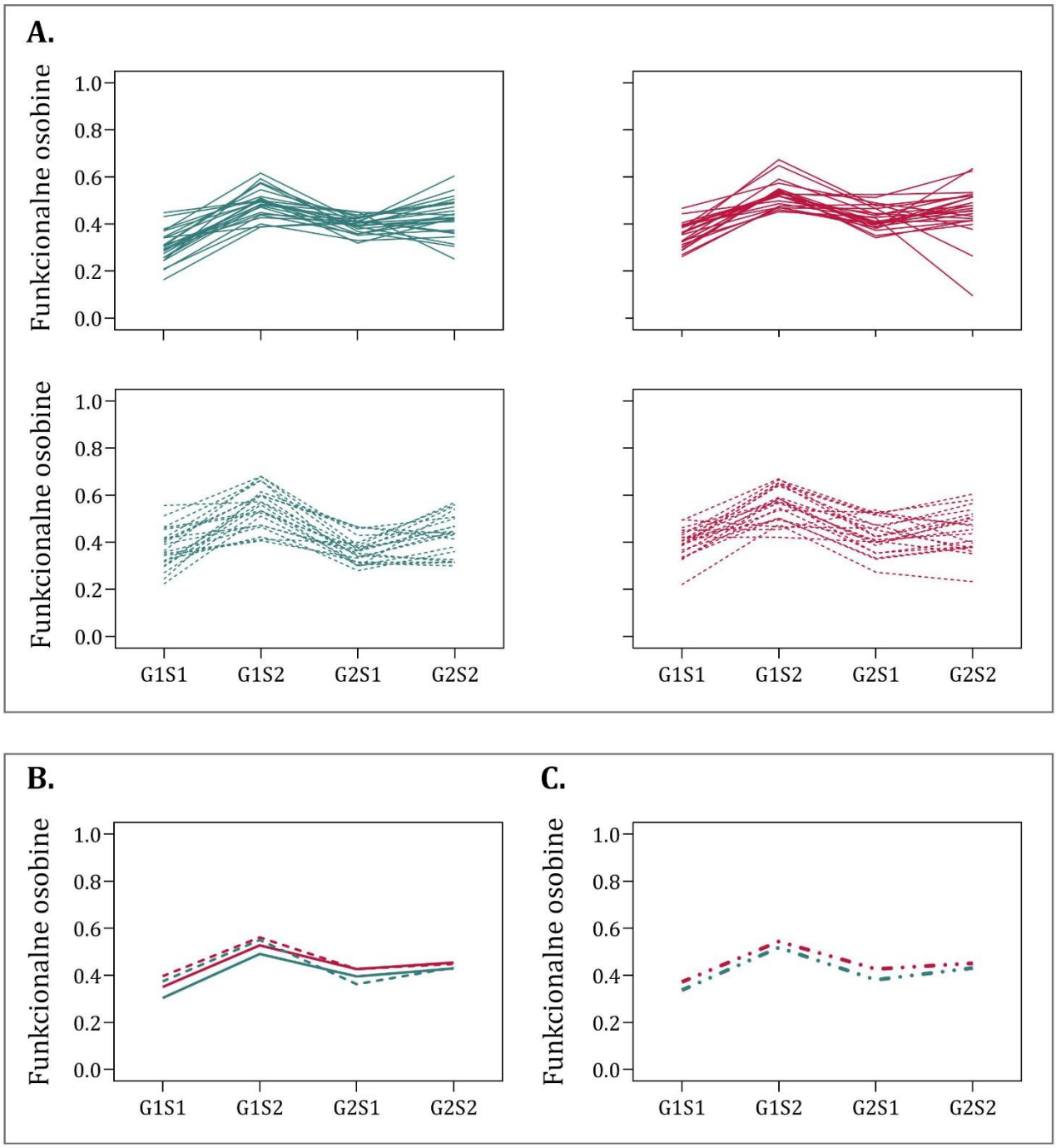


Slika 4.1.4. Sezonsko variranje LT *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

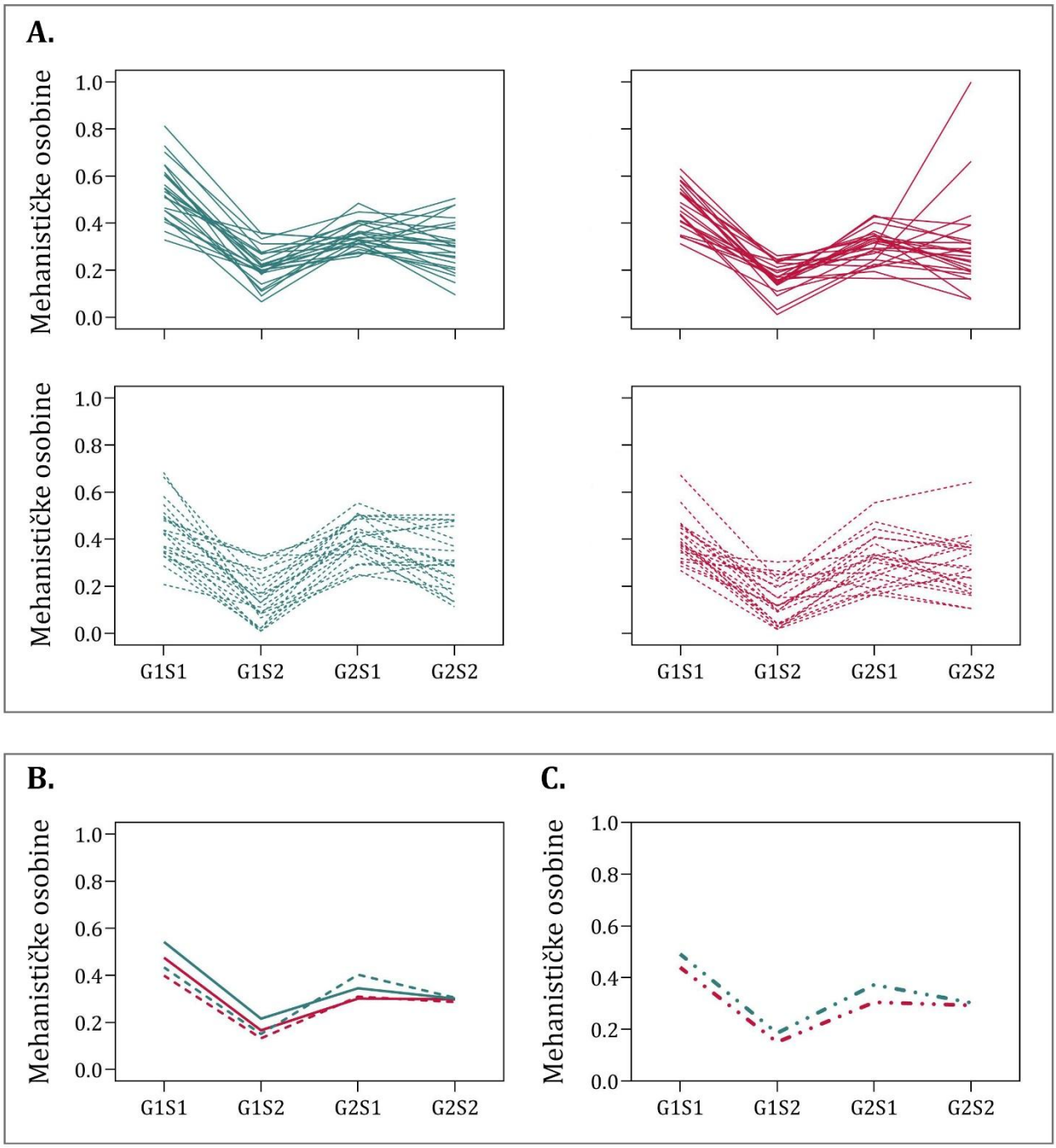
Tabela 4.1.3. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SE) funkcionalnih i mehanističkih kategorija osobina lista klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 24 i Populacija 2, *n* = 21), ispoljene tokom dve sezone (proleće i leto) i dve uzastopne godine (2018. i 2019), izvan i unutar OTC-a.

Osobine lista	Godina 1								Godina 2							
	Proleće				Leto				Proleće				Leto			
	Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a	
	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE
Populacija 1																
Funkcionalne	0,304	0,014	0,351	0,011	0,491	0,013	0,528	0,011	0,396	0,007	0,427	0,010	0,430	0,017	0,454	0,022
Mehanističke	0,543	0,024	0,476	0,019	0217	0,016	0,167	0,013	0,346	0,011	0,302	0,015	0,302	0,022	0,299	0,039
Populacija 2																
Funkcionalne	0,375	0,019	0,397	0,014	0,551	0,019	0,562	0,017	0,363	0,012	0,427	0,016	0,433	0,019	0,449	0,020
Mehanističke	0,434	0,027	0,400	0,021	0,151	0,023	0,133	0,019	0,404	0,019	0,310	0,024	0,306	0,028	0,287	0,028
Obe populacije																
Funkcionalne	0,337	0,013	0372	0,009	0,519	0,012	0,544	0,010	0,381	0,007	0.427	0,009	0,431	0,013	0,452	0,015
Mehanističke	0,492	0,020	0,440	0,015	0,186	0,014	0,151	0,012	0,373	0,012	0,306	0,013	0,303	0,017	0,293	0,024



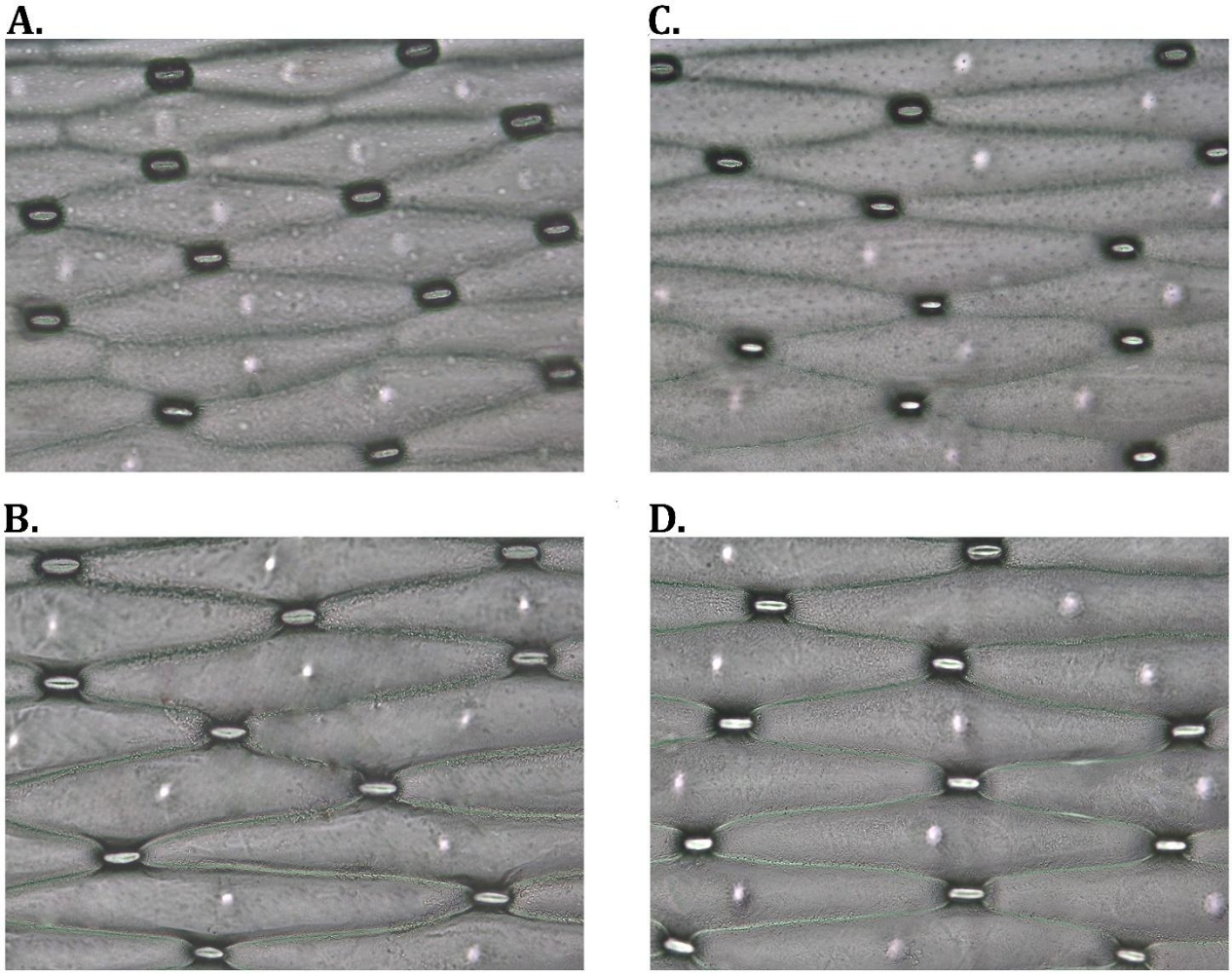
Slika 4.1.5. Variranje funkcionalnih osobina lista *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina.



Slika 4.1.6. Variranje mehanističkih osobina lista *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina.



Slika 4.1.7. Reprezentativne mikrografije otisaka epidermisa listova rameta *I. pumila*, razvijenih u dve različite temperaturne sredine *in situ*.

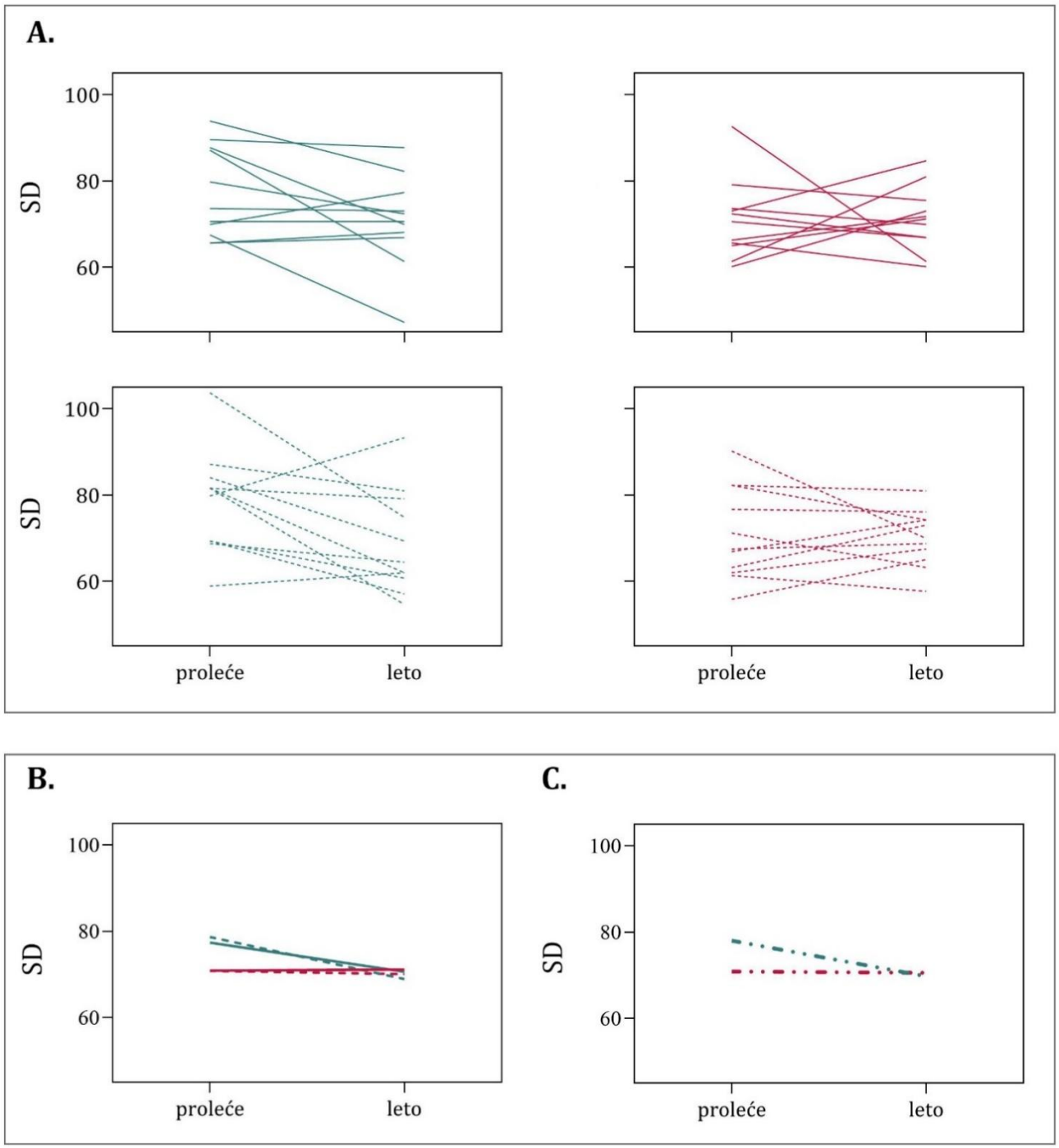
Prikazane su mikrogafije otisaka epedermisa listova rameta istog klonalnog genotipa koji su se razvijali izvan OTC-a u (**A.**) proleće i (**B.**) leto, odnosno unutar OTC-a u (**C.**) proleće i (**D.**) leto 2019. godine.

Kao što se može videti, u obe populacije u proleće, prosečne vrednosti SD su bile više kod rameta koji su se razvijali izvan OTC-a u poređenju sa rametima istog klona koji su se razvijali unutar OTC-a (Slika 4.1.8; Tabela 4.1.4). U leto je zabeležen suprotan trend – prosečne vrednosti SD bile su više kod rameta razvijenih unutar OTC-a. Nezavisno od temperaturnog tretmana, prosečne vrednosti SD opadale su od proleća ka letu (Slika 4.1.8; Tabela 4.1.4). Prosečne vrednosti SD nisu se značajno razlikovale između populacija. Međutim, individualne razlike između genotipova, izražene preko koeficijenta varijacije (CV%), bile su dosledno veće kod rameta razvijenih na ambijentalnoj nego kod rameta razvijenih na povišenoj temperaturi (Tabela 4.1.4).

Za razliku od SD, indeks stoma (SI) je pokazivao suprotan obrazac sezonskih promena između temperaturnih sredina. U proleće su, prosečne vrednosti SI bile više kod rameta razvijenih na povišenoj temperaturi (unutar OTC-a), nego kod onih razvijenih na ambijentalnoj temperaturi. U leto, prosečne vrednosti SI bile su niže kod rameta unutar OTC-a u odnosu na one izvan njih.

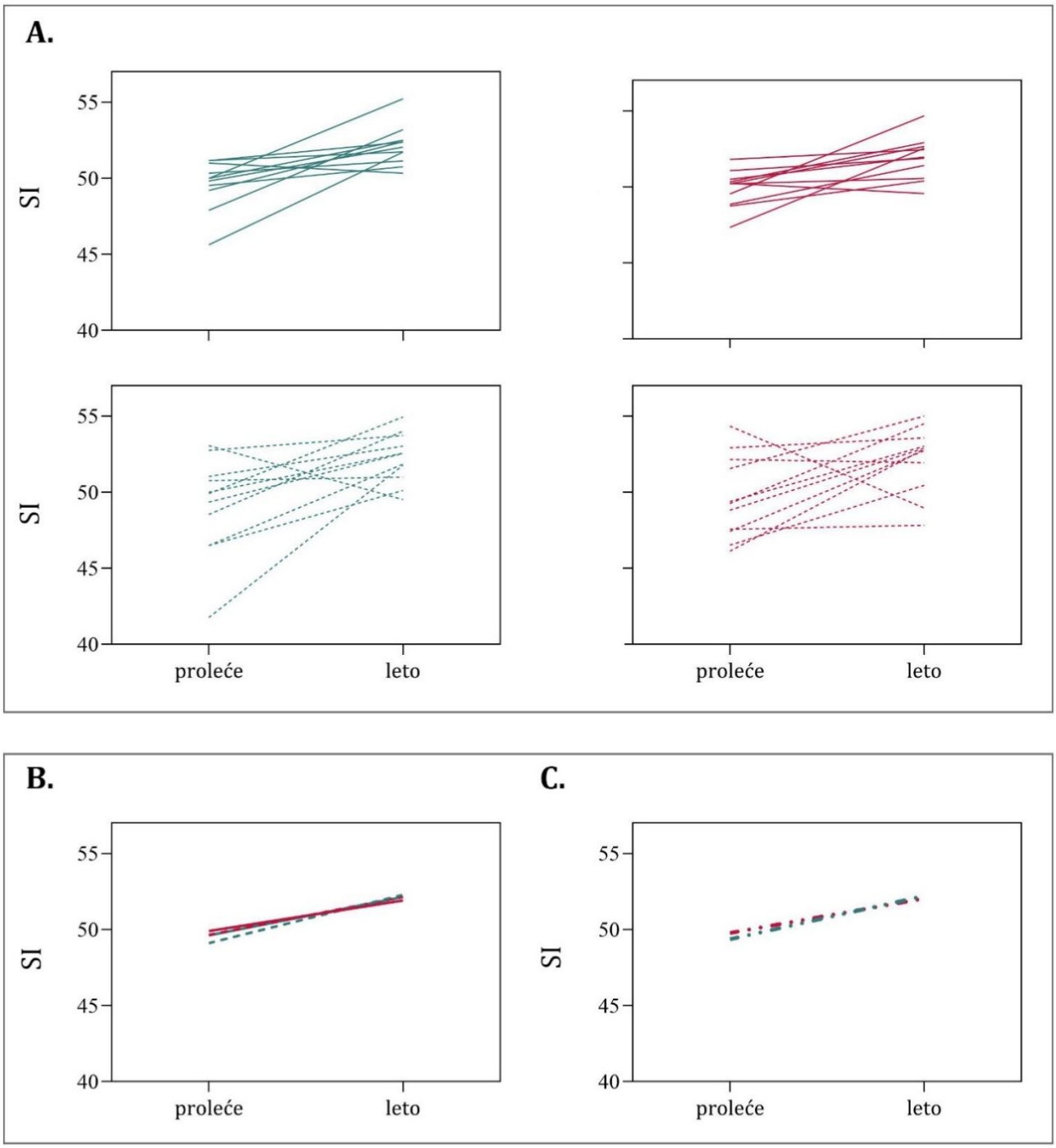
Tabela 4.1.4. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SE) i koeficijenti varijacije (CV%) morfoloških parametara stoma, SD i SI, u listovima klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 11 i Populacija 2, *n* = 11), ispoljene tokom dve sezone (proleće i leto) u drugoj godini eksperimenta (2019), izvan i unutar OTC-a. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Osobine lista	**Proleće**						**Leto**					
	Izvan OTC-a			Unutar OTC-a			Izvan OTC-a			Unutar OTC-a		
	$\bar{X}$	SE	CV%	$\bar{X}$	SE	CV%	$\bar{X}$	SE	CV%	$\bar{X}$	SE	CV%
Populacija 1												
SD	77,36	3,19	13,70	70,89	2,77	12,98	70,61	3,21	15,01	71,11	2,25	10,51
SI	49,61	0,49	3,29	49,90	0,37	2,44	52,13	0,40	2,53	51,91	0,42	2,72
Populacija 2												
SD	78,69	3,59	15,12	70,83	3,23	15,11	68,93	3,58	17,27	70,05	1,98	9,39
SI	49,10	0,98	6,60	49,64	0,82	5,52	52,27	0,50	3,17	52,15	0,67	4,25
Obe populacije												
SD	78,03	2,35	14,1	70,86	2,08	13,74	69,77	2,35	15,76	70,58	1,47	9,76
SI	49,36	0,54	5,08	49,77	0.44	4,16	52,20	0,31	2,80	52,03	0,39	3,50



Slika 4.1.8. Sezonsko variranje SD *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone (proleće i leto); (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.



Slika 4.1.9. Sezonsko variranje SI *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone (proleće i leto); (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Za razliku od SD, prosečne vrednosti SI rasle su od proleća do leta u obe temperaturne sredine (Slika 4.1.9; Tabela 4.1.4). Prosečne vrednosti SI nisu se značajno razlikovale između populacija (Tabela 4.1.5). Koeficijenti varijacije (CV%) za SI pokazali su složeniji obrazac u poređenju sa SD – u proleće su bili niži kod rameta razvijenih unutar OTC-a u odnosu na one izvan njih, dok je tokom leta uočen suprotan trend. Pored toga, vrednosti CV% za SI bile su u svim uslovima niže od onih za SD, što ukazuje na manju individualnu varijabilnost i potencijalno veću stabilnost SI u odgovoru na temperaturne promene (Tabela 4.1.4).

Na Slikama 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, prikazane su norme reakcija funkcionalnih i mehaničkih osobina lista, pojedinačnih genotipova iz obe populacije, ispoljenih izvan i unutar OTC-a, tokom dve sezone i dve godine, zatim prosečne norme reakcije za svaku populaciju, kao i prosečne norme reakcije za obe populacije. Prosečne norme reakcija bile su kose, što ukazuje na načelnu sposobnost genotipova da prilagode ekspresiju analiziranih osobina promenama u ambijentalnoj temperaturi tj. da plastično odgovore na povećanje temperature. Obrasci odgovora bili su specifični kako za genotip tako i za svaku posmatranu osobinu (Slike 4.1.1. (A.), 4.1.2. (A.), 4.1.3. (A.) i 4.1.4. (A.)). Sa izuzetkom LT, prosečne norme reakcija svih ostalih osobina lista bile su paralelene tokom celog vremenskog intervala. Prosečne norme reakcije za LT bile su paralelne između vremenskih tačaka G1S1 (proleće 2018) i G1S2 (leto 2018), a konvergirale su u vremenskoj tački G2S2 (Slika 4.1.4. (C.)).

Nivo norme reakcije, odnosno intenzitet fenotipskog odgovora, bio je specifičan za svaku analiziranu osobinu lista. Kada je reč o funkcionalnim osobinama, nivo prosečnih normi reakcija za SLA, za obe populacije, bio je viši na povišenoj temperaturi (unutar OTC-a) nego na ambijentalnoj (izvan OTC-a) (Slika 4.1.1. (C.)). Nasuprot tome, nivo prosečnih normi reakcija za LDMC, bio je viši na ambijentalnoj nego na povišenoj temperaturi (Slika 4.1.2. (C.)). Kada je reč o mehaničkim osobinama, SLWC i LT, nivoi njihovih prosečnih normi reakcija takođe su bili viši na ambijentalnoj nego na povišenoj temperaturi (Slike 4.1.3. (C.) i 4.1.4. (C.)).

Nivoi prosečnih normi reakcije za SLA i LDMC nisu se razlikovali između populacija (Slike 4.1.1. (B.) i 4.1.2. (B.)), dok su nivoi prosečnih normi reakcije za SLWC i LT bili viši kod rameta iz Populacije 1 u poređenju sa onima iz Populacije 2 (Slike 4.1.3. (B.) i 4.1.4. (B.)).

Variranje u obliku i nivou normi reakcije pokazalo se specifičnim kako u odnosu na osobinu lista tako i na vremenski interval. Tako su, na primer, prosečni nivoi normi reakcije za SLA, SLWC i LT opadali između proleća i leta prve godine (vremenske tačke G1S1 i G1S2), dok su u drugoj godini (vremenske tačke G2S1 i G2S2) rasli za SLA, a opadali za SLWC i LT. LDMC je bila jedina osobina lista za koju su uočeni rastući nivoi prosečnih normi reakcija između vremenskih tačaka G1S1 i G1S2, i blago opadajući između vremenskih tačaka G2S1 i G2S2. Zanimljivo je da se oblik prosečnih normi reakcija tokom vremena menjao: od konkavnog za SLA, preko konveksnog za LDMC, do cik-cak oblika za SLWC i LT, u obe temperaturne sredine (Slike 4.1.1. (C.), 4.1.2. (C.), 4.1.3. (C.) i 4.1.4. (C.)).

Na Slikama 4.1.5. i 4.1.6. prikazane su norme reakcije kategorija osobina (funkcionalnih i mehaničkih) pojedinačnih genotipova iz obe populacije, ispoljenih izvan i unutar OTC-a, tokom dve sezone i dve godine. Takođe su prikazane prosečne norme reakcije za svaku populaciju ponaosob, kao i prosečne norme reakcije za obe populacije objedinjeno. Prosečne norme reakcije osobina po kategorijama bile su kose što ukazuje da su one i kao katerogije plastično odgovarale na povećanje temperature (Slike 4.1.5. (C.) i 4.1.6. (C.)). Obrasci ovih odgovora bili su specifični kako za genotip, tako i za svaku posmatranu kategoriju osobina (Slike 4.1.5. (A.) i 4.1.6. (A.)). Prosečne norme reakcija obe kategorije osobina bile su paralelne tokom celog vremenskog intervala, ali su se međusobno razlikovale po nivou. Nivo prosečnih normi reakcije za kategoriju funkcionalnih osobina bio je viši na povišenoj nego na ambijentalnoj temperaturi (Slika 4.1.5. (C.)), dok je nivo prosečnih normi reakcije za kategoriju

mehaničkih osobina bio viši na ambijentalnoj u poređenju sa povišenom temperaturom (Slika 4.1.6. (C.)). Kada je reč o razlikama između populacija, nivoi prosečnih normi reakcije funkcionalnih osobina bili su niži kod rameta Populacije 1 u poređenju sa rametima Populacije 2, tokom prve godine eksperimenta, dok je tokom druge godine bio ispoljen suprotan obrazac (Slika 4.1.5. (B.)). Obrnut trend uočen je za kategoriju mehaničkih osobina: nivoi prosečnih normi reakcije bili su viši kod rameta Populacije 1 nego kod rameta Populacije 2, tokom prve godine, dok je tokom druge godine bio ispoljen suprotan obrazac (Slika 4.1.6. (B.)). Pored navedenog, uočeno je da su prosečni nivoi normi reakcije funkcionalnih i mehaničkih kategorija osobina zavisili i od vremenskog intervala. Tako su, za kategoriju funkcionalnih osobina rasli, dok su za kategoriju mehaničkih osobina opadali između proleća i leta tokom obe godine eksperimenta (Slike 4.1.5. i 4.1.2.6.). Što se oblika prosečnih normi reakcije tiče, obe kategorije osobina ispoljile su cik-cak obrazac, u obe temperaturne sredine.

Na Slikama 4.1.8. i 4.1.9. prikazan je sezonski obrazac variranja SD i SI. Za obe osobine uočen je složen obrazac normi reakcije, pri čemu su se krive pojedinih genotipova međusobno ukrštale. Ovakav obrazac ukazuje da su se u različitim sezonama menjale ne samo njihove fenotipske vrednosti, već i rangovi genotipova, što sugeriše postojanje genetičke varijabilnosti fenotipske plastičnosti osobina stominog aparata. Takođe, prosečne norme reakcije za SD i SI bile su ukrštene između temperaturnih tretmana (Slike 4.1.8. (C.) i 4.1.9. (C.)), što ukazuje da efekat temperaturnog tretmana zavisi od sezone (postoji značajna interakcija između tretmana i sezone). Obrazac sezonskog variranja ove dve osobine bio je inverzan. U proleće, prosečne norme reakcije za SD imale su više nivoe, a za SI niže, kod rameta koji su se razvijali izvan OTC-a u poređenju sa onima unutar OTC-a. Tokom leta zabeležen je obrnut obrazac: nivoi prosečnih normi reakcije za SD bili su viši, a za SI niži kod rameta izloženih povišenoj temperaturi u odnosu na one na abijentalnoj temperaturi (Slike 4.1.8. (C.) i 4.1.9. (C.)).

Rezultati analize varijanse ponovljenih merenja za SD i SI prikazani su u Tabeli 4.1.5. Može se uočiti da temperaturni tretman nije imao značajan uticaj na vrednosti SD i SI (obe $P > 0,05$). Međutim, značajan efekat interakcije sezone i tretmana za SD ($P = 0,0280$) ukazuje da se uticaj sezone na gustinu stoma razlikovao između tretmana, odnosno da prosečne krive odgovora SD nisu bile paralelene, već su pokazivale različite obrasce promene između temperaturnih tretmana. Efekat populacije nije bio značajan (obe $P > 0,05$), što znači da se populacije nisu razlikovale u vrednostima SD i SI. Nasuprot tome, rezultati ukazuju na značajan uticaj sezone na obe osobine: SD ($P = 0,0193$) i SI ($P < 0,0001$), što potvrđuje postojanje unutar-godišnje promene u vrednostima SD i SI (Tabela 4.1.5).

Tabela 4.1.5. Rezultati analize varijanse ponovljenih meranja (ANOVAR) za SD i SI. Prikazani su stepeni slobode (df), prosek kvadrata odstupanja od srednje vrednosti ispitivanih osobina (MS), *F*-vrednosti i statistička značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

A. Između subjekata	**SD**				**SI**			
Izvor variranja	df	MS	*F*	*P*	df	MS	*F*	*P*
Tretman (T)	1	222,34	1,66	0,2054	1	0,31	0,07	0,7899
Populacija (P)	1	2,89	0,02	0,8840	1	0,20	0,05	0,8314
T x P	1	0,84	0,01	0,9374	1	0,17	0,04	0,8463
Greška	40	134,16			40	4,37		
B, Unutar subjekata								
Izvor variranja	df	MS	*F*	*P*	df	MS	*F*	*P*
Sezona (S)	1	400,48	5,95	**0,0193**	1	143,41	35,74	**<,0001**
T x S	1	349,84	5,20	**0,0280**	1	1,86	0,46	0,4997
P x S	1	22,17	0,33	0,5693	1	1,81	0,45	0,5050
T x P x S	1	5,54	0,08	0,7756	1	0,03	0,01	0,9307
Greška	40	67,32			40	4,01		

4.1.3. Analiza profila odgovora funkcionalnih i mehaničkih osobina lista na povišenu temperaturu

Da bi se utvrdilo da li postoji značajna razlika između prosečnih profila odgovora biljaka koje su se razvijale pod različitim temperaturnim uslovima, primenili smo multivarijatnu analizu sa ponavljanjima (analizu profila), MANOVAR. Rezultati MANOVAR za funkcionalne i mehaničke osobine lista genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije, koji su se ravijali izvan i unutar OTC-a, tokom proleća i leta dve uzastopne godine prikazani su u Tabeli 4.1.6. Prvo je testirano da li su krive prosečnih odgovora bile paralelne. Test paralelizma procenjuje da li postoji značajna interakcija između glavnih efekata unutar subjekta (godina, sezona) i temperaturnog tretmana. Kao što se iz Tabele 4.1.6. može videti, verovatnoće *F*-vrednosti Wilksovog λ testa za procenu efekta svih interakcija nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$) što je potvrdilo nultu hipotezu da su prosečni profili odgovora SLA, LDMC, SLWC i LT biljaka koje su se razvijaleizvan i unutar OTC-a bili paralelni tokom vremena. S obzirom na to da su prosečni profili odgovora ove dve grupe bili paralelni za svaku proučavanu osobinu, testirano je da li su profili bili na jednakim nivoima (tj. da nije bilo razlike između grupa). Ova hipoteza je odbačena pošto je pokazano da je efekat tretmana za sve četiri ispitivane osobine lista bio statistički značajan (SLA, $P < 0,0001$; LDMC, $P = 0,0058$; SLWC, $P = 0,0007$; i LT, $P = 0,0002$; Tabeli 4.1.6), što ukazuje da su nivoi ove dve grupe (rameti koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a) bili značajno različiti. Rameti koji su se razvijali unutar OTC-a imali su značajno veće vrednosti SLA, a manje vrednosti LDMC, SLWC i LT u odnosu na ramete koji su se razvijali izvan OTC-a (Slike 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4; Tabela 4.1.2). Analiza efekta populacije pokazala je da su prosečni profili odgovora između populacija bili isti za funkcionalne osobine lista, SLA i LDMC (obe $P > 0,05$) a različiti za mehaničke osobine lista, SLWC ($P = 0,0063$) i LT ($P = 0,0092$) (Tabeli 4.1.6). Rezultati testiranja hipoteze o jednoličnosti uglavnom su pokazali statistički značajne verovatnoće *F*-vrednosti Wilksovog λ za efekte: sezonu i godinu. Tako su na primer, LDMC, SLWC i LT promenile svoje profile odgovora tokom sezona (sve $P < 0,0001$), a SLA i LDMC tokom godina ($P < 0,0001$ i $P < 0,0474$, redom). Međutim, određene osobine su pokazale isti prosečan odgovor na temperaturno variranje i to: funkcionalna osobina SLA tokom sezona ($P = 0,1558$), a mehaničke osobine SLWC i LT tokom godina ($P = 0,7338$ i $P = 0,9927$, redom) (Tabela 4.1.6).

Jednofaktorske ANOVA-e (*F*-testovi) za svaki od kontrasta glavnih faktora unutar subjekta, odnosno sezone i godine, pokazale su da je, kada se prosečno posmatraju oba tretmana, došlo do značajnih promena u svim analiziranim osobinama listova tokom vremena (značajan glavni efekat za sve ANOVA testove; Tabela 4.1.7). Značajan efekat tretmana ($P = 0,0169$) dobijen je isključivo za LT u drugoj godini, što ukazuje da se prosečni profil odgovora između dve grupe razlikovao jedino u drugoj godini ponovljenih merenja (Tabela 4.1.7).

Rezultati MANOVAR za kategorije funkcionalnih i mehaničkih osobina lista genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije, koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a, tokom proleća i leta dve uzastopne godine prikazani su u Tabeli 4.1.8. Jasno se može uočiti da verovatnoće *F*-vrednosti Wilksovog λ testa za procenu efekta svih interakcija (test paralelizma) nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$), što podržava nultu hipotezu da su prosečni profili odgovora kategorija funkcionalnih i mehaničkih osobina rameta koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a bili paralelni tokom vremena. Pošto je hipoteza paralelizma prihvaćena, testirano je da li su profili bili na jednakim nivoima. Ova hipoteza je odbačena pošto je pokazano da je efekat tretmana za obe kategorije osobine lista bio statistički značajan (funkcionalne, $P = 0,0032$; mehaničke, $P = 0,0071$; Tabela 4.1.8). Dobijeni rezultati ukazuju da su nivoi dve grupe (rameta koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a) bili značajno različiti. Rameti unutar OTC-a imali su značajno više vrednosti funkcionalnih, a niže vrednosti mehaničkih osobina u poređenju sa rametima izvan OTC-a (Slike 4.1.5. i 4.1.6; Tabela 4.1.8). Analiza efekta populacije

pokazala je da su prosečni profili odgovora između populacija bili značajno različiti za kategoriju funkcionalnih osobina lista (P = 0,0376) dok su za kategoriju mehaničkih osobina bili marginalno značajni (P = 0,0613) (Tabela 4.1.8). Rezultati testiranja hipoteze o jednoličnosti uglavnom su pokazali statistički značajne efekte sezone i godine. Na primer, prosečni profili odgovora kategorije funkcionalnih osobina razlikovali su se između sezona (P < 0,0001) i godina (P = 0,0009), dok su se prosečni profili odgovora kategorije mehaničkih osobina razlikovali samo između sezona (P < 0,0001) (Tabela 4.1.8).

Rezultati jednofaktorskih ANOVA za svaki od kontrasta glavnih intra-subjektnih faktora (sezona i godina) pokazali su da su, posmatrano prosečno za oba tretmana, u obe kategorije osobina zabeležene značajne promene tokom vremena (Tabela 4.1.9). Nasuprot tome, efekat tretmana nije bio statistički značajan ni za jednu kategoriju, što ukazuje da su prosečni profili odgovora obe kategorije osobina, ostali paralelni tokom obe godine.

Tabela 4.1.6. Rezultati multivarijatne analize sa ponavljanjima (analiza profila) anatomsko-morfoloških osobina lista. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks- ovog λ testa uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

A. Između subjekata	**SLA**			**LDMC**			**SLWC**			**LT**		
Izvor variranja	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Populacija (P)	1	3,73	0,0569	1	0,00	0,9539	1	7,84	**0,0063**	1	7,10	**0,0092**
Tretman (T)	1	32,70	**0,0001**	1	8,02	**0,0058**	1	12,42	**0,0007**	1	15,44	**0,0002**
P x T	1	0,78	0,3786	1	0,08	0,7819	1	0,33	0,5680	1	0,15	0,6966
Greška	86			86			86			86		

B. Unutar subjekata																
Izvor variranja	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*
Godina (G)	0,6749	41,43	1/86	**0,0001**	0,9550	4,05	1/86	**0,0474**	0,9999	0,00	1/86	0,9927	0,9986	0,12	1/86	0,7338
Sezona (S)	0,9761	2,05	1/86	0,1558	0,1180	643,01	1/86	**0,0001**	0,1543	471,19	1/86	**0,0001**	0,2034	336,86	1/86	**0,0001**
G x S	0,2075	328,41	1/86	**0,0001**	0,0609	1326,2	1/86	**0,0001**	0,2506	257,17	1/86	**0,0001**	0,3792	140,88	1/86	**0,0001**
P x G	0,9236	7,12	1/86	**0,0091**	0,7980	21,77	1/86	**0,0001**	0,6906	38,52	1/86	**0,0001**	0,6831	39,90	1/86	**0,0001**
P x S	0,9546	4,09	1/86	**0,0462**	0,8939	10,21	1/86	**0,0020**	0,9996	0,04	1/86	0,8516	0,9996	0,04	1/86	0,8508
P x G x S	0,9919	0,70	1/86	0,4046	0,9597	3,61	1/86	0,0607	0,9562	3,94	1/86	0,0504	0,9507	4,46	1/86	**0,0377**
T x G	0,9843	1,38	1/86	0,2442	0,9726	2,42	1/86	0,1234	0,9903	0,85	1/86	0,3603	0,9910	0,78	1/86	0,3785
T x S	0,9900	0,87	1/86	0,3538	0,9972	0,24	1/86	0,6266	0,9812	1,64	1/86	0,2031	0,9585	3,73	1/86	0,0569
T x G x S	0,9999	0,01	1/86	0,9290	0,9860	1,22	1/86	0,2724	0,9947	0,46	1/86	0,5002	0,9710	2,57	1/86	0,1124

Tabela 4.1.7. Analiza varijanse na svakom od kontrasta faktora unutar-subjekata (sezone) anatomsko-morfoloških osobina lista SLA, LDMC, SLWC i LT. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks-ovog λ testa uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Izvor variranja	**SLA**			**LDMC**			**SLWC**			**LT**		
	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Godina 1						*Kontrast: proleće - leto*						
Srednja vrednost	1	162,03	**<,0001**	1	2509,31	**<,0001**	1	718,92	**<,0001**	1	448,63	**<,0001**
Tretman	1	0,70	0,4054	1	0,27	0,6045	1	0,13	0,7195	1	0,08	0,7784
Greška	88			88			88			88		
Godina 2						*Kontrast: proleće - leto*						
Srednja vrednost	1	100,70	**<,0001**	1	26,17	**<,0001**	1	234,75	**<,0001**	1	27,43	**<,0001**
Tretmant	1	0,13	0,7180	1	0,99	0,3225	1	2,04	0,1569	1	5,93	**0,0169**
Greška	88			88			88			88		

Tabela 4.1.8. Rezultati multivarijatne analize sa ponavljanjima (analiza profila) funkcionalnih i mehansitičkih kategorija osobina lista. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks-ovog λ testa uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*).

A. Između subjekata		**Funkcionalne osobine**				**Mehanističke osobine**		
Izvor variranja		df	*F*	*P*		df	*F*	*P*
Populacija (P)		1	4,46	**0,0376**		1	3,60	0,0613
Tretman (T)		1	9,22	**0,0032**		1	7,60	**0,0071**
P x T		1	0,11	0,7444		1	0,00	0,9833
Greška		86				86		
B. Unutar subjekata								
Izvor variranja	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*
Godina (G)	0,8793	11,8	1/86	**0,0009**	0,9977	0,19	1/86	0,6600
Sezona (S)	0,2365	277,63	1/86	**<,0001**	0,2210	303,13	1/86	**<,0001**
G x S	0,4499	105,14	1/86	**<,0001**	0,3486	160,68	1/86	**<,0001**
P x G	0,7944	22,26	1/86	**<,0001**	0,8169	19,27	1/86	**<,0001**
P x S	0,9997	0,02	1/86	0,8789	0,9997	0,02	1/86	0,8750
P x G x S	0,9886	0,99	1/86	0,3219	0,9563	3,93	1/86	0,0506
T x G	0,9987	0,11	1/86	0,7381	0,9998	0,02	1/86	0,8872
T x S	0,9764	2,08	1/86	0,1531	0,9582	3,75	1/86	0,0526
T x G x S	0,9952	0,41	1/86	0,5212	0,9877	1,07	1/86	0,3038

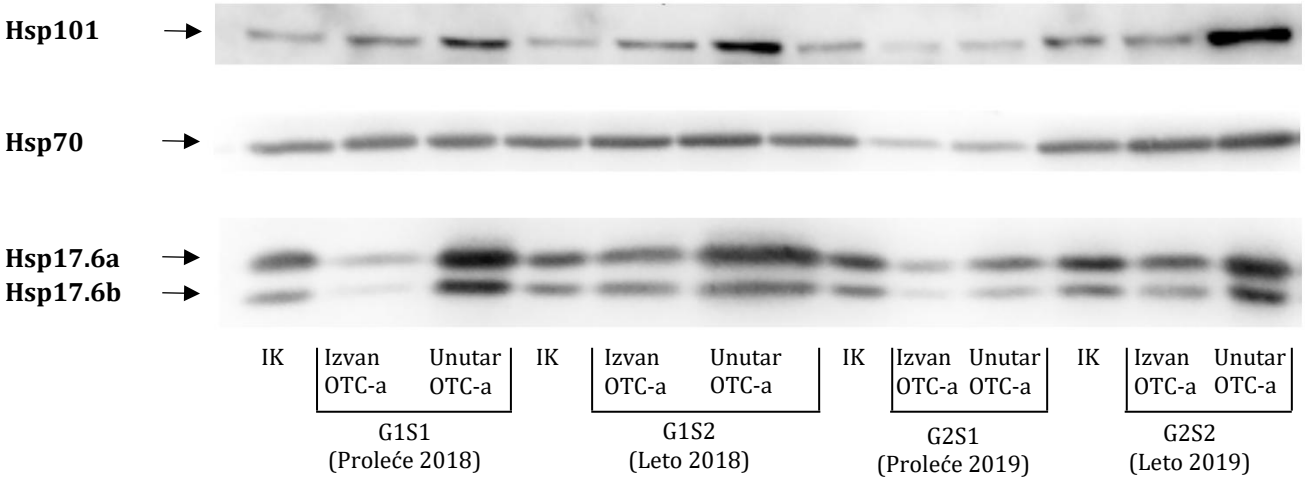
Tabela 4.1.9. Analiza varijanse na svakom od odabranih kontrasta faktora unutar-subjekata (sezona i godina) funkcionalnih i mehaničkih kategorije osobina lista. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks-ovog λ testa uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*).

Izvor variranja	**Funkcionalne osobine**			**Mehaničke osobine**		
	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Godina 1			*Kontrast: proleće - leto*			
Srednja vrednost	1	391,98	**<,0001**	1	524,42	**<,0001**
Tretman	1	0,30	0,5827	1	0,42	0,5169
Greška	88			88		
Godina 2			*Kontrast: proleće - leto*			
Srednja vrednost	1	15,40	**0,0002**	1	7,54	**0,0073**
Tretman	1	1,81	0,1816	1	3,72	0,0571
Greška	88			88		

4.1.4. Fenotipski odgovori količine proteina toplotnog stresa u različitim temperaturnim sredinama

Radi procene uticaja povećanja temperature na akumulaciju proteina toplotnog stresa (Hsp101, Hsp70 i Hsp17.6), analizirani su ukupni ćelijski ekstrakti listova, metodom semikvantitativnog Western blota. Uzorkovanje listova istih klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije, koje su se razvijale izvan i unutar OTC-a, izvršeno je jednom u svakoj sezoni (proleće i leto) tokom dve uzastopne godine (2018. i 2019.). Na Slici 4.1.10. prikazani su reprezentativni rezultati W*estern blot* analize Hsp. U listovima rameta iz obe populacije u obe temperaturne sredine, tokom celog eksperimentalnog perioda detektovana je po jedna imunospecifična traka za Hsp101 i Hsp70, i dve trake različitih molekulskih masa za Hsp17.6 (Slika 4.1.10). Dve detektovane izoforme Hsp17.6, čije su molekulske mase iznosile 16.4 kDa i 14.1 kDa, u ovim istraživanjima označene su kao Hsp17.6a i Hsp17.6b, redom.

Prosečne vrednosti ($\bar{X}$) i odgovarajuće standardne greške (SE) za relativnu količinu proteina



Slika 4.1.10. Relativna količina proteina toplotnog stresa u listovima *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve sezone i dve uzastopne godine.

Prikazane su imunospecifične trake Hsp101, Hsp70 i Hsp17.6 u listovima *I. pumila* razvijenih izvan i unutar OTC-a, tokom proleća i leta2018. i 2019. godine. Za Hsp101 i Hsp70 detektovana je po jedna traka, dok su za Hsp17.6 detektovane dve izoforme, Hsp17.6a i Hsp17.6b. IK – interna kontrola; G – godina; S – sezona.

toplotnog stresa (Hsp101, Hsp70, Hsp17.6a i Hsp17.6b) u listovima *I. pumila* prikazane su u Tabeli 4.1.10. Tokom celog ekperimentalnog perioda, u obe populacije, zabeležene su više prosečne količine svih ispitivanih Hsp u rametima koji su se razvijali unutar OTC-a u odnosu na ramete koji su se razvijali izvan OTC-a (do 77 % za Hsp101, 18 % za Hsp70, 57 % za Hsp17.6a i 81 % za Hsp17.6b). Pored toga, relativna količina svih Hsp u obe godine bila je viša tokom leta u poređenju sa prolećem, nezavisno od temperaturnih uslova pod kojima su se biljke razvijale. Takođe, prosečne vrednosti svih analiziranih Hsp bile su više u rametima Populacije 1 nego u rametima Populacije 2 (Tabeli 4.1.10).

Tabela 4.1.10. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SE) relativnih količina proteina toplotnog stresa u listovima klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 15 i Populacija 2, *n* = 15) ispoljene tokom dve sezone (proleće i leto) i dve uzastopne godine (2018. i 2019), izvan i unutar OTC-a. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Proteini toplotnog stresa	Godina 1								Godina 2							
	Proleće				Leto				Proleće				Leto			
	Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a	
	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE
Populacija																
Hsp101	1,63	0,38	2,51	0,52	1,69	0,23	2,28	0,17	0,51	0,13	0,61	0,17	1,15	0,21	1,86	0,33
Hsp70	0,87	0,09	1,01	0,08	1,19	0,05	1,27	0,05	0,66	0,07	0,64	0,10	1,13	0,10	1,28	0,08
Hsp17.6a	0,43	0,09	0,70	0,15	1,65	0,22	2,16	0,26	0,18	0,07	0,11	0,03	1,40	0,20	1,93	0,24
Hsp17.6b	0,59	0,16	1,11	0,23	1,34	0,17	1,51	0,12	0,20	0,07	0,24	0,09	2,23	0,32	2,80	0,31
Populacija 2																
Hsp101	0,35	0,09	0,44	0,12	1,59	0,29	1,82	0,37	0,30	0,14	0,16	0,09	1,02	0,18	1,97	0,49
Hsp70	0,81	0,08	0,82	0,09	0,96	0,07	1,00	0,08	0,42	0,08	0,39	0,08	1,13	0,08	1,38	0,14
Hsp17.6a	0,13	0,05	0,18	0,05	0,94	0,12	1,33	0,15	0,12	0,03	0,08	0,02	1,33	0,21	2,08	0,26
Hsp17.6b	0,12	0,05	0,18	0,07	0,54	0,11	0,74	0,12	0,13	0,05	0,15	0,09	1,66	0,29	2,67	0,35
Obe populacije																
Hsp101	0,99	0,22	1,47	0,33	1,64	0,18	2,05	0,21	0,41	0,10	0,39	0,10	1,08	0,14	1,91	0,29
Hsp70	0,84	0,06	0,92	0,06	1,08	0,05	1,14	0,05	0,54	0,06	0,52	0,07	1,13	0,07	1,33	0,08
Hsp17.6a	0,28	0,06	0,44	0,09	1,30	0,14	1,74	0,16	0,15	0,04	0,09	0,02	1,37	0,14	2,00	0,18
Hsp17.6b	0,36	0,10	0,65	0,15	0,94	0,12	1,12	0,11	0,17	0,04	0,20	0,06	1,95	0,22	2,74	0,23

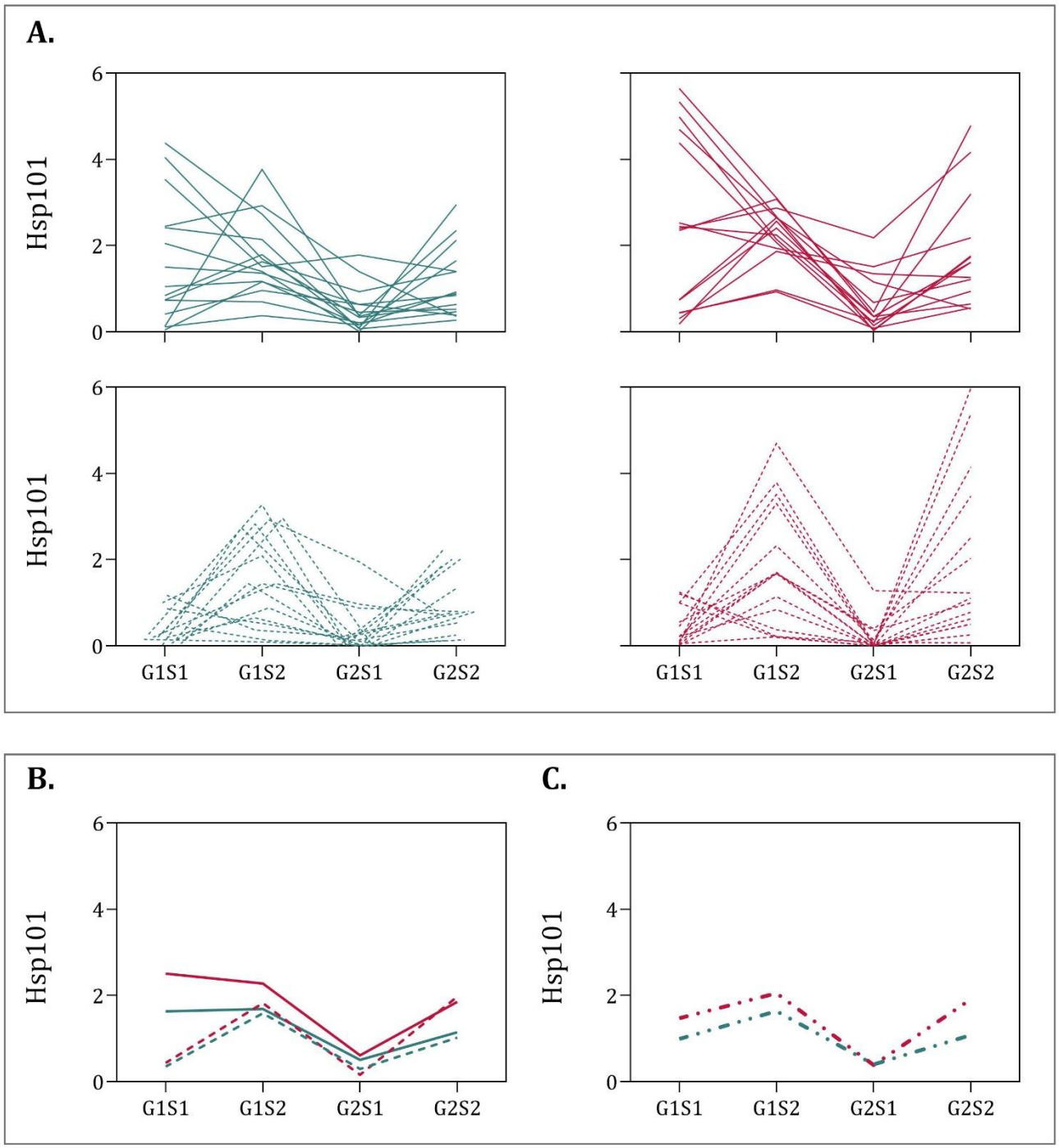
Na Slikama 4.1.11, 4.1.12, 4.1.13. i 4.1.14. prikazane su norme reakcije relativnih količina Hsp pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz obe populacije, koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a tokom dve sezone i dve godine, kao i prosečne norme reakcije za svaku populaciju ponaosob i za obe populacije zajedno. Prosečne norme reakcije bile su kose, što ukazuje na načelnu sposobnost genotipova da plastično odgovore na promenu temperature prilagođavanjem nivoa Hsp. Obrazac variranja bio je specifičan za genotip i svaki od ispitivanih Hsp (Slike 4.1.11. (A.), 4.1.12. (A.), 4.1.13. (A.) i 4.1.14. (A.)). Prosečne norme reakcije za Hsp101 i Hsp70 bile su paralelene između temperaturnih tretmana tokomobe eksperimentalne godine. Suprotno tome, prosečne norme reakcije obe izoforme Hp17.6 bile su paralene između proleća i leta 2018. godine (tj. vremenskih tačaka G1S1 i G1S2), konvergirale su u tački G2S1 (proleće 2019), a divergirale u tački G2S2 (leto 2019) (Slike 4.1.11. (C.), 4.1.12. (C.), 4.1.13. (C.) i 4.1.14. (C.)).

Nivoi normi reakcije bili su specifični za svaki analizirani Hsp i populaciju. Za sve Hsp vrednosti su bile više kod rameta koji su se razvijali unutar nego izvan OTC-ova U poređenju populacija, rameti Populacije 1 pokazali su više nivoe prosečnih normi reakcije u odnosu na ramete Populacije 2 (Slike 4.1.11. (B.), 4.1.12. (B.), 4.1.13. (B.) i 4.1.14. (B.)); Tabela 4.1.10).

Oblik normi reakcije varirao je kroz vreme. Nivoi prosečnih normi svih Hsp rasli su između proleća i leta u obe godine, dok je njihov oblik imao cik-cak obrazac u obe temperaturne sredine (Slike 4.1.11. (C.), 4.1.12. (C.), 4.1.13. (C.) i 4.1.14. (C.)).

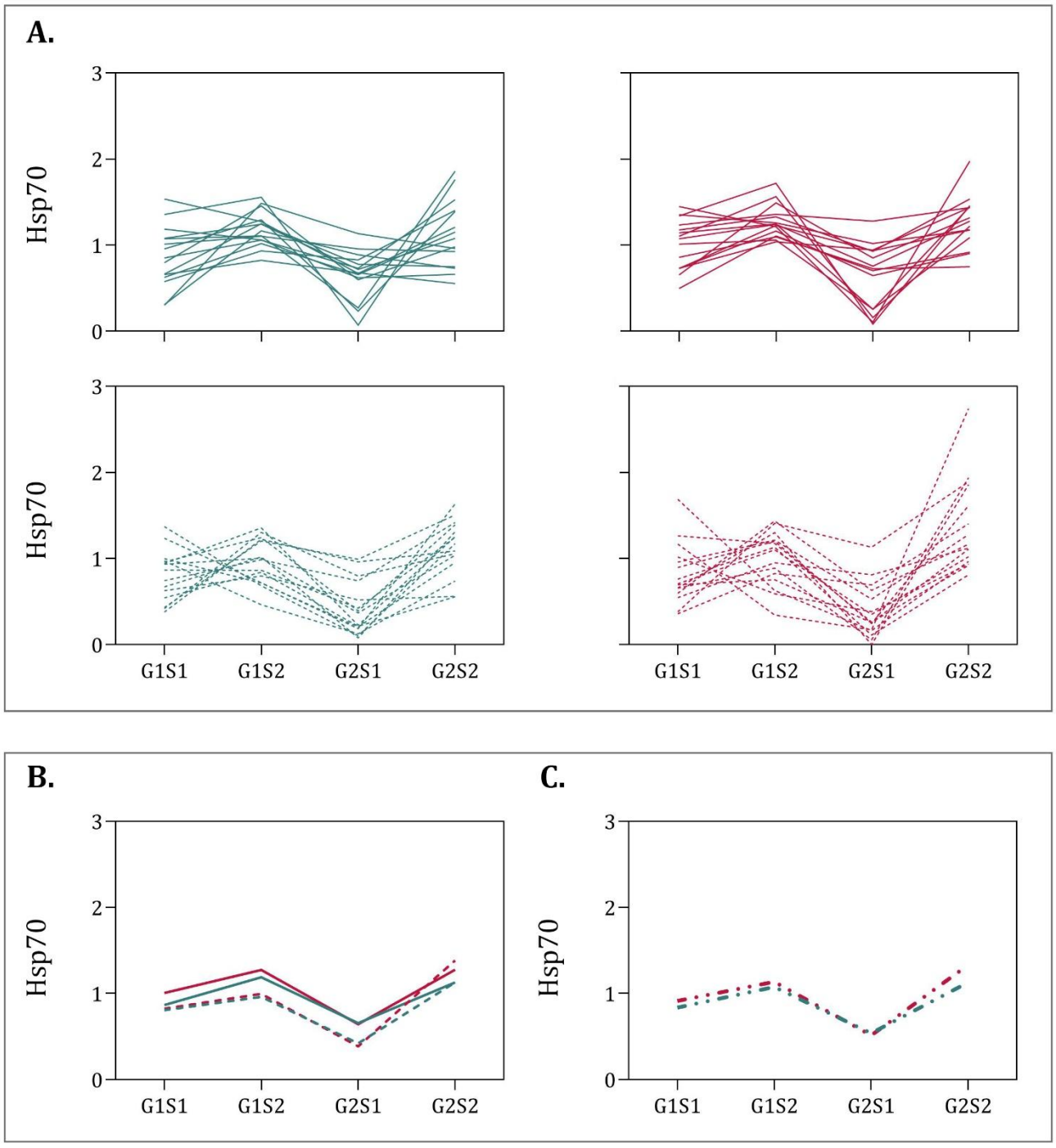
Procentualna zastupljenost relativne količine pojedinačnih izoformi Hsp17.6 u rametima genotipova *I. pumila* iz obe populacije, koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a, tokom proleća i leta dve uzastopne godine prikazana je na Slici 4.1.15. Procentualni udeo relativne količine obe izoforme bio je sličan između rameta koji su se razvijali na izvan I unutar OTC-a. Tokom celog ekeprimentalnog perioda, u oba temperaturna tretmana, udeo izoforme Hsp17.6b bio je veći od udela izoforme Hsp17.6a, osim u leto 2018. godine, kada je uočen inverzan trend, tj. veći udeo Hsp17.6a.

Procentualna zastupljenost relativne količine Hsp101, Hsp70 i Hsp17.6 prikazana je na Slici 4.1.16. Procentualni udeo relativne količine ovih proteina bio je sličan između rameta koji su se razvijali na ambijentalnoj i povišenoj temperaturi. Nezavisno od temperaturnog tretmana, tokom proleća obe godine Hsp70 je bio najzastupljeniji protein toplotnog stresa. Tokom leta, u oba temperaturna tretmana, udeo Hsp70 se smanjivao, dok su se udeli Hsp17.6 i Hsp101 povećavali, pri čemu je Hsp17.6 postajao dominantni protein. Ovi obrasci ukazuju na izraženu sezonsku promenu u relativnoj količini Hsp.



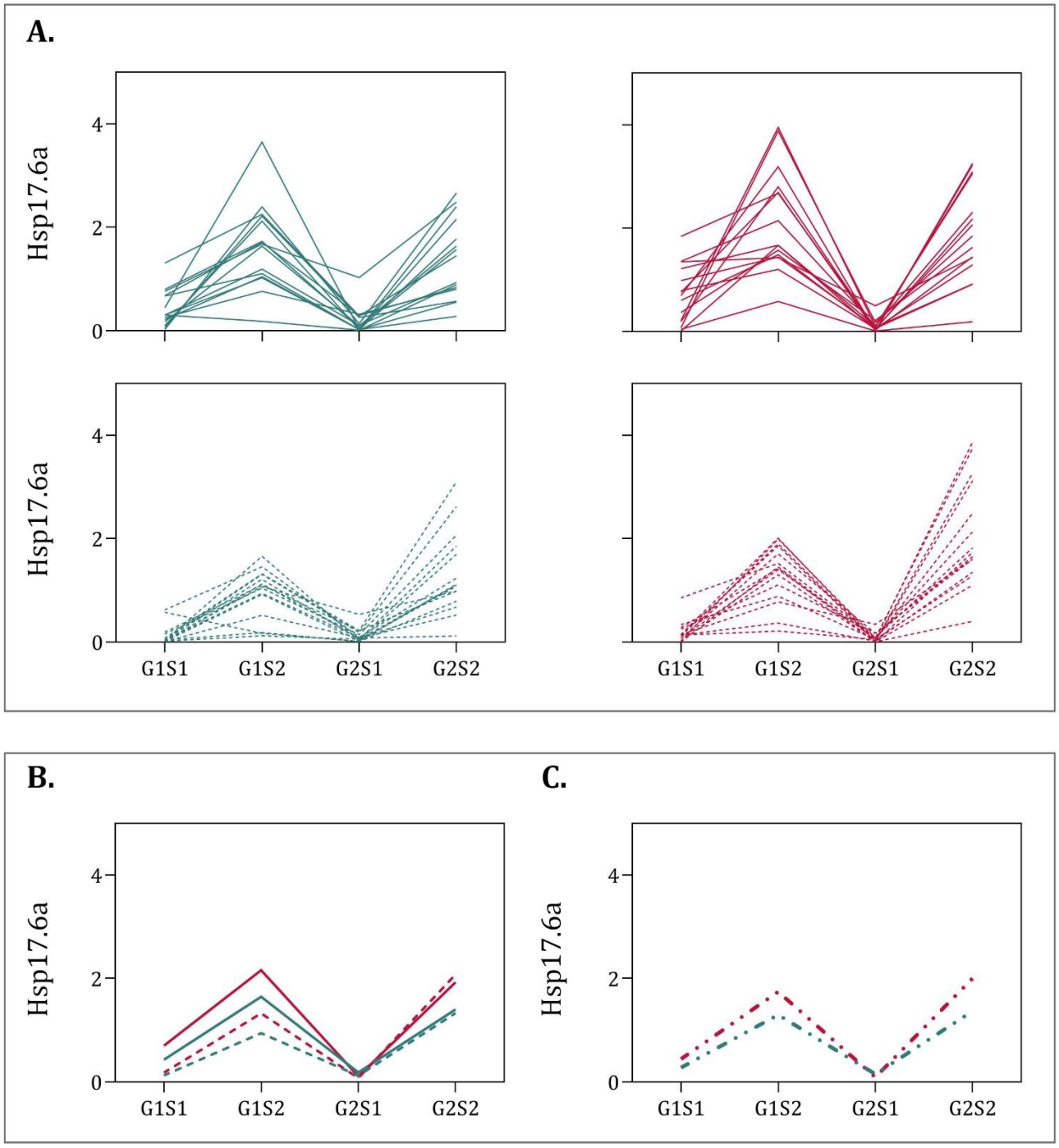
Slika 4.1.11. Sezonsko variranje relativne količine Hsp101 u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina Hsp101 izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



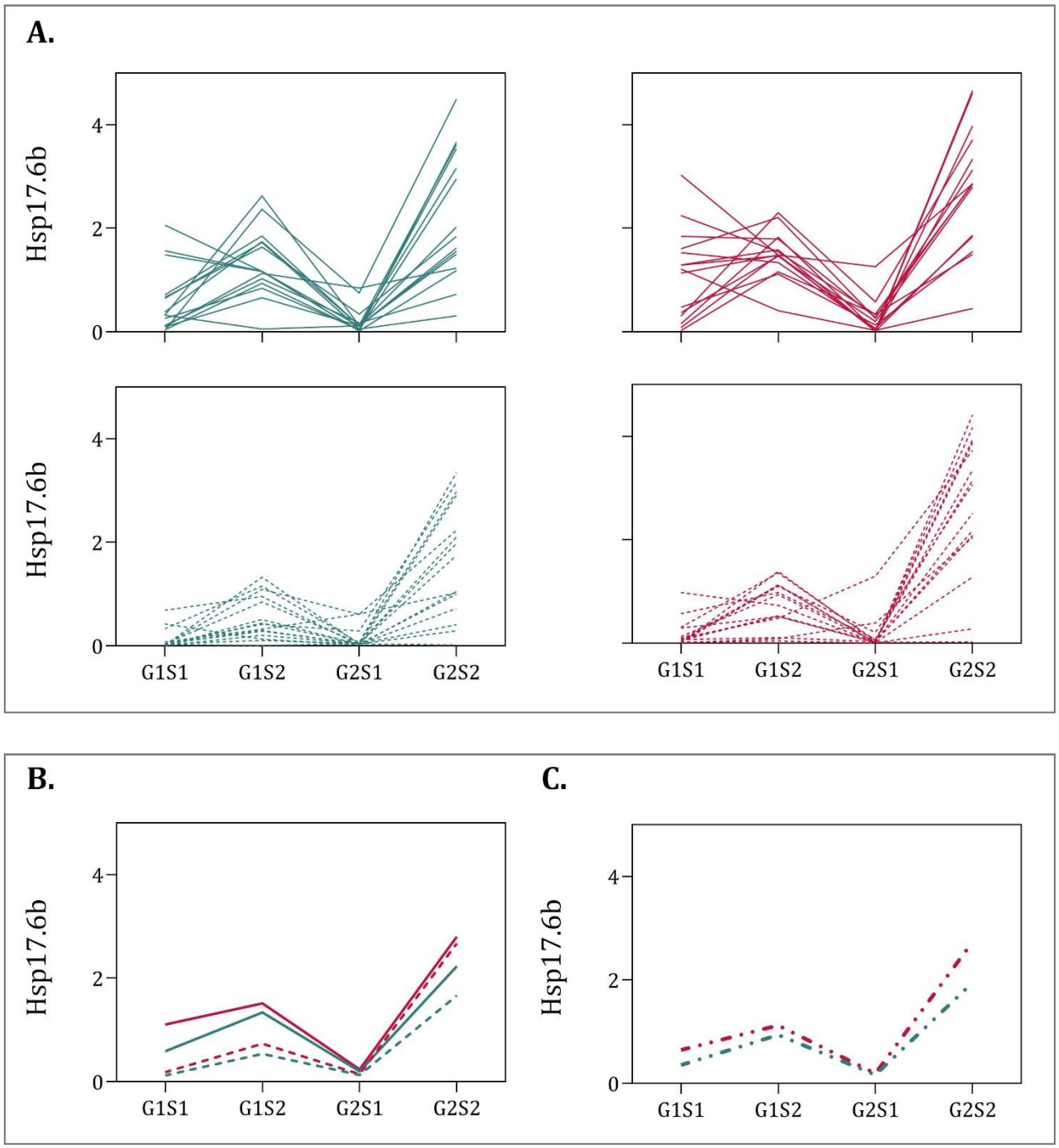
Slika 4.1.12. Sezonsko variranje relativne količine Hsp70 u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina Hsp70 izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



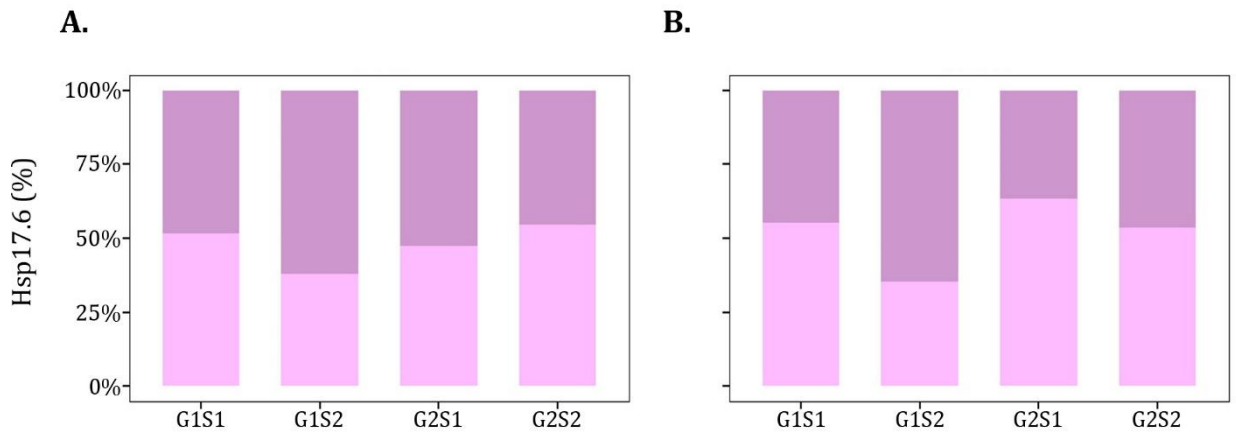
Slika 4.1.13. Sezonsko variranje relativne količine izoforme Hsp17.6a u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina Hsp17.6a izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



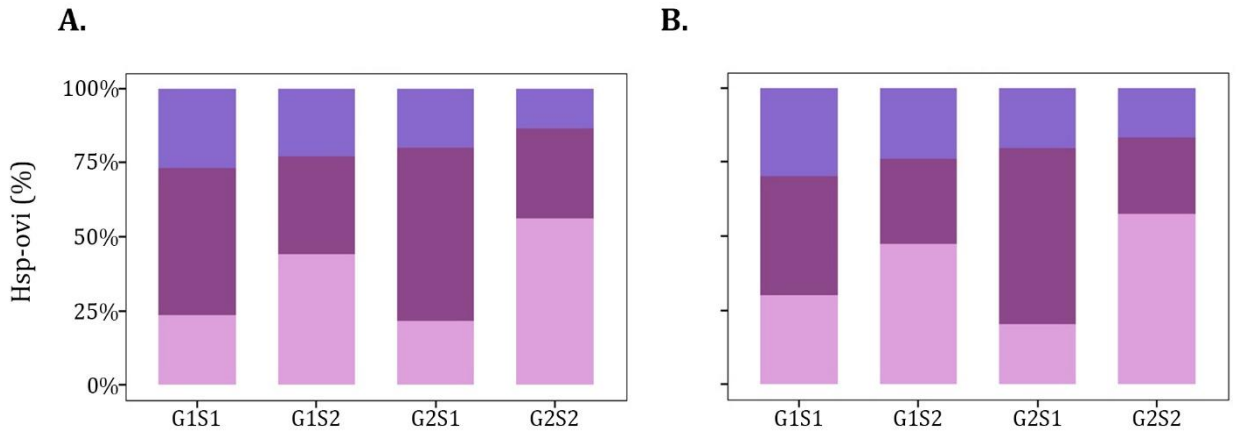
Slika 4.1.14. Sezonsko variranje relativne količine izoforme Hsp17.6b u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina Hsp17.6b izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



Slika 4.1.15. Procentualni udeo izoformi Hsp17.6 u ukupnoj relativnoj količini Hsp17.6 u listovima *I. pumila*.

Prikazani su procentualni udeli izoformi Hsp17.6a i Hsp17.6b u ukupnoj relativnoj količini Hsp17.6 u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine: (**A.**) izvan OTC-a i (**B.**) unutar OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine. Hsp17.6a Hsp17.6b. G – godina; S – sezona.



Slika 4.1.4.7. Procentualni udeo Hsp101, Hsp70 i Hsp17.6 u ukupnoj relativnoj količini proteina toplotnog stresa u listovima *I. pumila*.

Prikazani su procentualni udeli Hsp101, Hsp70 i Hsp17.6 u ukupnoj relativnoj količini Hsp u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine: (**A.**) izvan OTC-a i (**B.**) unutar OTC-a , tokom dve sezone i dve uzastopne godine. Hsp101 Hsp70 Hsp17.6. G – godina; S – sezona.

4.1.5. Analiza profila odgovora proteina toplotnog stresa na povišenu temperaturu

Rezultati MANOVAR za količinu proteina toplotnog stresa genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a tokom proleća i leta dve uzastopne godine prikazani su u Tabeli 4.1.11. Testovi paralelizma nisu pokazali statistički značajne efekte interakcija za Hsp101 i Hsp70 ($P > 0,05$), što potvrđuje nultu hipotezu da su oblici prosečnih krivih odgovora za Hsp101 i Hsp70 bili paralelni između tretmana tokom celog posmatranog vremenskog intervala. Nasuprot tome, značajne interakcije efekta tretmana i unutar-subjekta uočene su za obe izoforme Hap17.6: Hsp17.6a (T x S, $P = 0,0119$) i Hsp17.6b (T x G x S, $P = 0,0121$), što ukazuje na to da prosečni oblici krivih odgovora između tretmana nisu bili paralelni (Tabela 4.1.11). Zbog toga nije bilo neophodno sprovesti preostala dva testa za izoforme Hsp17.6. Za Hsp101 i Hsp70 dodatno je ispitano da li su profili odgovora bili na istom

nivou. Efekat tretmana bio je značajan i za Hsp101 (P = 0,0109) i za Hsp70 (P = 0,0433), što ukazuje da su se prosečne vrednosti ovih proteina razlikovale između temperaturnih sredina. Tokom čitavog perioda istraživanja, rameti koji su se razvijali unutar OTC-a generalno su imali veću količinu Hsp101 i Hsp70 u odnosu na ramete koji su se razvijali izvan OTC-a. Analiza efekata populacije pokazala je da su se prosečni profili odgovora razlikovali između populacija za sve ispitivane Hsp (Hsp101, P = 0,0008; Hsp70, P = 0,0005; Hsp17.6a, P = 0,0021; Hsp17,6b, P < 0,0001). Testiranja hipoteze o jednoličnosti ukazalo je na statistički značajne F-vrednosti Wilksovog λ testa za glavne efekte sezone i godine. Profili odgovora Hsp101 i Hsp70 menjali su se tokom sezona (obe P < 0,0001) i godina (Hsp101, P < 0,0001; Hsp70, P = 0,0063) (Tabela 4.1.11).

Jednofaktorske ANOVA-e za svaki od kontrasta glavnih faktora unutar subjekta, odnosno sezone i godine, pokazale su da je, kada se prosečno posmatraju oba tretmana, došlo do značajnih promena u količini Hsp101 i Hsp70 tokom vremena (Tabela 4.1.12). Značajan efekat tretmana (P = 0,0190) dobijen je isključivo za Hsp101, što ukazuje da se prosečni profil odgovora između dve grupe razlikovao jedino u drugoj godini ponovljenih merenja (Tabela 4.1.12). Pošto je za obe izofome Hsp17.6 odbačena hipoteza paralelizma usled utvrđene značajne interakcije između efekata unutar subjekata (sezona i godina) i tretmana, nije bilo moguće primeniti testove nivoa i jednoličnosti koji pretpostavljaju paralelne profile odgovora. Stoga su sprovedene dodatne analize unapred definisanih kontrasta: između subjekata (razlike između tretmana u svakoj vremenskoj tački) i unutar subjekata (razlike između sezona unutar svakog temperaturnog tretmana), kako bi se pojedinačno ispitali efekati i izbegla njihova interakcija. Rezultati kontrasta između subjekata pokazali su da je efekat tretmana za Hsp17.6a bio statistički značajan tokom leta (2018. godina, P = 0,0413, 2019. godina, P = 0,0067), dok je za Hsp17.6b značajna razlika između tretmana utvrđena isključivo u leto 2019. godine (P = 0,0155) (Tabela 4.1.13). Ovi rezultati ukazuju da je razlika u količini izoformi Hsp17.6 između temperaturnih tretmana bila izraženija tokom stresnijeg perioda godine- leta. Rezultati kontrasta unutar subjekata pokazali su da su prosečne vrednosti obe izoforme značajano varirale između sezona u oba temperaturna tretmana (Tabela 4.1.14). Ekspresija obe izoforme Hsp17.6 povećavala se od proleća ka letu (negativne Est. vrednosti), i to u oba tretmana i obe godine istraživanja. Za Hsp17.6a, sve razlike bile su visoko značajne (P < 0,0001), pri čemu su procenjene sezonske razlike (Est. vrednosti) iznosile od -1,0 do -1,2 izvan OTC-a, i od -1,3 do -1,9 unutar OTC-a, u zavisnosti od godine. Za Hsp17.6b, sezonske promene su tokom prve godine bile manje izražene (Est. = -0,48, P = 0,0040 i Est. = -0,59, P = 0,0184, za ambijentalnu i povišenu temperaturu, redom), dok su u drugoj godini bile znatno izraženije (Est. = -1,78 i Est. = -2,54; obe P < 0,0001, na ambijentalnoj i povišenoj temperaturi, redom) (Tabela 4.1.14). Najveći sezonski porast količine Hsp17.6 zabeležen je za izoformu Hsp17.6b unutar OTC-a u 2019. godini (Est. = -2,54; P < 0,0001).

Tabela 4.1.11. Rezultati multivarijatne analize sa ponavljanjima (analiza profila) relativnih količina proteina toplotnog stresa. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks-ovog λ testa uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

A. Između subjekata	**Hsp101**			**Hsp70**			**Hsp17.6a**			**Hsp17.6b**		
Izvor variranja	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Populacija (P)	1	12,48	**0,0008**	1	13,64	**0,0005**	1	10,39	**0,0021**	1	21,81	**<,0001**
Tretman (T)	1	6,94	**0,0109**	1	4,28	**0,0433**	1	10,43	**0,0021**	1	10,00	**0,0025**
P x T	1	0,77	0,3827	1	0,08	0,7796	1	0,01	0,9045	1	0,00	0,9830
Greška	56			56			56			56		

B. Unutar subjekata																
Izvor variranja	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*
Godina (G)	0,7141	22,43	1/56	**<,0001**	0,8742	8,06	1/56	**0,0063**	0,9941	0,33	1/56	0,5652	0,6591	28,96	1/56	**<,0001**
Sezona (S)	0,5625	43,56	1/56	**<,0001**	0,2636	156,48	1/56	**<,0001**	0,2112	209,17	1/56	**<,0001**	0,2411	176,28	1/56	**<,0001**
G x S	0,9467	3,16	1/56	0,0811	0,7370	19,99	1/56	**<,0001**	0,8383	10,80	1/56	**0,0018**	0,3718	94,61	1/56	**<,0001**
P x G	0,8415	10,55	1/56	**0,0020**	0,9769	1,32	1/56	0,2546	0,7230	21,46	1/56	**<,0001**	0,8712	8,28	1/56	**0,0057**
P x S	0,8358	11,00	1/56	**0,0016**	0,9779	1,27	1/56	0,2651	0,9909	0,51	1/56	0,4774	0,9862	0,78	1/56	0,3801
P x G x S	0,9371	3,76	1/56	0,0575	0,9307	4,17	1/56	**0,0458**	0,9445	3,29	1/56	0,0751	0,9952	0,27	1/56	0,6051
T x G	0,9996	0,02	1/56	0,8750	0,9990	0,06	1/56	0,8137	0,9996	0,02	1/56	0,8829	0,9846	0,87	1/56	0,3541
T x S	0,9612	2,26	1/56	0,1384	0,9670	1,91	1/56	0,1720	0,8923	6,76	1/56	**0,0119**	0,9555	2,61	1/56	0,1121
T x G x S	0,9533	2,74	1/56	0,1032	0,9767	1,33	1/56	0,2530	0,9518	2,84	1/56	0,0976	0,8927	6,73	1/56	**0,0121**

Tabela 4.1.12. Analiza varijanse na svakom od odabranih kontrasta faktora unutar-subjekata (sezona i godina) za Hsp70 i Hsp101. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks-ovog λ testa, uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Izvor variranja	**Hsp101**			**Hsp70**		
	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Godina 1			*Kontrast: proleće - leto*			
Srednja vrednost	1	7,86	**0,0069**	1	16,33	**0,0002**
Tretman	1	0,02	0,8806	1	0,03	0,8695
Greška	58			58		
Godina 2			*Kontrast: proleće - leto*			
Srednja vrednost	1	39,44	**<,0001**	1	92,95	**<,0001**
Tretman	1	5,82	**0,0190**	1	2,39	0,1278
Greška	58			58		

Tabela 4.1.13. Rezultati kontrasta faktora između-subjekata (tretmana) u svakoj vremenskoj tački (godina i sezona) za Hsp17,6a i Hsp17,6b. Predstavljene su vrednosti procene razlika Est. (engl. *Estimate*), standardna greška (SE), *t* vrednost i statistička značajnost (*P*) dobijene *t*-testom kontrasta. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Izvor variranja	**Hsp17.6a**				**Hsp17.6b**			
	Est.	SE	*t*	*P*	Est.	SE	*t*	*P*
	Kontrast: izvan OTC-a - unutar OTC-a							
G1S1	0,1648	0,11	1,53	0,1307	0,2910	0,17	1,69	0,0973
G1S2	0,4484	0,22	2,09	**0,0413**	0,1841	0,17	1,12	0,2686
G2S1	-0,0594	0,04	-1,40	0,1665	0,0284	0,07	0,39	0,6996
G2S2	0,6350	0,23	2,81	**0,0067**	0,7904	0,32	2,49	**0,0155**

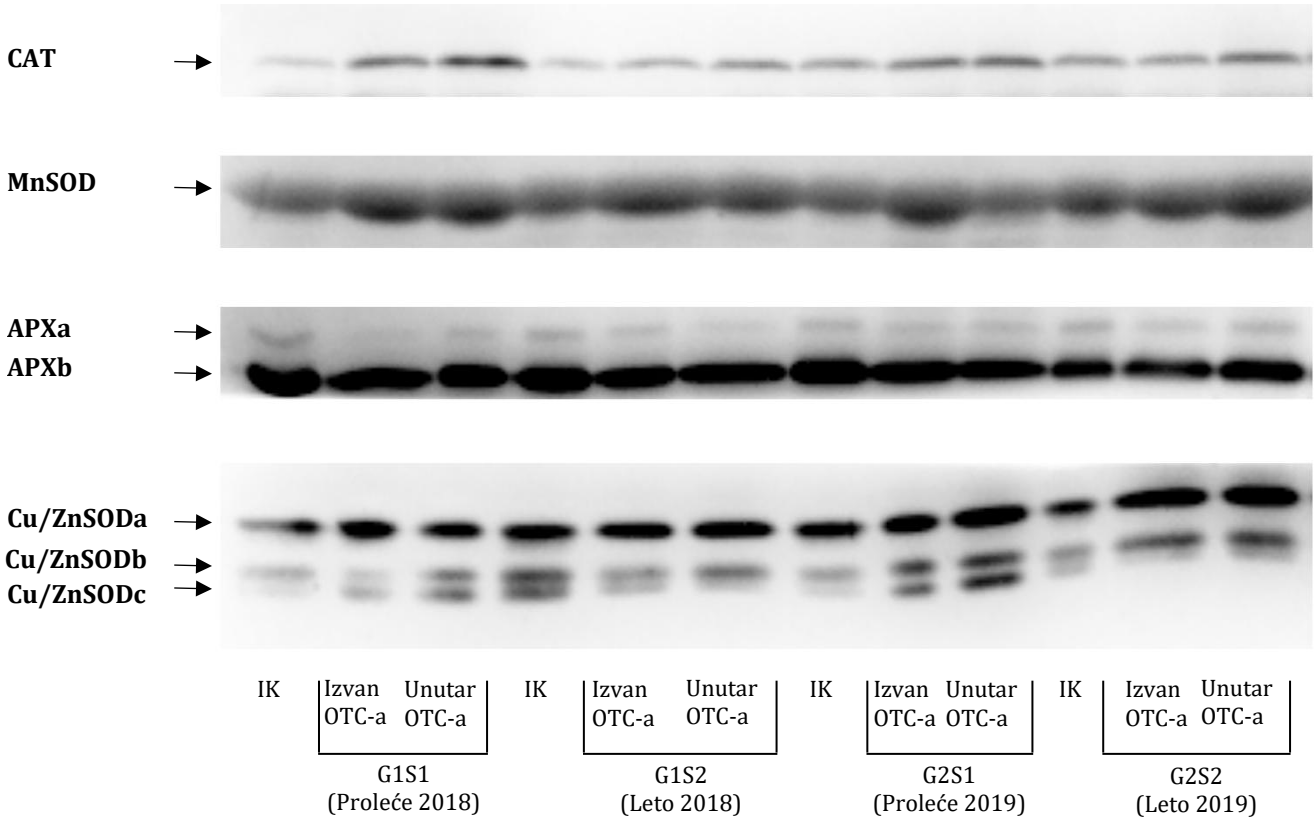
Tabela 4.1.14. Rezultati kontrasta faktora unutar-subjekata (godina, sezona) za svaki tretman za Hsp17.6a i Hsp17.6b. Predstavljene su vrednosti procene razlika Est. (engl. *Estimate*), standardna greška (SE), *t* vrednost i statistička značajnost (*P*) dobijene *t*-testom kontrasta. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Izvor variranja	Hsp17.6a				Hsp17.6b			
	Est.	SE	*t*	*P*	Est.	SE	*t*	*P*
Izvan OTC-a				*Kontrast: proleće-leto*				
Godina1	-1,0179	0,17	-6,13	**<,0001**	-0,5859	0,20	-2,90	**0,0040**
Godina2	-1,2131	0,17	-7,30	**<,0001**	-1,7802	0,20	-8,82	**<,0001**
Unutar OTC-a				*Kontrast: proleće-leto*				
Godina1	-1,3015	0,17	-7,83	**<,0001**	-0,4789	0,20	-2,37	**0,0184**
Godina2	-1,9075	0,17	-11,48	**<,0001**	-2,5421	0,20	-12,60	**<,0001**

4.1.6. Fenotipski odgovori količine antioksidativnih enzima u različitim temperaturnim sredinama

U cilju ispitivanja uticaja povišene temperature na količinu antioksidativnih enzima (CAT, APX, MnSOD i Cu/ZnSOD), analizirani su ukupni ćelijski ekstrakti listova *I. pumila* metodom semikvantitativnog Western blota. Uzorci listova istih klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije, koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a, prikupljani su sezonski (proleće i leto) tokom dve uzastopne godine (2018. i 2019.). Na Slici 4.1.17. prikazani su reprezentativni rezultati *Western blot* analize za svaki od analiziranih antioksidativnih enzima. U listovima rameta iz obe temperaturne sredine, u obe sezone i tokom obe godine, detektovana je po jedna imunospecifična traka za CAT i MnSOD, dve trake za APX, kao i tri trake različite molekulske mase za Cu/ZnSOD (Sliak 4.1.17). U ovim istraživanjima, identifikovane izoforme APX označene su kao APXa (izoforma veće molekulske mase) i APXb (izoforma manje molekulske mase), dok su izoforme Cu/ZnSOD obeležene kao Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb i Cu/ZnSODc, pri čemu Cu/ZnSODa predstavlja izoformu najveće, a Cu/ZnSODc najmanje molekulske mase.

U Tabeli 4.1.15. prikazane su prosečne vrednosti ($\bar{X}$) i odgovarajuće standardne greške (SE) za relativnu količinu antioksidativnih enzima: CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc u listovima rameta *I. pumila*. Analiza dobijenih rezultata pokazala je da se prosečne vrednosti svih ispitivanih antioksidativnih enzima nisu značajno razlikovale između rameta koji su se razvijali unutar OTC-a i onih koji su se razvijali izvan njih. Ipak, uočene su razlike između populacija. Za većinu antioksidativnih enzima prosečne vrednosti bile više u rametima Populacije 1 u poređenju sa rametima Populacije 2. Izuzetak je predstavljao enzim Cu/ZnSODc, čije su prosečne vrednosti bile veće kod rameta Populacije 2 u odnosu na Populaciju 1, dok se vrednosti za Cu/ZnSODa nisu razlikovale između populacija (Tabeli 4.1.15).



Slika 4.1.17. Relativne količine antioksidativnih enzima CAT, MnSOD, APX i Cu/ZnSOD u listovima *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve sezone i dve uzastopne godine.

Prikazane su imunospecifične trake CAT, MnSOD, APX i Cu/ZnSOD kod rameta *I. pumila* razvijenih izvan i unutar OTC-a, tokom proleća i leta 2018. i 2019. godine. Za CAT i MnSOD detektovana je po jedna traka, za APX dve izoforme, APXa i APXb, a za Cu/ZnSOD tri izoforme, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb i Cu/ZnSODc. IK – interna kontrola; G – godina; S – sezona.

Na Slikama 4.1.18, 4.1.19, 4.1.20, 4.1.21, 4.1.22, 4.1.23. i 4.1.24. prikazane su norme rekacije antioksidativnih enzima pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz obe populacije, koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a tokom dve sezone i dve godine. Takođe su prikazane prosečne norme reakcije za svaku populaciju ponaosob, kao i prosečne norme reakcije za obe populacije objedinjeno. Uporedna analiza pokazala je da su između temperaturnih sredina prosečne norme reakcije gotovo svih ispitivanih antioksidativnih enzima bile paralelne tokom celokupnog eksperimentalnog perioda (Tabela 4.1.16). Izuzetak je predstavljala izoforma APXb čije su prosečne norme reakcija divergirale u tački G1S2, a zatim se ukrštale između tačaka G1S2 i G2S1, kao i između tačaka G2S1 i G2S2 (Slika 4.1.20. (C.)).

Nivo norme reakcije bio je specifičan za svaki antioksidativni enzim i za svaku populaciju. Nivoi prosečnih normi reakcije za sve ispitivane antioksidativne enzime bili su slični između dva temperaturna tretmana. Međutim, uočene su razlike između populacija u nivoima prosečnih normi reakcija za sve analizirane enzime osim za izoformu Cu/ZnSODa (Tabela 4.1.16.). Nivoi prosečnih normi reakcije za CAT, APXa, APXb, MnSOD i Cu/ZnSODb, bili su viši kod rameta Populacije 1 u poređenju sa rametima Populacije 2, dok su nivoi prosečnih normi reakcija za Cu/ZnSODc, bili viši kod rameta Populacije 2 u odnosu na Populaciju 1 (Slike 4.1.18. (B.), 4.1.19. (B.), 4.1.20. (B.), 4.1.21. (B.), 4.1.22. (B.), 4.1.23. (B.) i 4.1.24. (B.); Tabela 4.1.15).

Oblik norme reakcije varirao je u zavisnosti od antioksidativnog enzima, njegove izoforme i vremenskog intervala. Tako su, na primer, nivoi prosečnih normi reakcija za APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa i Cu/ZnSODb rasli između proleća i leta prve godine. U drugoj godini zabeležen je rast nivoa prosečnih normi reakcije za APXb, MnSOD i Cu/ZnSODb između proleća i leta, dok su vrednosti za APXa i Cu/ZnSODa opadale. Nivoi prosečnih normi reakcija za CAT i Cu/ZnSODc opadali su između proleća i leta prve godine, dok su u drugoj godini rasli za CAT, a nastavili da opadaju za Cu/ZnSODc. Takođe, oblik prosečnih normi reakcije pokazao je dinamične promene tokom vremena: konkavan oblik za CAT, konveksan za APXa i Cu/ZnSODa, dok su APXb, MnSOD i Cu/ZnSODc ispoljili cik-cak obrazac u obe temperaturne sredine (Slike 4.1.18. (C.), 4.1.19. (C.), 4.1.20. (C.), 4.1.21. (C.), 4.1.22. (C.), 4.1.23. (C.) i 4.1.24. (C.)).

Procentualna zastupljenost relativne količine izoformi APX u rametima genotipova *I. pumila* iz obe populacije, koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a, tokom proleća i leta dve uzastopne godine, prikazana je na Slici 4.1.25. Procentualni udeo relativne količine ove dve izoforme bio je sličan između rameta koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a. Tokom čitavog posmatranog perioda, bez obzira na temperaturni tretman, izoforma APXb bila je zastupljenija od izoforme APXa. Jedini izuzetak zabeležen je u proleće druge godine, kada je uočen inverzan obrazac zastupljenosti ovih izoformi.

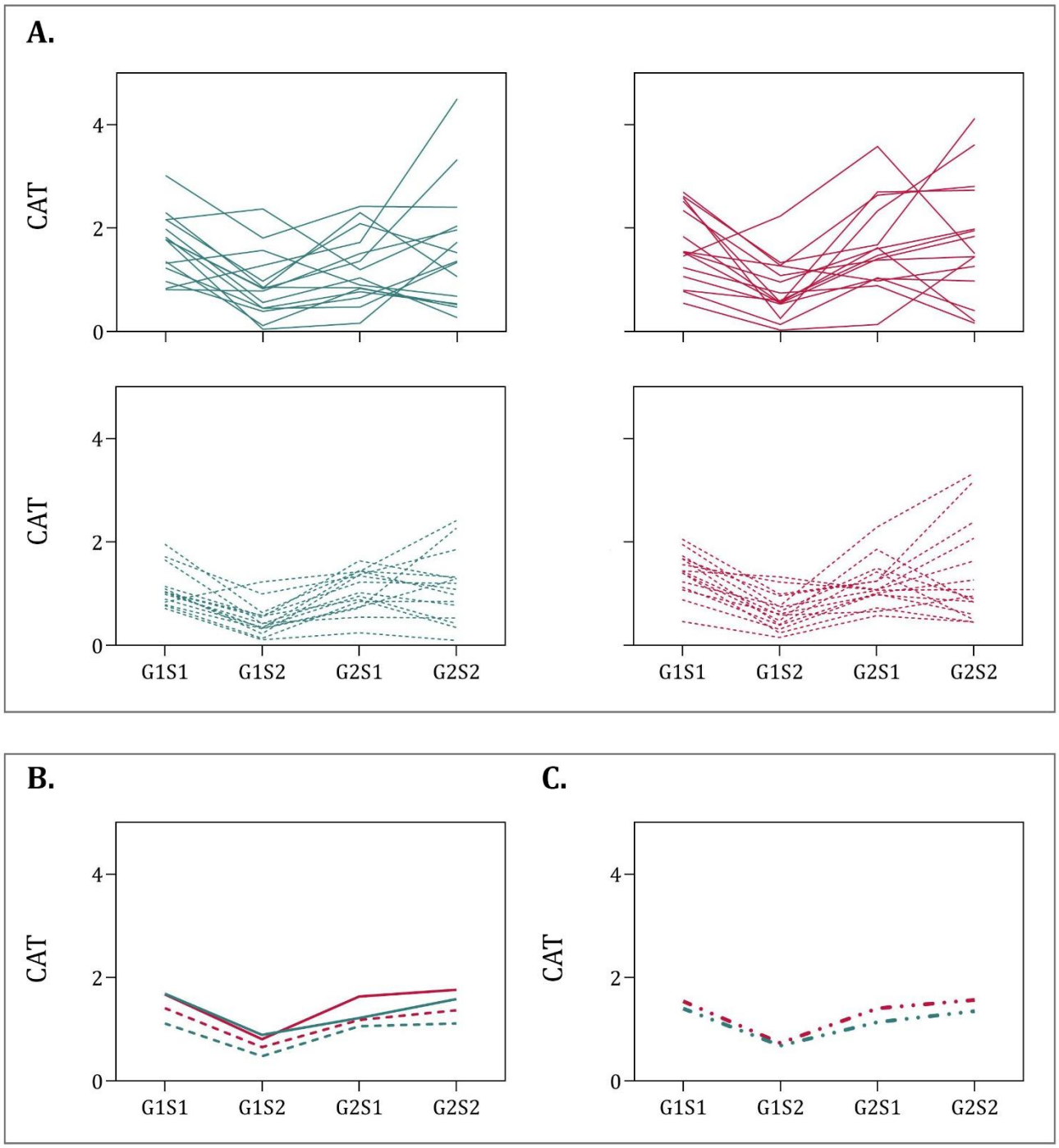
Na Slici 4.1.26. prikazana je procentualna zastupljenost relativne količine tri izoforme Cu/ZnSOD. Udeo sve tri izoforme u ukupnoj količini bio je sličan između rameta koji su se razvijali izvan OTC-a i onih unutar OTC-a. Tokom celog perioda istraživanja najzastupljenija je bila izoforma Cu/ZnSODa, dok je Cu/ZnSODc imala najmanju zastupljenost. Za Cu/ZnSODc je uočeno povećanje procentualnog udela tokom letnje sezone obe godine.

Procentualna zastupljenost relativne količine Cu/ZnSOD i MnSOD u ukupnoj količini SOD bila je slična između rameta koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a (Slika 4.1.27.). Bez obzira na tretman, sezonu i godinu, Cu/ZnSOD je bio znatno zastupljeniji od MnSOD. Ipak, tokom letnjih sezona primećen je blagi porast procentualnog udela MnSOD, naročito u 2019. godini.

Slika 4.1.28. prikazuje procentualnu zastupljenost relativne količine svih analiziranih antioksidativnih enzima. Udeo ova četiri enzima bio je sličan u rametima koji su se razvijaliizvan I unutar OTC-a. Iako je zastupljenost enzima bila specifična za svaku vremensku tačku, nije uočena doslednost u obrascima ni u odnosu na sezonu ni u odnosu na godinu.

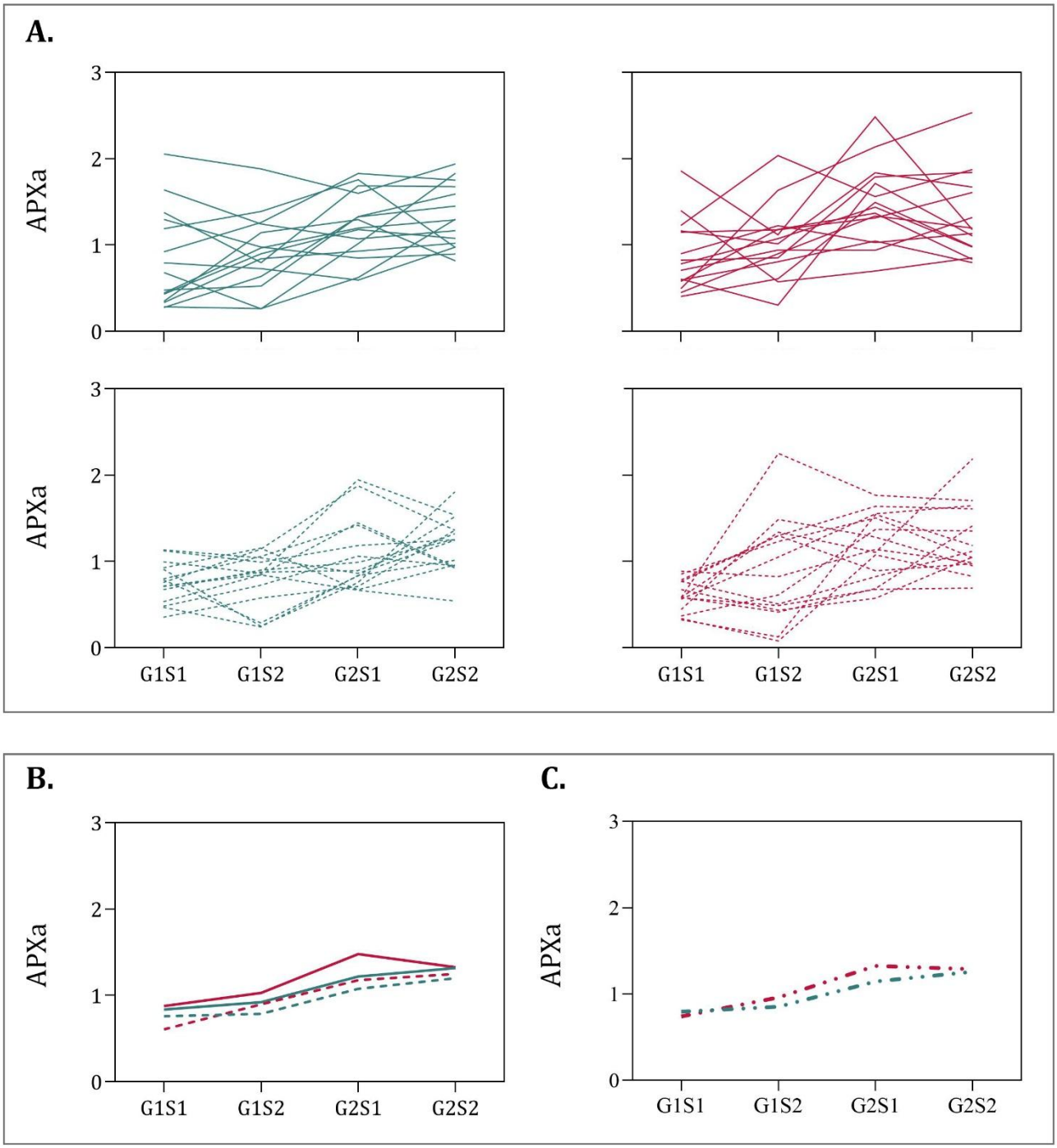
Tabela 4.1.15. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SE) relativne količine antioksidativnih enzima u listovima klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 15 i Populacija 2, *n* = 15), tokom dve sezone (proleće i leto) i dve uzastopne godine (2018. i 2019). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Antioksidativni enzimi	**Godina 1**								**Godina 2**							
	Proleće				**Leto**				**Proleće**				**Leto**			
	Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a	
Populacija 1	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE
CAT	1,69	0,16	1,68	0,19	0,89	0,17	0,81	0,15	1,22	0,17	1,63	0,22	1,59	0,30	1,77	0,30
APXa	0,84	0,14	0,88	0,11	0,92	0,11	1,03	0,11	1,22	0,10	1,48	0,12	1,32	0,10	1,33	0,13
APXb	1,07	0,06	1,01	0,06	1,13	0,05	1,19	0,06	0,93	0,05	0,88	0,04	1,41	0,08	1,47	0,10
MnSOD	1,09	0,07	1,02	0,06	1,17	0,06	1,19	0,06	1,01	0,10	0,97	0,09	1,26	0,05	1,20	0,09
Cu/ZnSODa	0,94	0,13	1,03	0,14	1,13	0,15	1,05	0,10	0,94	0,06	1,17	0,10	1,21	0,14	1,21	0,13
Cu/ZnSODb	0,75	0,10	1,01	0,14	0,79	0,07	0,81	0,10	0,96	0,09	1,12	0,13	1,55	0,10	1,69	0,17
Cu/ZnSODc	0,84	0,10	1,01	0,15	0,42	0,04	0,38	0,06	1,45	0,11	1,62	0,16	0,55	0,05	0,55	0,07
Populacija 2																
CAT	1,12	0,10	1,41	0,11	0,48	0,08	0,66	0,09	1,06	0,10	1,18	0,12	1,12	0,17	1,37	0,25
APXa	0,76	0,06	0,61	0,05	0,79	0,08	0,90	0,15	1,08	0,11	1,18	0,10	1,20	0,08	1,25	0,10
APXb	0,97	0,04	0,99	0,04	0,98	0,06	1,04	0,09	0,76	0,07	0,64	0,07	1,20	0,09	1,31	0,11
MnSOD	0,85	0,07	0,90	0,09	0,77	0,05	0,83	0,09	0,51	0,06	0,52	0,06	1,38	0,08	1,45	0,10
Cu/ZnSODa	0,79	0,13	0,70	0,14	1,12	0,14	1,16	0,15	1,58	0,14	1,58	0,12	1,37	0,17	1,28	0,10
Cu/ZnSODb	0,36	0,07	0,41	0,10	0,65	0,12	0,59	0,10	1,13	0,16	0,96	0,12	1,08	0,13	1,06	0,12
Cu/ZnSODc	0,64	0,09	0,73	0,12	0,35	0,08	0,39	0,10	2,44	0,37	2,11	0,25	0,70	0,10	0,78	0,10
Obe populacije																
CAT	1,40	0,11	1,54	0,11	0,69	0,10	0,73	0,09	1,14	0,10	1,41	0,13	1,35	0,18	1,57	0,20
APXa	0,80	0,08	0,74	0,06	0,85	0,07	0,96	0,09	1,15	0,07	1,33	0,08	1,26	0,06	1,29	0,08
APXb	1,02	0,04	1,00	0,04	1,06	0,04	1,12	0,06	0,85	0,04	0,76	0,05	1,30	0,06	1,39	0,07
MnSOD	0,97	0,05	0,96	0,05	0,97	0,05	1,01	0,06	0,76	0,07	0,75	0,07	1,32	0,05	1,33	0,07
Cu/ZnSODa	0,86	0,09	0,86	0,10	1,13	0,10	1,10	0,09	1,26	0,10	1,37	0,08	1,29	0,11	1,24	0,08
Cu/ZnSODb	0,56	0,07	0,71	0,10	0,72	0,07	0,70	0,07	1,05	0,09	1,04	0,09	1,32	0,09	1,38	0,12
Cu/ZnSODc	0,74	0,07	0,87	0,10	0,38	0,05	0,39	0,06	1,94	0,21	1,87	0,15	0,62	0,06	0,67	0,06



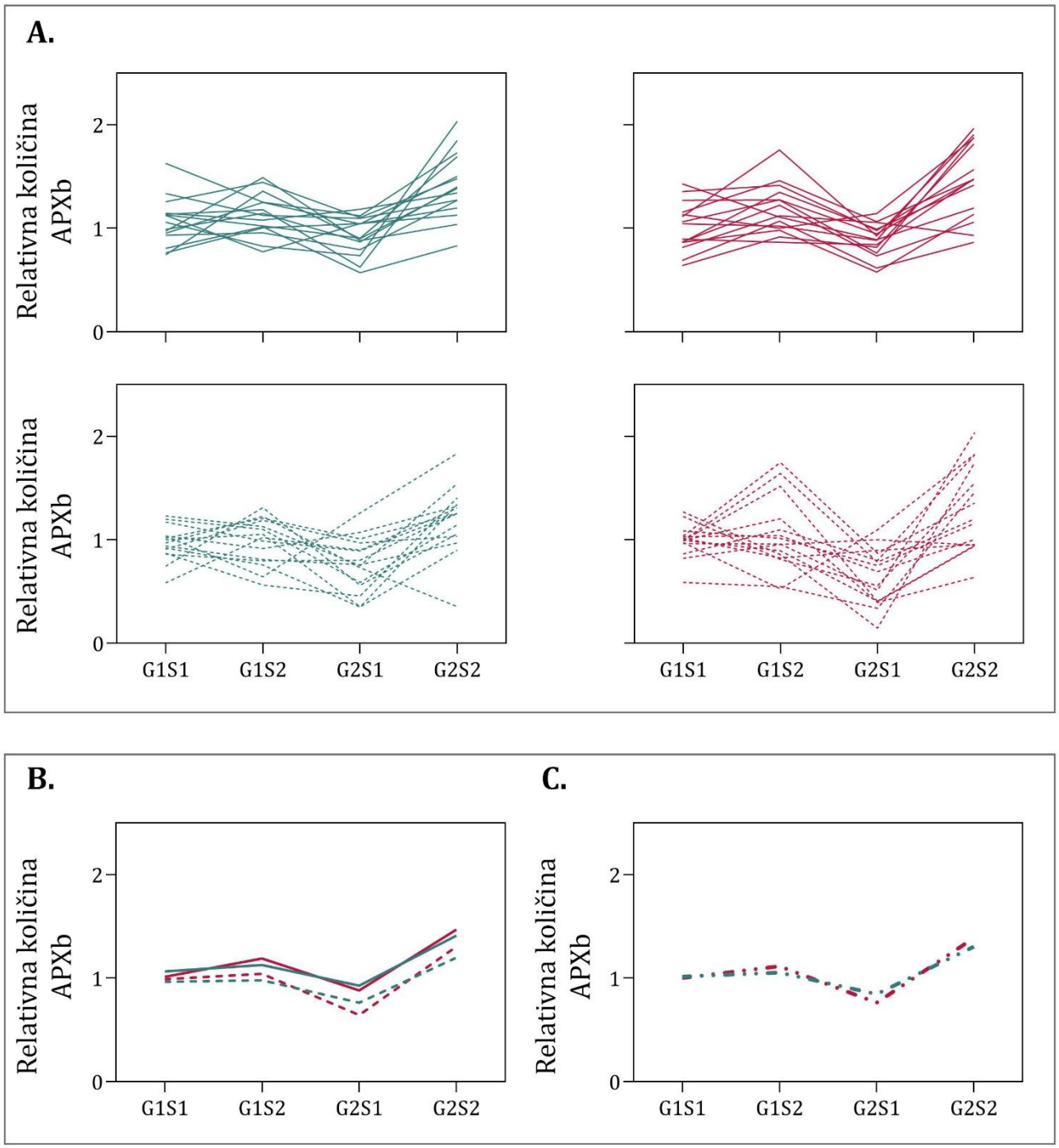
Slika 4.1.18. Sezonsko variranje relativne količine CAT u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina CAT izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



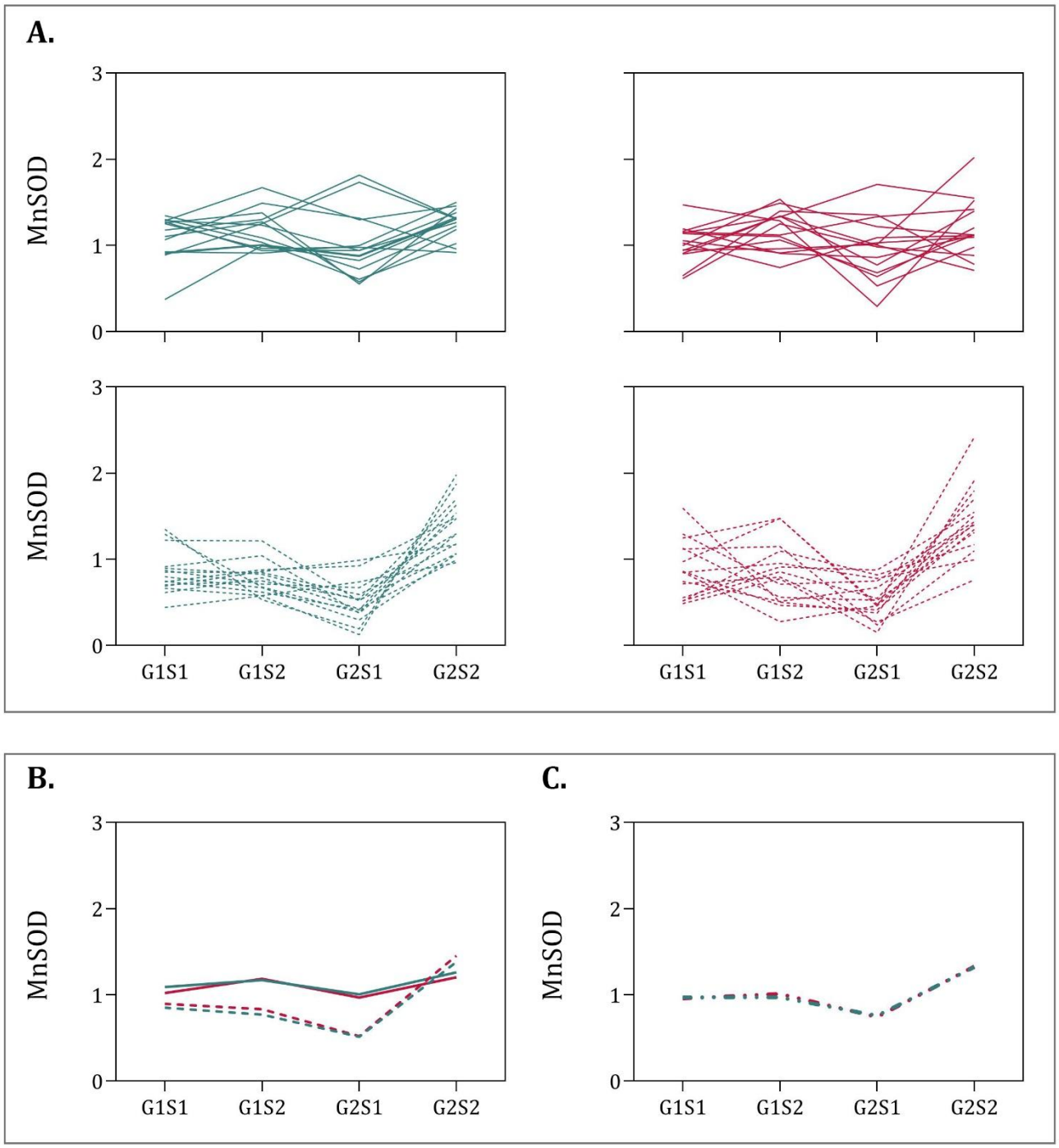
Slika 4.1.19. Sezonsko variranje relativne količine izoforme APXa u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina APXa izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



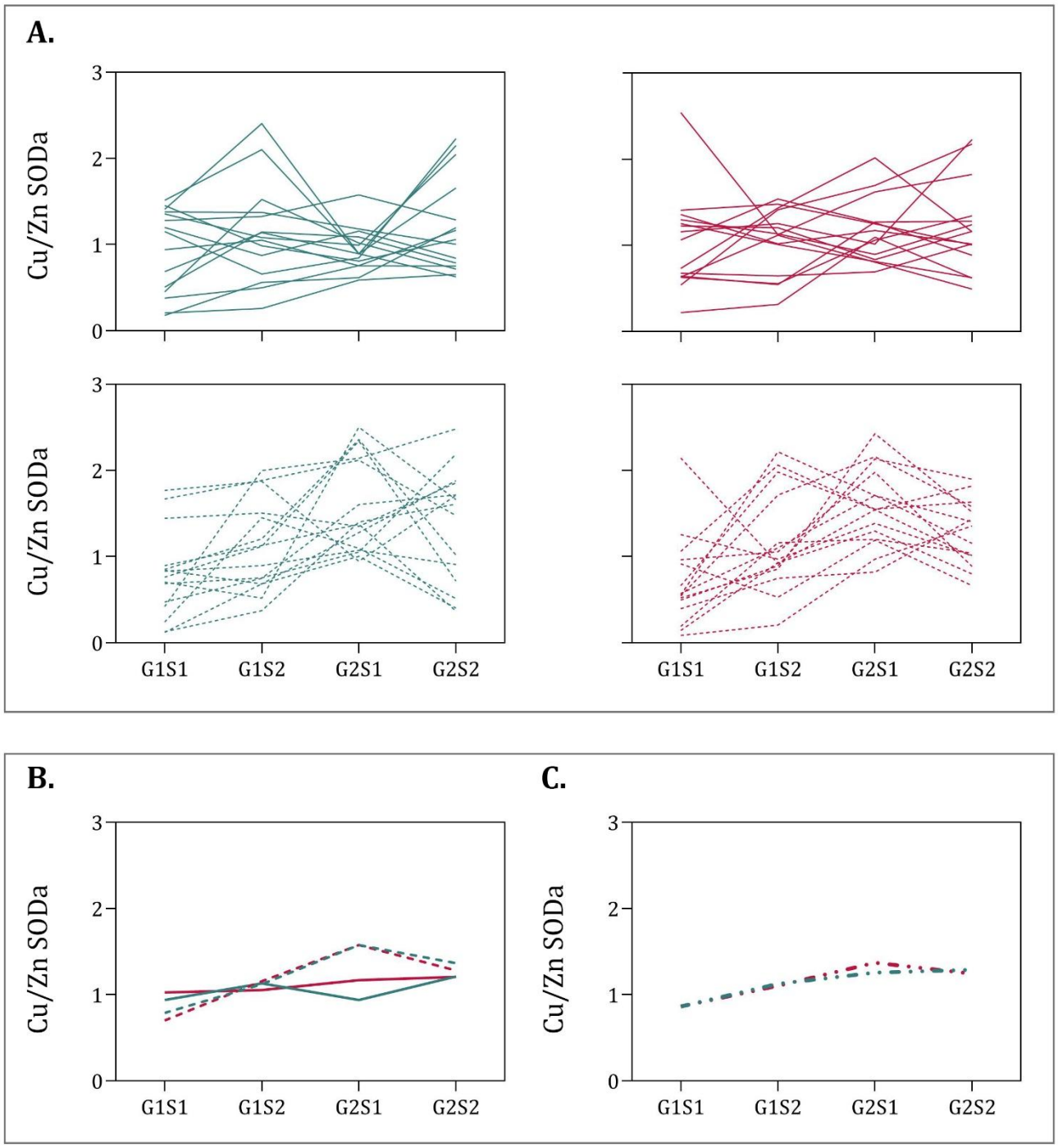
Slika 4.1.20. Sezonsko variranje relativne količine izoforme APXb u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina APXb izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



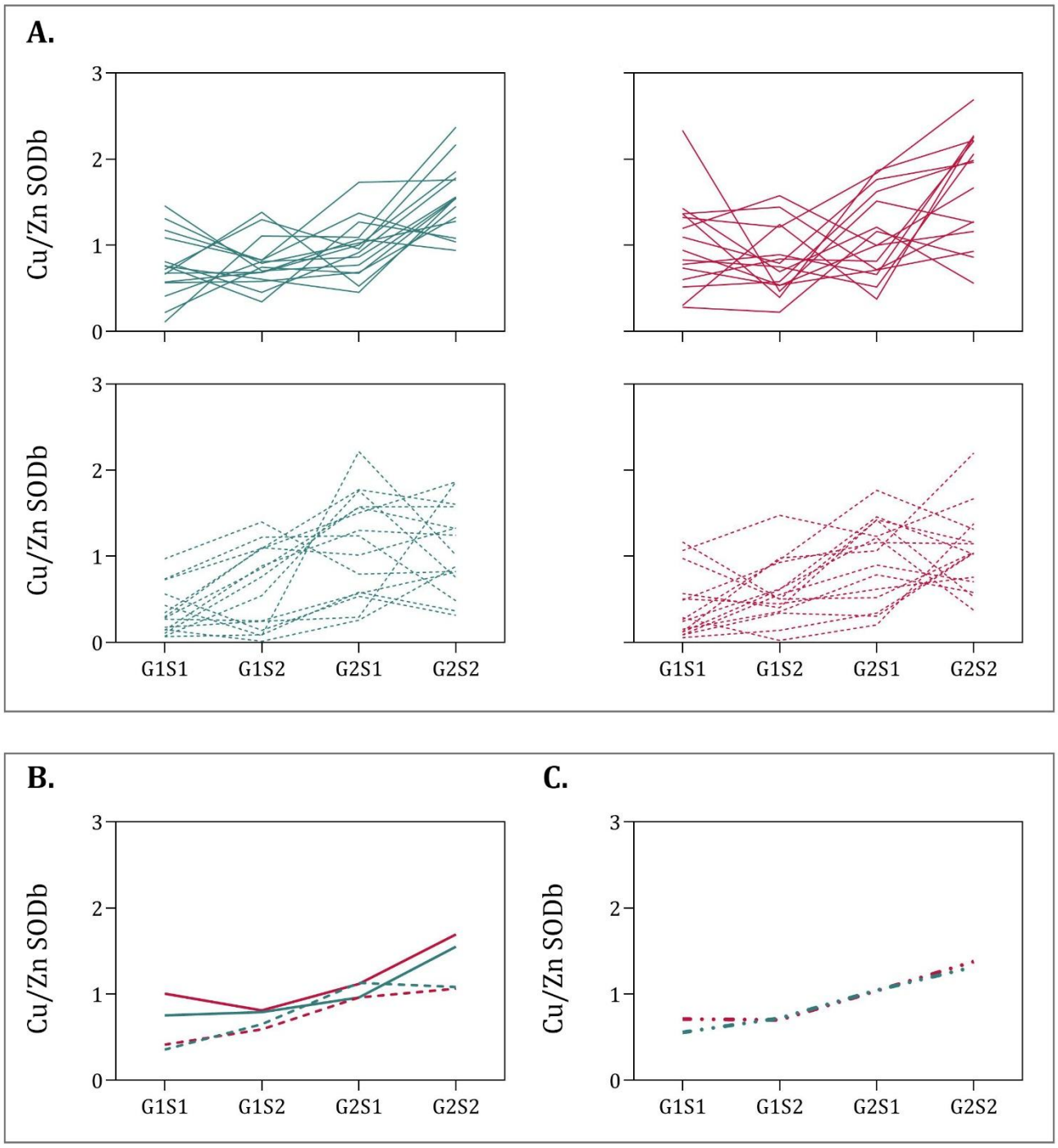
Slika 4.1.21. Sezonsko variranje relativne količine MnSOD u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina MnSOD izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



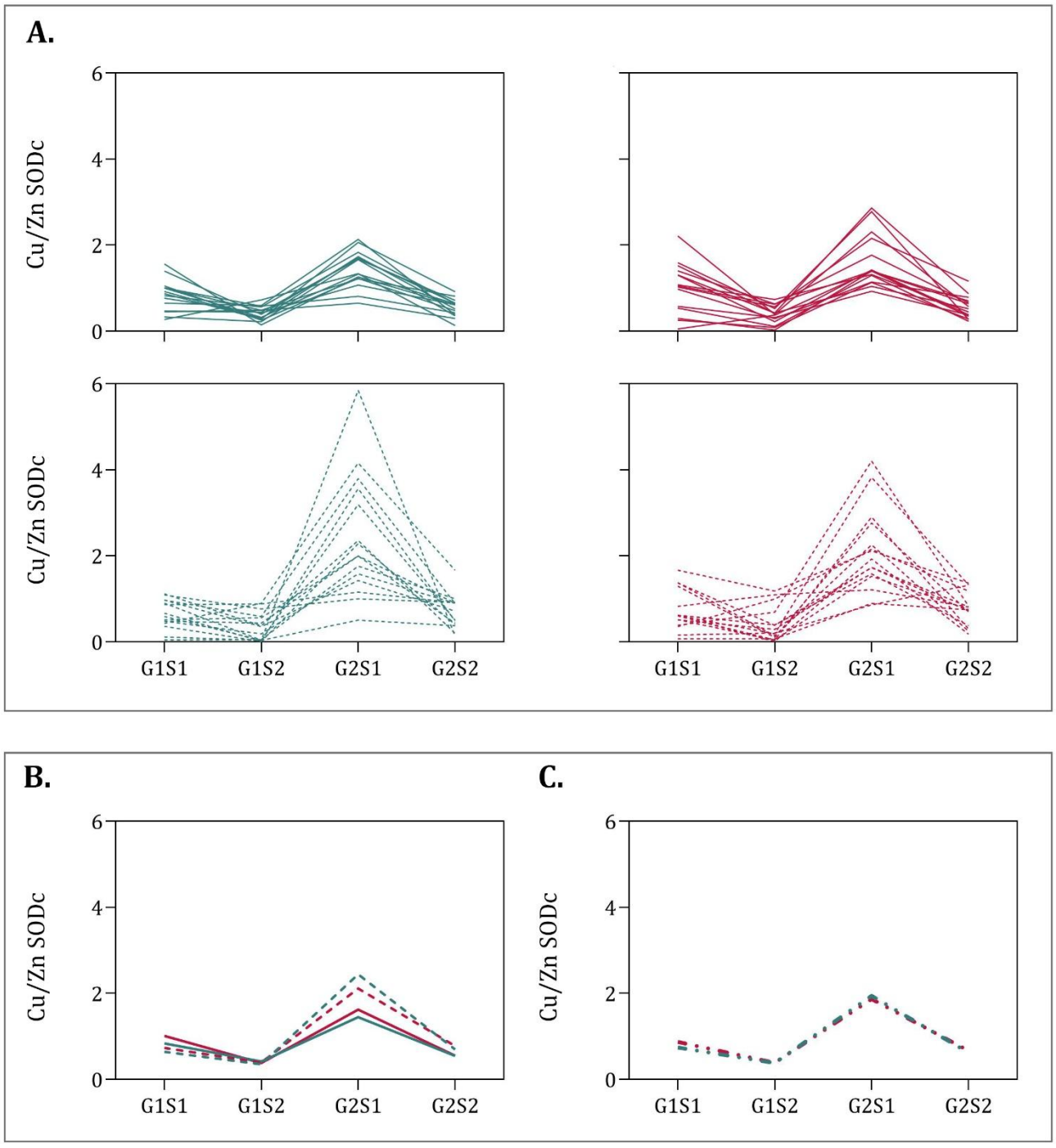
Slika 4.1.22. Sezonsko variranje relativne količine izoforme Cu/Zn SODa u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina Cu/ZnSODa izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



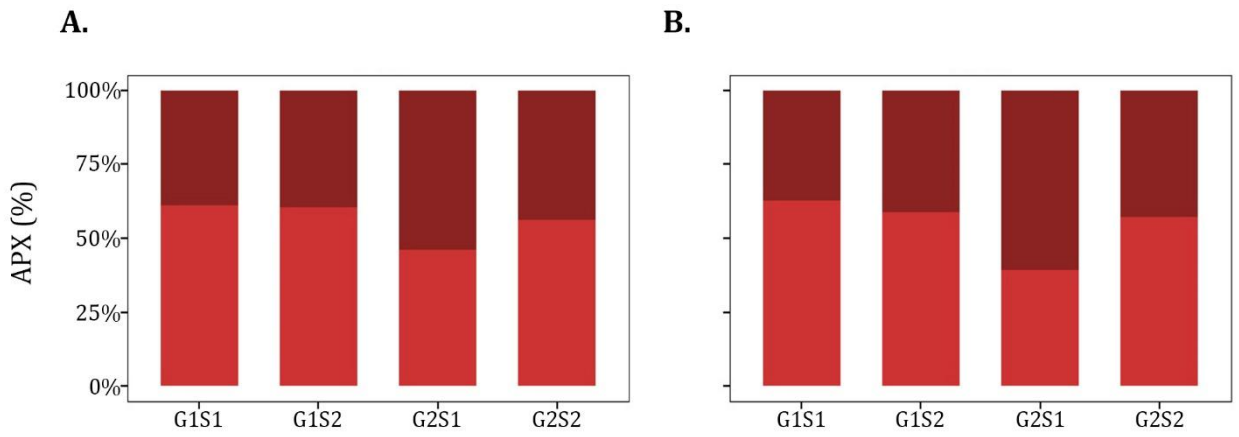
Slika 4.1.23. Sezonsko variranje relativne količine izoforme Cu/Zn SODb u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina Cu/ZnSODb izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



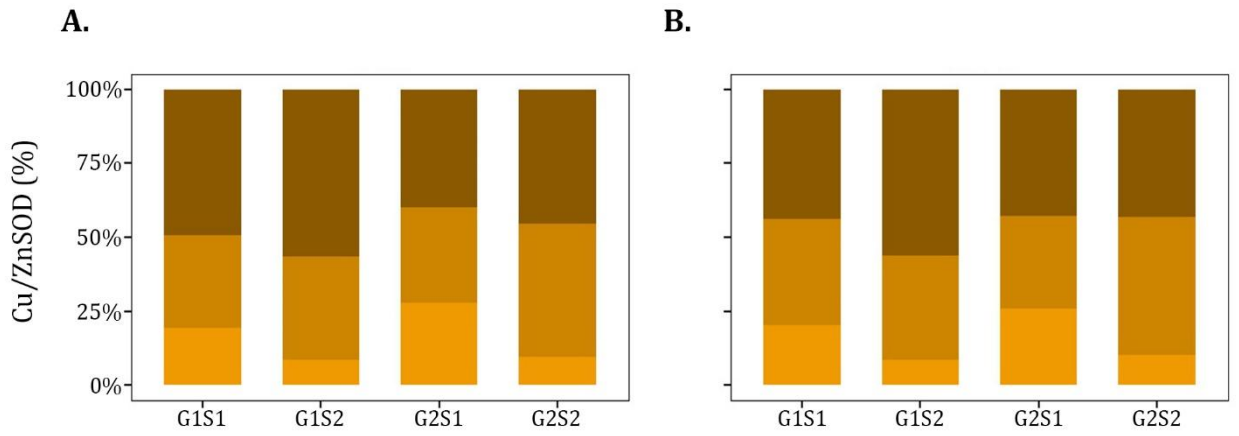
Slika 4.1.24. Sezonsko variranje relativne količine izoforme Cu/Zn SODc u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom dve uzastopne godine, *in situ*.

(**A.**) Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1 – puna linija; Populacija 2 -isprekidana linija), koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine; (**B.**) Prosečne norme reakcije za Populaciju 1 i Populaciju 2; (**C.**) Prosečne norme reakcije za obe populacije zajedno. S – sezona; G – godina. Relativna količina Cu/ZnSODc izražena je u arbitrarnim jedinicama (AJ).



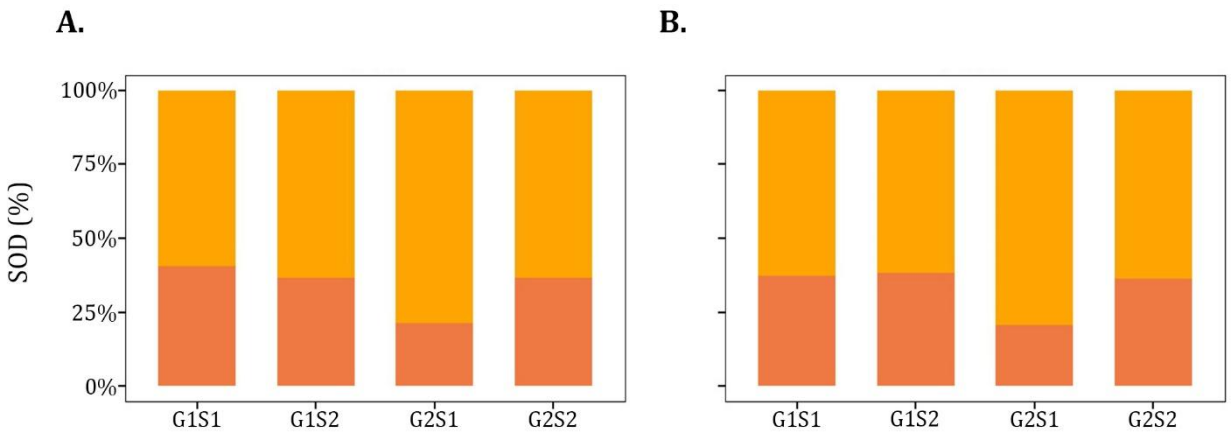
Slika 4.1.25. Procentualni udeo izoformi APX u ukupnoj relativnoj količini APX u listovima *I. pumila.*

Prikazani su procentualni udeli izoformi APXa i APXb u ukupnoj relativnoj količini APX u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine: (**A.**) izvan OTC-a i (**B.**) unutar OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine. ■ APXa ■ APXb. G – godina; S – sezona.



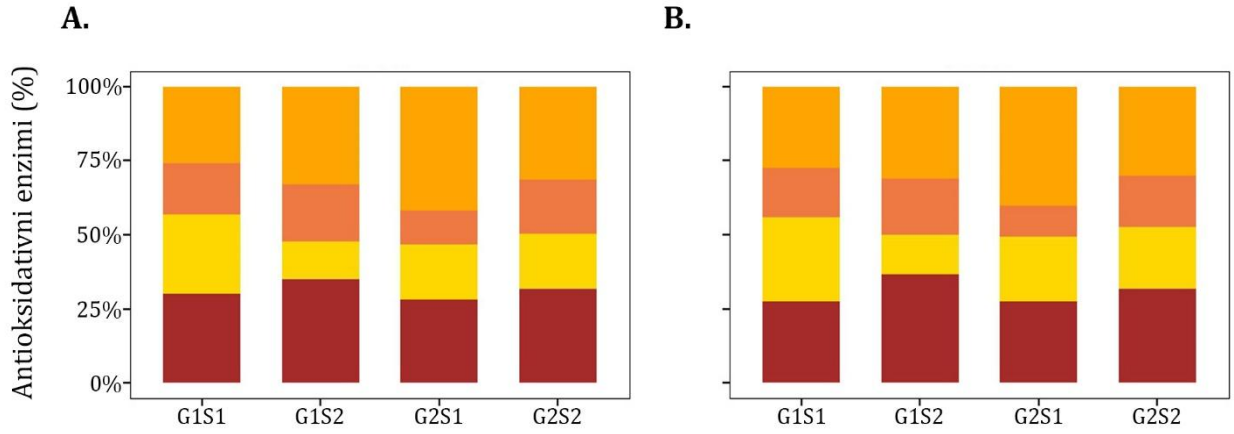
Slika 4.1.26. Procentualni udeo izoformi Cu/ZnSOD u ukupnoj relativnoj količini Cu/ZnSOD u listovima *I. pumila*.

Prikazani su procentualni udeli izoformi Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb i Cu/ZnSODc u ukupnoj relativnoj količini Cu/ZnSOD u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine: (**A.**) izvan OTC-a i (**B.**) unutar OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine. ■ Cu/ZnSODa ■ Cu/ZnSODb ■ CuZnSODc. G – godina; S – sezona.



Slika 4.1.27. Procentualni udeo izoformi Cu/ZnSOD i MnSOD u ukupnoj relativnoj količini SOD u listovima *I. pumila*.

Prikazani su procentualni udeli Cu/ZnSOD i MnSOD u ukupnoj relativnoj količini SOD u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine: (**A.**) izvan OTC-a i (**B.**) unutar OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine. Cu/ZnSOD MnSOD. G – godina; S – sezona.



Slika 4.1.28. Procentualni udeo pojedinačnih antioksidativnih enzima u njihovoj ukupnoj relativnoj količini u listovima *I. pumila*.

Prikazani su procentualni udeli Cu/ZnSOD, MnSOD, CAT i APX u ukupnoj relativnoj količini antioksidativnih enzima u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine: (**A.**) izvan OTC-a i (**B.**) unutar OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine G. Cu/ZnSOD MnSOD CAT APX. G – godina; S – sezona.

4.1.7. Analiza profila odgovora antioksidativnih enzima na povišenu temperaturu

Rezultati MANOVAR za količine antioksidativnih enzima u listovima genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije, koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a, tokom proleća i leta u periodu od dve uzastopne godine prikazani su u Tabelama 4.1.16 i 4.1.17. Za većinu antioksidativnih enzima nisu utvrđeni statistički značajni efekti interakcija (Tabele 4.1.16 i 4.1.17) što ukazuje na to da su prosečni profili odgovora rameta koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a bili paralelni tokom vremena. Jedini izuzetak predstavljala je izoforma APXb, čiji profili odgovora

nisu bili paralelni između temepraturnih tretmana (P = 0,0306) (Tabela 4.1.16), zbog čega nije bilo neophodno sprovesti dodatne testove za ovu izoformu. Efekat temperaturnog tretmana nije bio značajan ni za jedan od preostalih ispitivanih antioksidativnih enzima (sve P > 0,05), što ukazuje da su prosečne vrednosti CAT, APXa, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb i Cu/ZnSODc bile slične kod rameta koji su se razvijali u različitim temperaturnim sredinama. Nasuprot tome, efekat populacije bio je značajan za sve enzime osim za Cu/ZnSODa (P = 0,1985; Tabele 4.1.16 i 4.1.17), što potvrđuje da se populacije međusobno razlikuju u prosečnim vrednostima CAT, APXa, MnSOD, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc. Rezultati testiranja hipoteze o jednoličnosti pokazali su statistički značajne efekte sezone i godine. Konkretno, CAT, MnSOD, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc značajno su menjali svoje profile odgovora u zavisnosti od sezone (P = 0,0002, P = 0,0320, P < 0,0001, P = 0,0032 i P < 0,0001, redom; Tabele 4.1.16 i 4.1.17). Dodatno, CAT, APXa, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb i Cu/ZnSODc značajno su menjali svoje profile odgovora tokom ispitivanih godina (P = 0,0010, P < 0,0001, P < 0,0001, P < 0,0001 i P < 0,0001, redom; Tabele 4.1.16 i 4.1.17). Ipak, određeni antioksidativni enzimi pokazali su stabilan odgovor na temperaturno variranje: Cu/ZnSODa tokom sezona (P = 0,0584), a MnSOD tokom godina (P = 0,0927).

Testiranjem unapred definisanih kontrasta (proleće-leto), za svaku godinu, jednofaktorskim ANOVA-ma, pokazano je da su prosečne vrednosti za oba tretmana bile značajno različite: u obe eksperimentalne godine za Cu/ZnSODc (oba P < 0,0001), tokom prve godine za CAT (P < 0,0001) i Cu/ZnSODa (P = 0,0014), te tokom druge godine za APXa (P < 0,0001), MnSOD (P < 0,0001) i Cu/ZnSODb (P < 0,0015) (Tabele 4.1.18. i 4.1.19). Prosečni profili odgovora između tretmana nisu pokazali značajne razlike ni za jedan analizirani antioksidativni enzim, što je u skladu sa rezultatima analize profila (Tabele 4.1.16. i 4.1.17).

Pošto je hipoteza paralelizma za APXb odbačena, sprovedene su dodatne analize unapred definisanih kontrasta: između subjekata (razlike između tretmana u svakoj vremenskoj tački) i unutar subjekata (razlike između sezona unutar svakog tretmana). Na ovaj način pojedinačno su ispitani efekati, čime je izbegnuta njihova interakcija. Rezultati kontrasta između subjekata pokazali su da ne postoji značajan efekat temperaturnog tretmana na količinu APXb (sve P > 0,05; Tabela 4.1.20). Ovakav nalaz potvrđuje da temperaturni tretman ne utiče na količinu ovog enzima, što je u sladu sa rezultatima dobijenim za ostale antioksidativne enzime.

S druge strane, rezultati kontrasta unutar subjekata ukazuju na sezonsku dinamiku količine APXb, koja je zavisila od godine, u oba temperaturna tretmana (Tabela 4.1.21). Tokom prve godine eksperimenta nije utvrđena statistički značajna razlika između proleća i leta (P = 0,5881 izvan OTC-ai P = 0,1143, unutar OTC-a), dok je tokom druge godine detektovana jasna sezonska promena. Relativna količina APXb značajno je porasla od proleća do leta (Est. = -0,46 i Est. = -0,62; obe P < 0,0001 izvan i unutar OTC-a, redom). Ovi rezultati ukazuju na vremensku specifičnost odgovora APXb, odnosno na to da sezonske promene mogu modulirati njegovu ekspresiju. Međutim, pošto ovaj obrazacnije bio konzistentan između godina, interpretacija APXb kao stabilnog markera sezonske plastičnosti ostaje ograničena.

Tabela 4.1.16. Rezultati multivarijatne analize sa ponavljanjima (analiza profila) za CAT, APXa i APXb. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks-ovog λ testa uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

A. Između subjekata		**CAT**				**APXa**				**APXb**		
Izvor variranja		df	*F*	*P*		df	*F*	*P*		df	*F*	*P*
Populacija (P)		1	8,05	**0,0063**		1	4,52	**0,0380**		1	14,74	**0,0003**
Tretman (T)		1	1,75	0,1906		1	0,79	0,3767		1	0,09	0,7623
P x T		1	0,11	0,7361		1	0,28	0,6019		1	0,03	0,8693
Greška		56				56				56		
B. Unutar subjekata												
Izvor variranja	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*
Godina (G)	0,8240	11,96	1/56	**0,0010**	0,4329	73,35	1/56	**<,0001**	0,9891	0,62	1/56	0,4348
Sezona (S)	0,7802	15,77	1/56	**0,0002**	0,9205	4,84	1/56	**0,0320**	0,3016	129,67	1/56	**<,0001**
G x S	0,5429	47,14	1/56	**<,0001**	0,9752	1,42	1/56	0,2382	0,5779	40,91	1/56	**<,0001**
P x G	0,9997	0,02	1/56	0,9005	0,9999	0,00	1/56	0,9444	0,9727	1,57	1/56	0,2148
P x S	1,0000	0,00	1/56	0,9666	0,9812	1,07	1/56	0,3043	0,9923	0,43	1/56	0,5125
P x G x S	0,9836	0,93	1/56	0,3385	0,9956	0,25	1/56	0,6222	0,9916	0,48	1/56	0,4931
T x G	0,9846	0,88	1/56	0,3529	0,9887	0,64	1/56	0,4261	0,9980	0,11	1/56	0,7410
T x S	0,9955	0,25	1/56	0,6178	0,9998	0,01	1/56	0,9227	0,9192	4,92	1/56	**0,0306**
T x G x S	0,9996	0,02	1/56	0,8804	0,9439	3,33	1/56	0,0734	0,9931	0,39	1/56	0,5341

Tabela 4.1.17. Rezultati multivarijatne analize sa ponavljanjima (analiza profila) za MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb i Cu/ZnSODc. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks-ovog λ testa uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

A. Između subjekata	**MnSOD**			**Cu/ZnSODa**			**Cu/ZnSODb**			**Cu/ZnSODc**		
Izvor variranja	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Populacija (P)	1	30,42	**<,0001**	1	1,69	0,1985	1	18,71	**<,0001**	1	4,09	**0,0480**
Tretman (T)	1	0,02	0,9022	1	0,02	0,8955	1	0,45	0,5029	1	0,10	0,7537
P x T	1	1,22	0,2740	1	0,30	0,5885	1	1,87	0,1773	1	0,44	0,5102
Greška	56			56			56			56		

B. Unutar subjekata																
Izvor variranja	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*	Wilks' λ	*F*	df	*P*
Godina (G)	0,9503	2,93	1/56	0,0927	0,6920	24,92	1/56	**<,0001**	0,3663	96,89	1/56	**<,0001**	0,3596	99,72	1/56	**<,0001**
Sezona (S)	0,4133	79,48	1/56	**<,0001**	0,9375	3,73	1/56	0,0584	0,8552	9,48	1/56	**0,0032**	0,3169	120,71	1/56	**<,0001**
G x S	0,5687	42,47	1/56	**<,0001**	0,8829	7,43	1/56	**0,0085**	0,8923	6,76	1/56	**0,0119**	0,5576	44,43	1/56	**<,0001**
P x G	0,9375	3,74	1/56	0,0583	0,8250	11,88	1/56	**0,0011**	0,9929	0,40	1/56	0,5301	0,7425	19,43	1/56	**<,0001**
P x S	0,8265	11,76	1/56	**0,0011**	0,9939	0,34	1/56	0,5615	0,9839	0,92	1/56	0,3429	0,9782	1,25	1/56	0,2686
P x G x S	0,6875	25,45	1/56	**<,0001**	0,8505	9,84	1/56	**0,0027**	0,6909	25,06	1/56	**<,0001**	0,8600	9,11	1/56	**0,0038**
T x G	0,9990	0,06	1/56	0,8096	0,9975	0,14	1/56	0,7072	0,9974	0,15	1/56	0,7018	0,9930	0,40	1/56	0,5318
T x S	0,9944	0,31	1/56	0,5781	0,9869	0,74	1/56	0,3929	0,9967	0,18	1/56	0,6698	1,0000	0,00	1/56	0,9764
T x G x S	0,9995	0,03	1/56	0,8614	0,9930	0,40	1/56	0,5313	0,9662	1,96	1/56	0,1674	0,9831	0,96	1/56	0,3311

Tabela 4.1.18. Analiza varijanse na svakom od odabranih kontrasta faktora unutar-subjekata (sezona i godina) za CAT i APXa. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks-ovog λ testa uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Izvor variranja	**CAT**			**APXa**		
	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Godina 1	*Kontrast: proleće - leto*					
Srednja vrednost	1	105,07	**<,0001**	1	3,91	0,0528
Tretman	1	0,40	0,5307	1	0,94	0,3364
Greška	58			58		
Godina 2	*Kontrast: proleće - leto*					
Srednja vrednost	1	2,42	0,1255	1	115,52	**<,0001**
Tretman	1	0,05	0,8275	1	2,71	0,1051
Greška	58			58		

Tabela 4.1.19. Analiza varijanse na svakom od odabranih kontrasta faktora unutar-subjekata (sezona i godina) za MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb i Cu/ZnSODc. Predstavljene su *F*-vrednosti Wilks-ovog λ testa uz stepene slobode (df) i statističku značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Izvor variranja	**MnSOD**			**Cu/ZnSODa**			**Cu/ZnSODb**			**Cu/ZnSODc**		
	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Godina 1						*Kontrast: proleće - leto*						
Srednja vrednost	1	0,28	0,5992	1	11,22	**0,0014**	1	1,35	0,2498	1	46,12	**<,0001**
Tretman	1	0,31	0,5826	1	0,02	0,8868	1	1,67	0,2012	1	1,07	0,3055
Greška	58			58			58			58		
Godina 2						*Kontrast: proleće - leto*						
Srednja vrednost	1	61,14	**<,0001**	1	0,34	0,5604	1	11,12	**0,0015**	1	93,34	**<,0001**
Tretman	1	0,02	0,8771	1	0,95	0,3334	1	0,14	0,7102	1	0,21	0,6501
Greška	58			58			58			58		

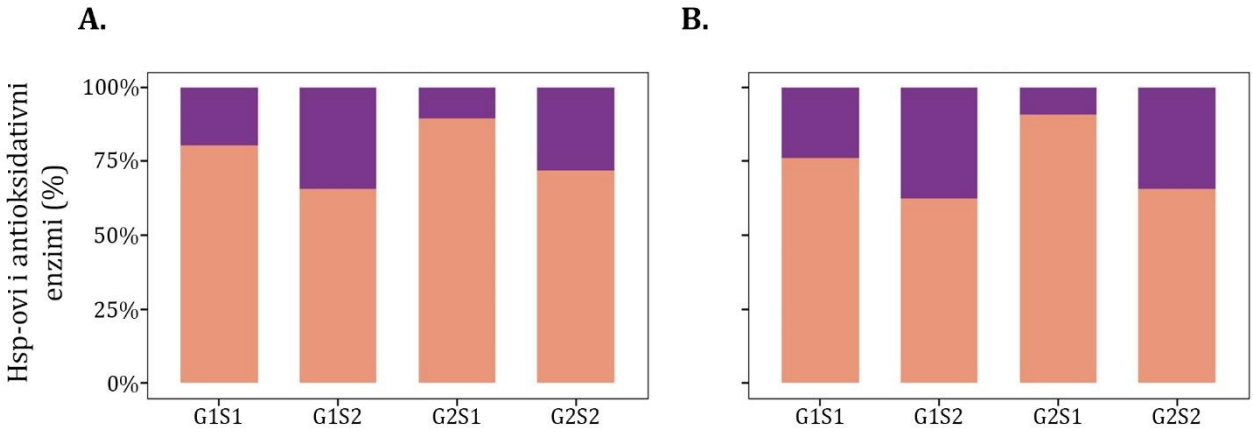
Tabela 4.1.20. Rezultati kontrasta faktora između-subjekata (tretmana) u svakoj vremenskoj tački (godina i sezona) za APXb. Predstavljene su vrednosti procene razlika Est. (engl. *Estimate*), standardna greška (SE), *t* vrednost i statistička značajnost (*P*) dobijene *t*-testom kontrasta. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Izvor variranja	**APXb**			
	Est.	SE	*t*	*P*
	Kontrast: izvan OTC-a - unutar OTC-a			
G1S1	-0,0136	0,05	-0,26	0,7940
G1S2	0,0612	0,07	0,88	0,3841
G2S1	-0,0830	0,06	-1,31	0,1969
G2S2	0,0829	0,10	0,87	0,3856

Tabela 4.1.21. Rezultati kontrasta faktora unutar-subjekata (godina, sezona) za svaki tretman za APXb. Predstavljene su vrednosti procene razlika Est. (engl. *Estimate*), standardna greška (SE), *t* vrednost i statistička značajnost (*P*) dobijene *t*-testom kontrasta. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Izvor variranja	**APXb**			
	Est.	SE	*t*	*P*
Izvan OTC-a		*Kontrast: proleće-leto*		
Godina1	-0,0389	0,07	-0,54	0,5881
Godina2	-0,4585	0,07	-6,39	**<,0001**
Unutar OTC-a		*Kontrast: proleće-leto*		
Godina1	-0,1138	0,07	-1,59	0,1143
Godina2	-0,6244	0,07	-8,70	**<,0001**

Na Slici 4.1.29. prikazano je sezonsko variranje procentualne zastupljenosti Hsp i antioksidativnih enzima tokom dve sezone i dve godine, u okviru dva temperaturna tretmana. Udeo ovih proteina bio je sličan kod rameta koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a. Tokom svih sezona relativni udeo antioksidativnih enzima bio je veći od udela Hsp, dok je u letnjim sezonama zabeleženo povećanje relativnog udela Hsp. Ova promena može odražavati povećanu potrebu za očuvanjem funkcionalnosti proteina tokom perioda intenzivnijeg temperaturnog stresa.



Slika 4.1.29. Procentualni udeo proteina toplotnog stresa i antioksidativnih enzima u njihovoj ukupnoj relativnoj količini u listovima *I. pumila*.

Prikazani su procentualni udeli proteina toplotnog stresa (Hsp) i antioksidativnih enzima u listu *I. pumila* u dve temperaturne sredine: (**A.**) izvan OTC-a i (**B.**) unutar OTC-a, tokom dve sezone i dve uzastopne godine. ■ Hsp ■ Antioksidativni enzimi. G – godina; S – sezona.

4.1.8. Uticaj mikroklimatskih parametara na anatomsko-morfološke i biohemijske osobine lista *I. pumila*

Kako bi se procenila povezanost između mikroklimatskih uslova i ispitivanih anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila*, primenjena je robusna regresiona analiza. Pošto je poznato da sredinski uslovi tokom razvića lista oblikuju njegove anatomsko-morfološke osobine, u ovim istraživanjima analizirana je zavisnost SLA, LDMC, SLWC i LT od prosečnih temperatura vazduha zabeleženih od početka razvića lista do trenutka uzorkovanja (T_{VDL}). Regresiona analiza utvrdila je značajnu pozitivnu vezu između LDMC i T_{VDL} tokom celog eksperimentalnog perioda, u oba temperaturna tretmana (b = 0,0063 izvan OTC-a i b = 0,0057 unutar OTC-a, obe $P < 0,0001$). Nasuprot tome, značajna negativna povezanost utvrđena je između LT i T_{VDL} (b = –0,0010 i b = -0,0009, obe $P < 0,0001$), kao i između SLWC i T_{VDL} (b = -0,0011 i b = -0,0009, obe $P < 0,0001$), nezavisno od temperaturnog tretmana. Ovi rezultati ukazuju da porast prosečne temperature vazduha tokom razvića lista dovodi do povećanja sadržaja suve materije, uz istovremeno smanjenje debljine lista i sadržaja vode. Za razliku od ostalih analiziranih anatomsko-morfoloških osobina lista, za SLA nije utvrđena statistički značajna povezanost sa T_{VDL} ni u jednom od temperaturnih tretmana.

Za razliku od anatomsko-morfoloških osobina koje predstavljaju dugoročan, integrisan odgovor lista na uslove sredine tokom njegovog razvića, biohemijske osobine, poput relativne količine Hsp i antioksidativnih enzima, odražavaju kratkoročan odgovor lista i brzo se menjaju usled promena sredinskih faktora. Zbog toga je ispitivana njihova povezanost savrednostima abiotičkih parametara u trenutku uzorkovanja listova (T_L, T_Z i V_Z) tokom celog

eksperimentalnog perioda. Utvđena je značajna pozitivna povezanost između T_L i relativne količine Hsp70, Hsp17.6a i Hsp17.6b u oba temperaturna tretmana (Hsp70: b = 0,0456, *P* = 0,0017 i b = 0,0694, *P* < 0,0001; Hsp17.6a: b = 0,1038, *P* = 0,0001 i b = 0,1454, *P* < 0,0001; Hsp17.6b: b = 0,1291, *P* = 0,0004 i b = 0,1922, *P* = 0,0004, izvan i unutar OTC-a). Suprotno tome, značajna pozitivna veza između T_L i relativne količine Hsp101 utvrđena je isključivo kod biljaka razvijenih na povišenoj temperaturi (unutar OTC-a) (b = 0,1197, *P* < 0,0001). Ovi rezultati ukazuju na to da se relativna količina Hsp povećava sa porastom temperature lista, dok izostanak značajne veze između T_L i Hsp101 u ambijentalnim uslovima (izvan OTC-a) može ukazivati na viši temperaturni prag njegove aktivacije u odnosu na ostale šaperone.

Značajna pozitivna veza utvrđena je između T_L i APXb (b = 0,0332 izvan OTC-a i b = 0,0396 unutar OTC-a, obe *P* < 0,0001) kao i između T_L i MnSOD (b = 0,0413, *P* = 0,0017 izvan OTC-a i b = 0,0316, *P* = 0,0048, unutar OTC-a). Nasuprot tome utvrđena je negativna veza T_L i izoforme Cu/ZnSODc, u oba temperaturna tretmana (b = – 0,0950, *P* = 0,0006 i b = – 0,1167, *P* < 0,0001). Regresiona analiza nije pokazala statistički značajnu vezu između T_L i ostalih analiziranih antioksidativnih enzima (CAT, APXa, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb), ni u jednom od temperaturnih tretmana. Različiti obrasci i smerovi asocijacije između T_L i količine antioksidativnih enzima ukazuju na specifičan temperaturni odgovor enzimskih komponenti antioksidativnog sistema u listovima *I. pumila*.

Posmatrajući uticaj temperature zemljišta (T_Z), utvrđena je značajna pozitivna veza između T_Z i svih ispitivanih Hsp u oba temperaturna tretmana (Hsp101: b = 0,0676 i b = 0,1254; Hsp70: b = 0,0491 i b = 0,0607; Hsp17.6a: b = 0,0994 i b = 0,1509; Hsp17.6b: b = 0,1027 i b = 0,1545, izvan i unutar OTC-a, sve *P* < 0,0001). Ovi rezultati sugerišu da relativna količina Hsp u listovima raste sa porastom temperature zemljišta, pri čemu je ovaj odgovor izraženiji pod uslovima eksperimentalno povišene temperature. Slično, značajna pozitivna veza utvrđena je između T_Z i APXb, kao i između T_Z i MnSOD (APXb: b = 0,0310 i b = 0,0431, izvan i unutar OTC-a, obe *P* < 0,0001; MnSOD: b = 0,0311 i b = 0,0342, obe *P* < 0,0001). Nasuprot tome, T_Z je bila negativno povezana sa količinom Cu/ZnSODc i CAT i to sa Cu/ZnSODc u oba temperaturna tretmana (b = -0,0963 i b = -0,0994 obe *P* < 0,0001), a sa CAT samo na povišenoj temperaturi (unutar OTC-a) (b = -0,0291, *P* = 0,0470). Robusna regresiona analiza nije pokazala značajnu vezu između T_Z i ostalih ispitivanih antioksidativnih enzima (APXa, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb) ni u jednom temperaturnom tretmanu (sve *P* > 0,05). Ovi rezultati sugerišu da su visoke temperature lista i zemljišta tokom leta doprinele povećanju relativne količne APXb i MnSOD, i smanjenju relativne količine Cu/ZnSODc (Tabela 4.1.15).

Što se tiče vlažnosti zemljišta (V_Z), utvrđena je značajna negativna veza između V_Z i Hsp70 u oba temperaturna tretmana (b = - 0,0507, *P* = 0,0148, i b = -0,0606, *P* = 0,0082, izvan i unutar OTC-a, redom), i između V_Z i Hsp17.6b (b = -0,1254, *P* = 0,0021, i b = -0,2259, obe *P* < 0,0001) Negativna veza između V_Z i količine Hsp17.6a bila je značajna samo na povišenoj temperaturi (unutar OTC-a) (b = -0,1108, *P* = 0,0126), dok je na ambijentalnoj temperaturi (izvan OTC-a) bila marginalno značajna (b = -0,0653, *P* = 0,0566). Veza između V_Z i količine Hsp101 nije bila značajna ni u jednom temperaturnom tretmanu. Ovi rezultati ukazuju da smanjena vlažnost zemljišta doprinosi povećanju Hsp70 i Hsp17.6b, dok povećanje Hsp17.6a u primećeno pri povišenoj temperaturi sugeriše međuzavisnost temperature i vlažnosti zemljišta u regulaciji eksperesije ovog šaperona. Negativna veza sa V_Z utvrđena je za APXb (b = –0,0435, *P* = 0,0007 i b = –0,0403, *P* = 0,0105) i MnSOD (b = –0,0636, *P* = 0,0003 i b = –0,0407, *P* = 0,0386), u oba temperaturna tretmana. Za CAT ova negativna povezanost bila je značajna izvan OTC-a (b = –0,0813, *P* = 0,0025), a marginalno značajna unutar OTC-a (b = –0,0621, *P* = 0,0577). Veza između V_Z i ostalih analiziranih antioksidativnih enzima (APXa, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc) nije bila značajna ni u jednom od temperaturnih tretmana.

4.2. Fenotipski odgovori funkcionalnih i mehaničkih osobina lista *I. pumila* na povećanje ambijentalne temperature *ex situ*

4.2.1. Variranje funkcionalnih i mehaničkih osobina lista u odnosu na temperaturu

U cilju procene fenotipskih odgovora funkcionalnih i mehaničkih osobina lista na porast temperature, vrednosti SLA, LDMC, SLWC, LT, SD i I_1 su određene kod istih genotipova *I. pumila* koji su gajeni *ex situ*, na dve različite temperature – kontrolnoj i povišenoj za 1 °C. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$), odgovarajuće standardne greške (SE) i koeficijenti varijacije (CV%) za funkcionalne (SLA, LDMC) i mehaničke (SLWC, LT, SD, I_1) osobine lista prikazane su u Tabeli 4.2.1. Kao što se može primetiti, prosečne vrednosti svih analiziranih osobina lista menjale su se sa promenom temperature vazduha. Kada su u pitanju funkcionalne osobine lista, prosečna vrednost SLA bila je viša (do 9 %) a prosečna vrednost LDMC niža (oko 3 %) za listove koji su se razvijali na povišenoj temperaturi u poređenju sa listovima istih genotipova koji su se razvijali na kontrolnoj temperaturi. Što se tiče mehaničkih osobina lista, prosečne vrednosti SLWC i LT su opadale sa porastom temperature (oko 6 %), dok su vrednosti SD i I_1 rasle (i to do 23 %, odnosno čak 67 %). (Tabela 4.2.1; Slika 4.2.1). Rezultati analize varijanse sa ponovljenim merenjima potvrdili su da su uočene promene sa povećanjem temperature bile statistički značajne (Tabela 4.2.2). Za mehaničke osobine utvrđen je visok nivo statističke značajnosti ($P < 0{,}0001$), dok su za funkcionalne osobine te razlike bile izrazito značajne za SLA ($P < 0{,}0001$), a blizu praga značajnosti za LDMC ($P = 0{,}0335$).

Tabela 4.2.1. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SE) i koeficijenti varijacije (CV%) funkcionalnih i mehaničkih osobina lista istih klonalnih genotipova *I. pumila* (N=40) gajenih na dve temperature, kontrolnoj i povišenoj (za 1 °C), *ex situ*. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Osobine lista	Kontrolna temperatura (T_K)			Povišena temperatura (T_P)		
	$\bar{X}$	SE	CV%	$\bar{X}$	SE	CV%
Funkcionalne						
SLA	186,4	3,5	11,9	202,3	2,8	8,7
LDMC	0,2066	0,0026	7,9	0,2014	0,0016	4,9
Mehaničke						
SLWC	0,0209	0,0003	9,3	0,0197	0,0003	9,4
LT	0,0263	0,0004	9,2	0,0247	0,0004	9,0
SD	72,8	1,2	10,6	89,5	1,6	11,6
I_1	21,3	1,5	44,3	35,5	2,6	47,1

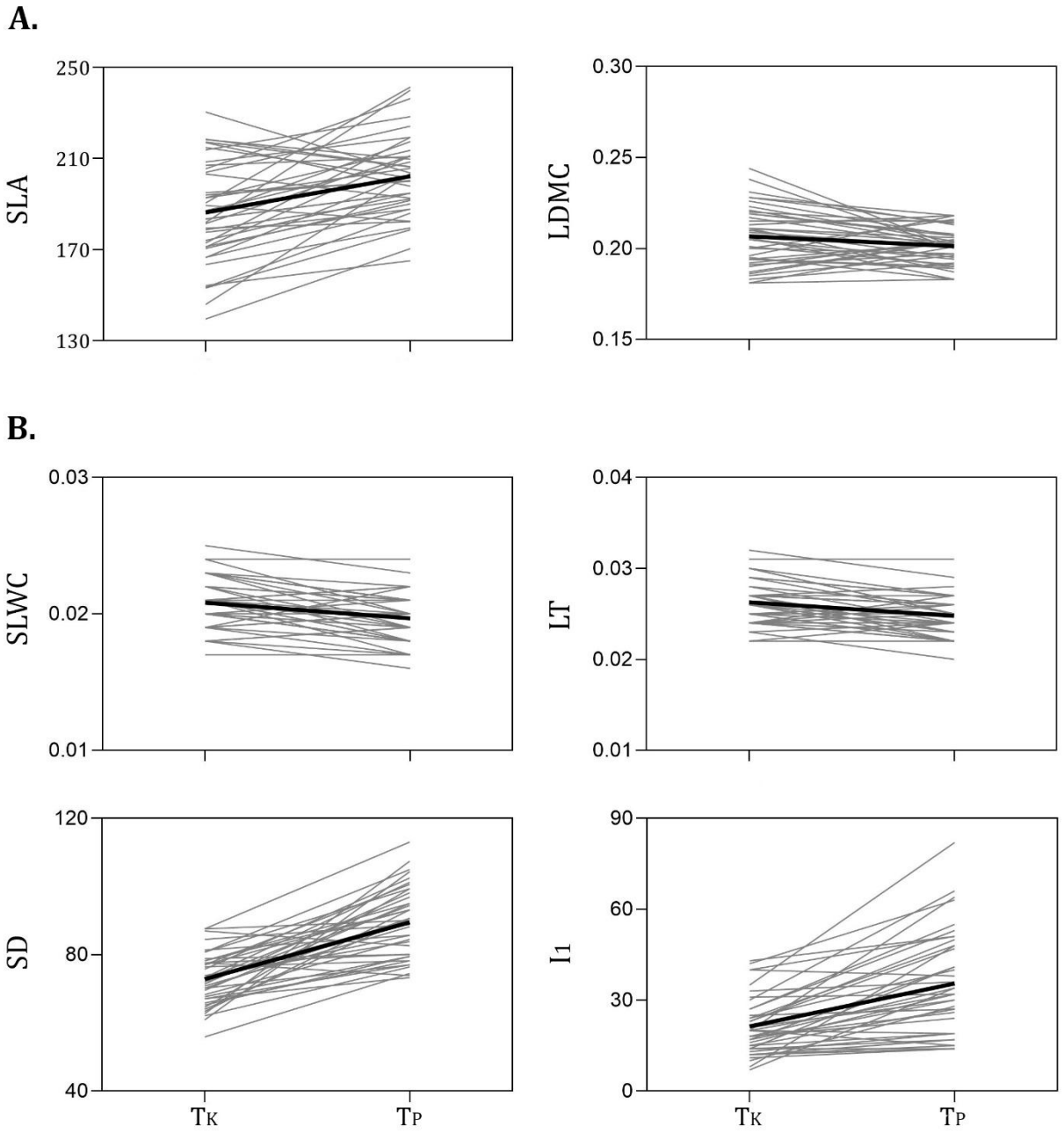
Na Slici 4.2.1. prikazane su norme reakcije funkcionalnih i mehaničkih osobina lista ispoljene na kontrolnoj i povišenoj temperaturi. Kao što se može videti, prosečne norme reakcije bile su relativno strme, što ukazuje na sposobnost vrste *I. pumila* da prilagodi morfologiju i fiziologiju lista temperaturnim uslovima. Obrazac prosečnih normi reakcije pokazao se specifičnim za svaku osobinu. Tako su, prosečne norme reakcije za SLA, SD i I_1 ispoljile rastući trend sa porastom temperature, dok su norme reakcije za LDMC, SLWC i LT imale opadajući trend (Slika 4.2.1.). Norme reakcije pojedinačnih genotipova pokazale su složen obrazac, pri čemu su se norme nekih genotipova ukrštale, što ukazuje na to da su se, osim fenotipskih vrednosti, menjali

i relativni rangovi osobina pri različitim temperaturama. Dodatno, uočen je trend konvergencije normi reakcije za LDMC i I_1. Norme reakcije za LDMC konvergirale su ka jednoj vrednosti na povišenoj temperaturi dok su se na kontrolnoj temperaturi njihove fenotipske vrednosti više razlikovale. Nasuprot tome, norme reakcije za I_1 konvergirale su ka jednoj vrednosti na kontrolnoj temperaturi, dok su na povišenoj temperaturi divergirale (Slika 4.2.1).

Individualno variranje genotipova *I. pumila*, izraženo preko koeficijenta varijacije (CV%), zavisilo je od posmatrane osobine i temperature **(**Tabela 4.2.1). Generalno, funkcionalne osobine lista ispoljile su manje variranje u poređenju sa mehaničkim osobinama. Osim toga, funkcionalne osobine su imale veći CV% na kontrolnoj temperaturi, dok su mehaničke osobine imale veći CV% na povišenoj temperaturi. Najveće vrednosti CV% zabeležene su za I_1 (44,3 % na kontrolnoj i 47,1 % na povišenoj temperaturi) a najniže za LDMC (7,9 % na kontrolnoj i 4,9 % na povišenoj temperaturi) (Tabela 4.2.1). Iako su vrednosti CV% za SLA, LDMC i LT bile veće na kontrolnoj, a za SLWC, SD i I_1 na povišenoj temperaturi, rezultati *F*-testa za jednakost varijansi pokazali su statistički značajne razlike između temperaturnih tretmana samo za LDMC (F = 2,67, P = 0,0028) i I_1 (F = 0,32, P = 0,0006).

Tabela 4.2.2. Rezultati analize varijanse ponovljenih meranja (ANOVAR) funkcionalnih i mehaničkih osobina lista. Prikazani su stepeni slobode (df), prosek kvadrata odstupanja od srednje vrednosti ispitivanih osobina (MS), *F*-vrednosti i statistička značajnost (*P*). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Osobine lista	**Tretman**				**Greška**	
	df	MS	F	*P*	df	MS
Funkcionalne						
SLA	1	5055,72	24,63	**<,0001**	39	205,23
LDMC	1	0,0006	4,86	**0,0335**	39	0,0001
Mehaničke						
SLWC	1	0,00002	18,95	**<,0001**	39	0,0000
LT	1	0,0001	25,37	**<,0001**	39	0,0000
SD	1	5589,68	83,89	**<,0001**	39	66,63
RGB indeks I_1	1	4004,45	45,14	**<,0001**	39	88,71



Slika 4.2.1. Variranje funkcionalnih i mehaničkih osobina lista klonalnih genotipova *I. pumila* u dve različite temeraturne sredine *ex situ*

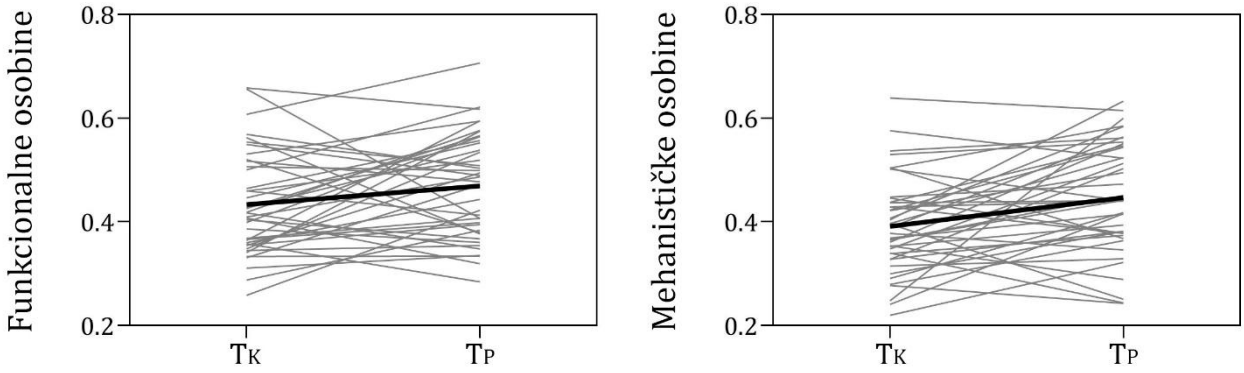
Prikazane su norme reakcije pojedinačnih klonalnih genotipova *I. pumila* (*N* = 40; tanke linije) na kontrolnoj (T_K) i povišenoj (T_P) temperaturi. Prosečne norme reakcije prikazane su debljim linijama. (**A.**) Funkcionalne osobine lista**:** SLA i LDMC; (**B.**) Mehaničke osobine lista**:** SLWC, LT, SD i RGB indeks I_1**.** Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.2.

Osim što su analizirane pojedinačno, funkcionalne i mehaničke osobine lista su dodatno analizirane i kao celovite kategorije. U Tabeli 4.2.3. prikazane su prosečne vrednosti ($\bar{X}$), odgovarajuće standardne greške (SE) i koeficijenti varijacije (CV%) za svaku od analiziranih kategorija osobina. Zapaža se da su prosečne vrednosti obe kategorije osobina bile više (do 8 % za funkcionale, odnosno 14 % za mehaničke) kod rameta koji su se razvijali na povišenoj temperaturi u poređenju sa onima koji su se razvijali na kontrolnoj temperaturi (Tabela 4.2.3; Slika 4.2.2). Rezultati analize varijanse sa ponovljenim merenjima potvrdili su da su ove razlike bile statistički značajne (P = 0,0456 i P = 0,0018, redom; Tabela 4.2.4).

Tabela 4.2.3. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SE) i koeficijenti varijacije (CV%) funkcionalnih i mehaničkih kategorija osobina lista istih klonalnih genotipova *I. pumila* (n = 40), gajenih na dve temperature, kontrolnoj i povišenoj (za 1 °C), *ex situ*.

	Kontrolna temperatura (T_K)			**Povišena temperatura (T_P)**		
Kategorija osobina	$\bar{X}$	SE	CV%	$\bar{X}$	SE	CV%
Funkcionalna	0,4334	0,02	22,9	0,4693	0,02	21,5
Mehanistička	0,3914	0,02	23,6	0,4469	0,02	23,9

Na Slici 4.2.2. prikazane su norme reakcije funkcionalnih i mehaničkih kategorija osobina lista pojedinačnih genotipova *I. pumila* ispoljene na kontrolnoj i povišenoj temperaturi, kao i prosečne norme reakcije za svaku od ovih kategorija. Jasno se može uočiti da su nivoi prosečnih normi rekacije za obe kategorije osobina bili viši na povišenoj temperaturi u odnosu na kontrolnu temperaturu.



Slika 4.2.2. Variranje funkcionalnih i mehaničkih kategorija osobina lista *I. pumila* u dve temeraturne sredine *ex situ*.

Normalizovane vrednosti za svaku osobinua pojedinačnih klonalnih genotipova *I. pumila* (N = 40) grupisane u dve kategorije: funkcionalne (SLA i LDMC) i mehaničke (SLWC, LT, SD, RGB indeks I_1). Prikazane su norme reakcije pojedinačnih genotipova (tanke linije) na kontrolnoj (T_K) i povišenoj (T_P) temperaturi, dok su prosečne norme reakcije prikazane debljom linijom. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.2.

Tabela 4.2.4. Rezultati analize varijanse ponovljenih meranja (ANOVAR) kategorija funkcionalnih i mehaničkih osobina lista. Prikazani su stepeni slobode (df), prosek kvadrata odstupanja od srednje vrednosti ispitivanih osobina (MS), *F*-vrednosti i statistička značajnost (*P*).

Kategorija osobina	Tretman				Greška	
	df	MS	F	*P*	df	MS
Funkcionalna	1	0,0258	4,26	**0,0456**	39	0,0061
Mehanistička	1	0,0615	11,22	**0,0018**	39	0,0055

Što se tiče vrednosti koeficijenata varijacije funkcionalnih i mehaničkih kategorija osobina, one su generalno bile slične iako je funkcionalna kategorija osobina pokazala nešto niži CV%, kako na kontrolnoj tako i na povišenoj temperaturi (Tabela 4.2.3). Osim toga, funkcionalna kategorija osobina ispoljila je viši a mehanistička niži CV% na kontrolnoj nego na povišenoj temperaturi. Međutim, rezultati *F*-testa za jednakost varijansi pokazali su da se CV% za funkcionalnu i mehaničku kategoriju nisu značajno razlikovali između temperaturnih tretmana (obe $P > 0,05$). Ovi rezultati ukazuju na to da na nivou kategorija, temperaturni tretman ne utiče na količinu variranja fenotipskog odgovora osobina.

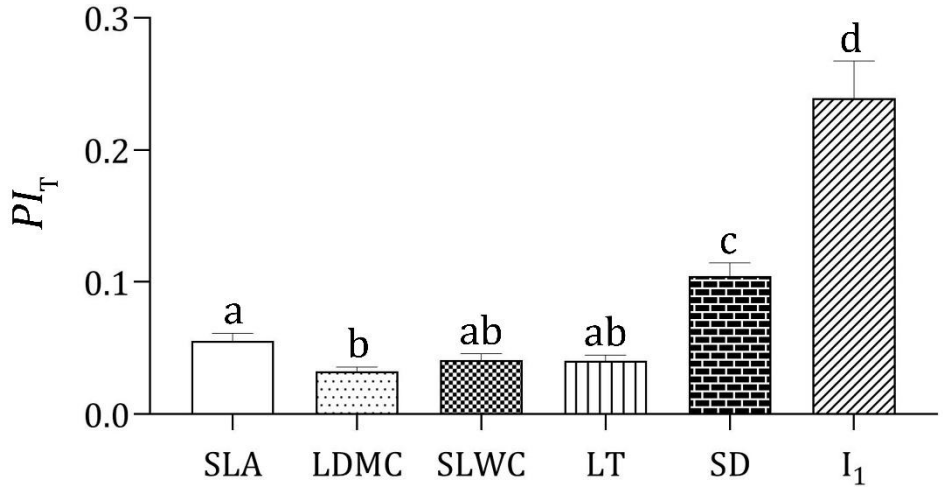
4.2.2. Fenotipska plastičnost funkcionalnih i mehaničkih osobina lista

Kvantitativne vrednosti indeksa plastičnosti ispitivanih fenotipskih osobina lista genotipova *I. pumila* između dva različita temperaturna tretmana prikazane su na Slici 4.2.3. Prosečan nivo fenotipske plastičnosti bio je nizak i zavisio je od analizirane osobine (Slika 4.2.3). Generalno, funkcionalne osobine su se pokazale manje plastičnim u odnosu na mehaničke (*PI* = 0,044 naspram *PI* = 0,106). Od svih analiziranih osobina, najplastičnije su bile I_1 i SD (*PI* = 0,239, odnosno *PI* = 0,104), dok je najmanju plastičnost pokazala LDMC (*PI* = 0,032). Srednji nivo plastičnosti zabeležen je za SLA, SLWC i LT (*PI* = 0,055, *PI* = 0,041 i *PI* = 0,040, redom). Rezultati Fridmanove ANOVE potvrdili su da se nivo plastičnosti značajno razlikovao između analiziranih osobina lista ($\chi^2(5, N = 240) = 72,11$, $P < 0,0001$) (Slika 4.2.3).

4.2.3. Fenotipska integracija funkcionalnih i mehaničkih osobina lista *I. pumila*

Stepen fenotipskih asocijacija između parova osobina lista unutar svakog temperaturnog tretmana procenjen je na osnovu veličine Pirsonovog koeficijenta korelacije. Vizualizacija korelacionih matrica ostvarena je putem toplotnih mapa (engl. *heat maps*), koje su prikazane na Slici 4.2.4. U okviru svakog temperaturnog tretmana broj značajnih korelacija bio je veći od polovine ukupnog broja korelacija. Najjača pozitivna korelacija među svim parovima osobina lista bila je ona između SLWC i LT (r = 0,976 i r = 0,986, na kontrolnoj i povišenoj temperaturi, obe $P < 0,0001$). Korelacija između SLA i I_1 bila pozitivna i umerene jačine (r = 0,525 i r = 0,546, na kontrolnoj i povišenoj temperaturi, obe $P < 0,001$). Negativna korelacija umerene jačine zabeležena je između SLA i LT (r = -0,760 i r = -0,667, na kontrolnoj i povišenoj temperaturi, obe $P < 0,0001$) kao i između SLA i SLWC (r = -0,604 i r = -0,568, na kontrolnoj i povišenoj temperaturi, obe $P < 0,0001$). Najslabija negativna korelacija bila je ona uočena između LDMC i I_1 (r = -0,322, $P = 0,04$ i r = -0,353, $P = 0,02$, na kontrolnoj i povišenoj temperaturi) (Slika 4.2.4).

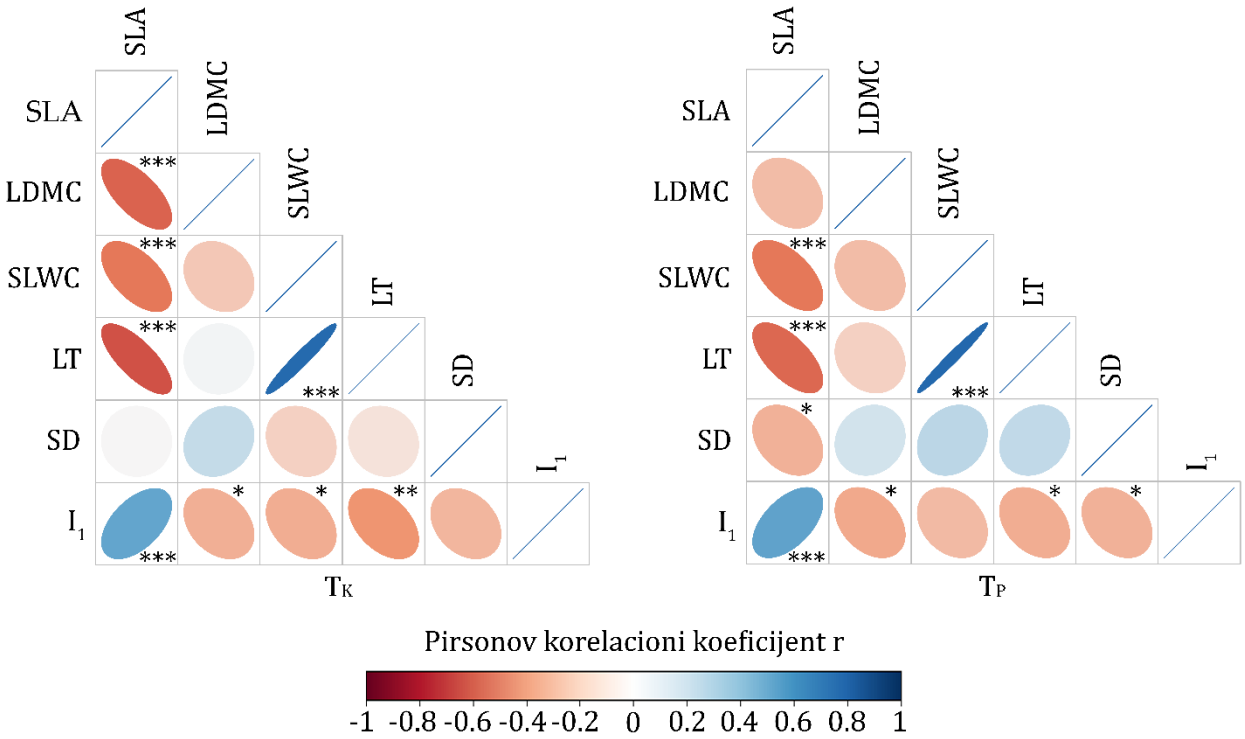
Iako je ukupan broj značajnih fenotipskih korelacija bio jednak u oba temperaturna tretmana (2 pozitivne i 6 negativnih), različita struktura korelacija mogla bi da ukaže na moguće razlike u obrascima međusobne povezanosti osobina (Slika 4.2.4). Tako su, isključivo na kontrolnoj temperaturi utvrđene značajne korelacije između SLA i LDMC (r = -0,663, $P < 0,0001$) kao i između SLWC i I_1 (r = -0,345, $P = 0,03$), dok su na povišenoj temperaturi utvrđene značajne korelacije između SLA i SD (r = -0,318, $P = 0,04$) i između SD i I_1 (r = -0,317, $P = 0,04$). Međutim, uočene razlike nisu bile dovoljno snažne da bi se korelacioni obrasci između osobina lista utvrđeni na kontrolnoj i povišenoj temperaturi značajno razlikovali, što je potvrđeno Mantelovim testom (r = 0,902, $P < 0,01$).



Slika 4.2.3. Indeksi fenotipske plastičnosti funkcionalnih i mehanističkih osobina lista *I. pumila* između dve različite temperaturne sredine *ex situ.*

Prikazane su prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SE) indeksa fenotipske plastičnosti (PI_T) za funkcionalne (SLA, LDMC) i mehanističke (SLWC, LT, SD, RGB indeks I_1) osobine lista klonalnih genotipova *Iris pumila* ($N = 40$), izračunate između kontrolne i povišene temperature. Različitim slovima označene su prosečne vrednosti koje se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$; videti Materijal i metode). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.2.

Pored korelacione analize pojedinačnih funkcionalnih i mehanističkih osobina lista, svaka kategorija osobina analizirana je takođe i kao celina. Za obe kategorije utvrđena je pozitivna korelacija između vrednosti izmerenih u dva temperaturna tretmana (funkcionalne: r = 0,394, $P = 0,012$; mehanističke: r = 0,508, $P = 0,0008$). Istovremeno, ove dve kategorije bile su međusobno negativno korelisane kako na kontrolnoj (r = -0,767, $P < 0,0001$), tako i na povišenoj temperaturi (r = -0,437, $P = 0,0049$).Dodatno, analizirana je i korelisanost samih indeksa plastičnosti ispitivanih osobina lista. Snažna i visoko značajna pozitivna korelacija utvrđena je između indeksa plastičnosti za SLWC i LT ($\rho = 0,935$, $P < 0,0001$). Umereno jaka pozitivna korelacija uočena je između indeksa plastičnosti za SLA i I_1 ($\rho = 0,378$, $P = 0,016$), kao i između SLA i LT ($\rho = 0,322$, $P = 0,043$), dok je slaba pozitivna korelacija uočena između LDMC i I_1 ($\rho = 0,174$, $P = 0,049$).



Slika 4.2.4. Toplotne mape korelacija između parova funkcionalnih i mehaničkih osobina lista *I. pumila* u dve temeraturne sredine *ex situ*.

Prikazani su Pirsonovi koeficijenti korelacije (r) između parova funkcionalnih (SLA i LDMC) i mehaničkih (SLWC, LT, SD i RGB indeks I_1) osobina lista klonalnih genotipova *I. pumila* (N = 40), na kontrolnoj (T_K) i povišenoj (T_P) temperaturi. Gradijent boje označava smer i jačinu korelacije, dok izduženost elipse odražava jačinu korelacije. Statistička značajnost korelacija označena je zvezdicama: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.2.

4.3. Fenologija cvetanja, reproduktivni uspeh i adaptivna vrednost *I. pumila* u različitim temperaturnim sredinama *in situ*

4.3.1. Fenologija cvetanja

Kako bi se ispitao uticaj povišene temperature na fenologiju cvetanja, analizirano je šest parametara: ukupan broj cvetova, broj cvetova po genotipu, procenat cvetalih genotipova, dan pojave prvog cveta (T0), prosečan dan otvaranja cvetova i trajanje centralnog perioda cvetanja (T90–T10). Parametri su određeni kod istih klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije, čiji su se rameti razvijali izvan i unutar OTC-a, tokom šestnaestodnevnog perioda cvetanja u proleće 2019 godine. Deskriptivne vrednosti parametara fenologije cvetanja prikazane su u Tabeli 4.3.1, a dnevna dinamika otvaranja cvetova na Slici 4.3.1. Između rameta razvijenih izvan i unutar OTC-a uočeni su različiti obrasci parametara fenologije cvetanja, koji su zavisili od analiziranog parametra i populacije. Rameti koji su se razvijali izvan OTC-a imali su veći ukupan broj cvetova i veći broj cvetova po genotipu u odnosu na ramete koji su se razvijali unutar OTC-a, u obe populacije. Iako je obrazac bio isti, razlika u broju cvetova između dva temperaturna tretmana bila je izraženija u Populaciji 2 (Tabela 4.3.1. i Slika 4.3.1). Kada su obe populacije posmatrane zajedno, proporcija genotipova koji su cvetali bila je slična između temperaturnih tretmana, dok su se obrasci razlikovali između populacija. U Populaciji 1

proporcija genotipova koji su cvetali bila je veća unutar OTC-a, dok je u Populaciji 2 bila veća izvan OTC-a. Početak cvetanja (T0) bio je raniji kod rameta koji su se razvijali unutar OTC-a nego kod onih izvan OTC-a, u obe populacije. Kada su populacije posmatrane zajedno, prosečan dan otvaranja cvetova bio je sličan između dva temperaturna tretmana, ali se obrazac odgovora razlikovao između populacija. U Populaciji 1 cvetovi su se, u proseku, otvarali ranije unutar OTC-a, dok su se u Populaciji 2 otvarali neznatno kasnije unutar OTC-a nego izvan njih (Tabela 4.3.1. i Slika 4.3.1). Trajanje centralnog perioda cvetanja (T90-T10), odnosno perioda tokom kojeg se otvorilo 80 % ukupnog broja cvetova, bilo je slično između temperaturnih sredina u obe populacije, uz male razlike suprotnog smera između populacija (Tabela 4.3.1).

Na Slici 4.3.2. prikazane su prosečne kumulativne krive dinamike cvetanja za ramete razvijene izvan i unutar OTC-a, pri čemu je dinamika cvetanja izražena kao procenat ukupnog broja cvetova otvorenih do određenog dana cvetanja. Krive su prikazane za svaku populaciju zasebno i za obe populacije zajedno. Tokom centralnog dela perioda cvetanja u Populaciji 1 veći deo ukupnog broja cvetova bio je otvoren ranije kod rameta unutar OTC-a nego kod rameta izvan OTC-a, dok je u Populaciji 2 uočen suprotan obrazac. Kada su obe populacije posmatrane zajedno, kumulativne krive dinamike cvetanja za dva temperaturna tretmana najvećim delom su se preklapale (Slika 4.3.2).

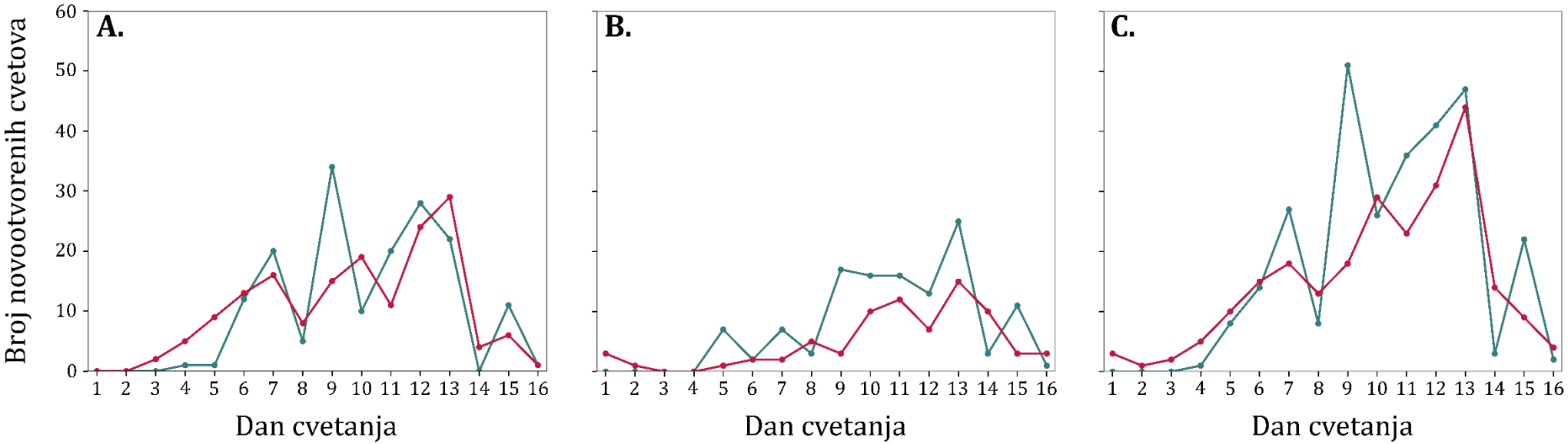
Rezultati mešovitih modela za efekte temperaturnog tretmana, populacije i njihove interakcije na analizirane parametre fenologije cvetanja, uključujući verovatnoću cvetanja kao modelsku procenu pojave cvetanja prethodno prikazane procentom cvetalih genotipova, prikazani su u Tabeli 4.3.2. Glavni efekat temperaturnog tretmana, procenjen prosečno za obe populacije, nije bio statistički značajan za ukupan broj cvetova, verovatnoću cvetanja, prosečan dan cvetanja ni trajanje centralnog perioda cvetanja. Ipak, za ukupan broj cvetova efekat tretmana bio je marginalno značajan (P = 0,052), pri čemu je očekivani broj cvetova bio manji unutar OTC-a nego izvan njega (IRR = 0,77). Ovaj rezultat ukazuje na trend smanjenja očekivanog broja cvetova unutar OTC-a za 23 % u odnosu na broj cvetova izvan OTC-a, prosečno za obe populacije. Efekat populacije bio je statistički značajan za ukupan broj cvetova (P = 0,024) i trajanje centralnog perioda cvetanja T90-T10 (P = 0,005). Očekivani broj cvetova bio je veći u Populaciji 1 nego u Populaciji 2 (IRR = 1,76), dok je centralni period cvetanja u Populaciji 1 trajao prosečno 1,49 dana duže nego u Populaciji 2. Nasuprot tome, populacije se nisu statistički značajno razlikovale u verovatnoći cvetanja (P = 0,271) ni u prosečnom danu cvetanja (P = 0,167). Efekat interakcije T x P bio je statistički značajan za prosečan dan cvetanja (P = 0,008) i marginalno značajan za verovatnoću cvetanja (P = 0,067), dok za ukupan broj cvetova i trajanje centralnog perioda cvetanja nije bio statistički značajan. Dobijeni rezultati ukazuju da se efekat temperaturnog tretmana na prosečan dan cvetanja razlikovao između populacija i sugerišu sličan trend za verovatnoću cvetanja**.** Kontrasti između temperaturnih tretmana unutar pojedinačnih populacija uglavnom nisu bili statistički značajni. Jedini statistički značajan kontrast utvrđen je u Populaciji 1 za prosečan dan cvetanja (P *adj.* = 0,004), pri čemu su rameti razvijeni unutar OTC-a cvetali prosečno 1,19 dana ranije od rameta razvijenih izvan OTC-a**.** Za ukupan broj cvetova u Populaciji 2 rezultati ukazuju na trend smanjenja očekivanog broja cvetova unutar OTC-a za 34 % u odnosu na broj cvetova izvan OTC-a (P *adj.* = 0,081; IRR = 0,66).

Rezultati negativno-binomnog GAMM-a za ukupnu dnevnu dinamiku cvetanja prikazani su u Tabeli 4.3.3, dok su modelovane krive dnevne dinamike cvetanja prikazane na Slici 4.3.3. U konačnom punom modelu osnovni oblik krive cvetanja bio je statistički značajan u obe populacije (P < 0,0001 i P = 0,0002 za Populaciju 1 i Populaciju 2, redom), što ukazuje da se broj novootvorenih cvetova nelinearno menjao tokom perioda cvetanja (Tabela 4.3.3.A i Slika 4.3.3A i B). Promena oblika krive cvetanja usled temperaturnog tretmana nije bila statistički značajna

ni u jednoj populaciji. Ipak, u Populaciji 1 uočen je trend razlike u obliku krive cvetanja između rameta razvijenih izvan i unutar OTC-a (P = 0,093)**,** dok u Populaciji 2 takav trend nije uočen (P = 0,863) (Tabela 4.3.3.A). Rezultati kontrasta celih modelovanih krivih cvetanja (Tabela 4.3.3.B) pokazali su da se krive cvetanja nisu statistički značajno razlikovale između temperaturnih tretmana ni prosečno za obe populacije (P = 0,244), niti unutar Populacije 1 (P = 0,256) i Populacije 2 (P = 0,453). Nasuprot tome, utvrđena je statistički značajna razlika u ukupnoj dinamici cvetanja između populacija, prosečno za oba temperaturna tretmana (P = 0,012). Interakcija temperaturnog tretmana i populacije nije bila statistički značajna (P = 0,339) (Tabela 4.3.3.B). Na Slici 4.3.3 može se uočiti da su modelovane krive cvetanja u obe populacije pokazivale porast broja novootvorenih cvetova tokom početnog i srednjeg dela perioda cvetanja, nakon čega je njihov broj opadao. U Populaciji 1, kriva cvetanja rameta razvijenih unutar OTC-a pokazivala je raniji porast, dok je kod rameta razvijenih izvan OTC-a bio izraženiji kasniji maksimum. U Populaciji 2, modelovane krive cvetanja bile su međusobno sličnije, uz veće vrednosti kod rameta razvijenih izvan OTC-a tokom centralnog dela perioda cvetanja. Kada su populacije objedinjene, takođe se uočava raniji porast krive cvetanja kod rameta razvijenih unutar OTC-a i izraženiji kasniji maksimum kod rameta razvijenih izvan OTC-a, ali kontrast između celih modelovanih krivih nije pokazao statistički značajnu razliku između temperaturnih tretmana (P = 0,244) (Slika 4.3.3. i Tabela 4.3.3.B).

Tabela 4.3.1. Deskriptivne vrednosti parametara fenologije cvetanja: ukupan broj cvetova, boj cvetova po genotipu [medijana (Q1–Q3)], proporcija cvetalih genotipova [n/N (%)], početak cvetanja (T0), prosečan dan cvetanja po genotipu ($\bar{X}$ ± SD) i trajanje centralog perioda cvetanja (T90-T10) [(medijana (Q1–Q3)] klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 34 i Populacija 2, *n* = 34), tokom 16 dana cvetanja u proleće 2019. godine, izvan i unutar OTC-a.

Parametar	**Populacija 1**		**Populacija 2**		**Obe populacije**	
	Izvan OTC-a	Unutar OTC-a	Izvan OTC-a	Unutar OTC-a	Izvan OTC-a	Unutar OTC-a
Ukupan broj cvetova	165	162	121	77	286	239
Broj cvetova po genotipu	4 (1,2 - 7)	3 (1,2 - 5)	2 (1 - 5)	1 (0 - 3)	3 (1 - 6,2)	2 (1 -5)
Proporcija cvetalih genotipova	27/34 (79,4 %)	30/34 (88,2 %)	28/34 (82,4 %)	23/34 (67,6 %)	55/68 (80,9 %)	53/68 (77,95)
T0	4	3	5	1	4	1
Prosečan dan otvaranja cvetova	10,5 ± 2,0	9,3 ± 2,0	10,4 ± 2,4	10,9 ± 2,7	10,4 ± 2,2	10,0 ± 2,4
T90-T10	4,0 (3 - 5)	3,5 (1,2 - 6)	1,5 (0 - 4)	2,0 (0 - 4)	3,0 (0,5- 5)	3,0 (0 - 5)

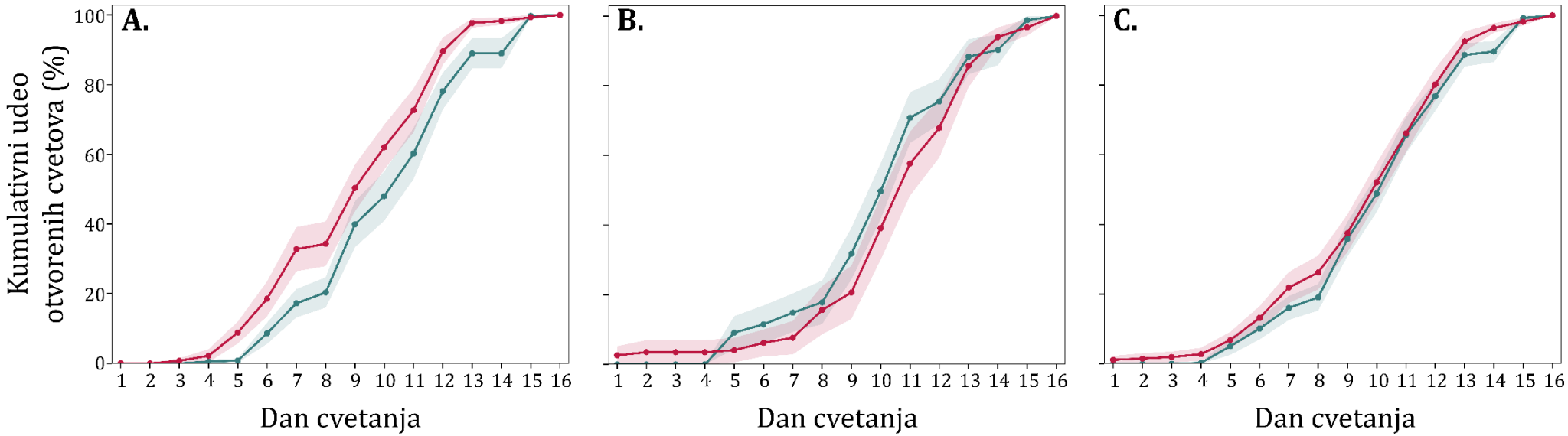


Slika 4.3.1. Dnevna dinamika cvetanja *I. pumila* u dve temperaturne sredine *in situ*.

Prikazan je ukupan broj novootvorenih cvetova zabeležen svakog dana cvetanja kod rameta *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 34; Populacija 2, *n* = 34), koji su se razvijali izvan OTC-a (zeleno) i unutar OTC-a (crveno) tokom proleća 2019. godine Prikazane su: (**A.**) Populacija 1, (**B.**) Populacija 2 i (**C.**)obe populacije zajedno. Linije povezuju uzastopne dnevne vrednosti.

Tabela 4.3.2. Rezultati mešovitih modela za efekte temperaturnog tretmana, populacije i njihove interakcije na parametre fenologije cvetanja: ukupan broj cvetova, verovatnoća cvetanja, prosečan dan cvetanja i trajanje centralnog perioda cvetanja (T90-T10) klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 34 i Populacija 2, *n* = 34), čiji su se rameti razvijali izvan i unutar OTC-a. Za broj cvetova i verovatnoću cvetanja efekat tretmana predstavljen je odnosom povišena/ambijentalna temperatura, a efekat populacije odnosom Populacija 1/Populacija 2. IRR (engl. *incidence rate ratio*) predstavlja odnos očekivanog broja cvetova, a OR (engl. *odds ratio*) odnos šansi za cvetanje. Za kontinuirane parametre efekti su izraženi kao razlike u danima (Δ), pri čemu je ona za T računata kao Δ=povišena- ambijentalna temperatura, a za P kao Δ= Populacija 1-Populacija 2. Vrednosti u zagradama predstavljaju pojedinačne intervale poverenja od 95%. Za kontraste tretmana unutar Populacije 1 i Populacije 2 prikazane su *P*-vrednosti korigovane Holmovom metodom. T90-T10 predstavlja broj dana između dostizanja 10% i 90% ukupnog broja cvetova pojedinačnog genotipa u svakom temperaturnom tretmanu.

		Tretman (T)		**Populacija(P)**		**T x P**	**Populacija 1: T**		**Populacija 2: T**	
Parametar	Model	Efekat	*P*	Efekat	*P*	*P*	Efekat	*P* (Holm)	Efekat	*P* (Holm)
Ukupan broj cvetova	NB2 GLMM	IRR=0,77 (0,59; 1,00)	0,052	IRR=1,76 (1,08; 2,87)	**0,024**	0,253	IRR=0,90 (0,64; 1,27)	0,544	IRR=0,66 (0,45; 0,98)	0,081
Verovatnoća cvetanja	Binomni GLMM	OR=0,89 (0,34; 2,33)	0,808	OR=1,93 (0,60; 6,21)	0,271	0,067	OR=2,17 (O,51; 9,24)	0,295	OR=0,36 (0,10; 1,37)	0,268
Prosećan dan cvetanja	LMM	Δ=-0,45 (-1,00; 0,10)	0,108	Δ=-0,73 (-1,77; 0,31)	0,167	**0,008**	Δ=-1,19 (-1,93; -0,44)	**0,004**	Δ=0,29 (-0,51; 1,09)	0,479
T90-T10	LMM	Δ=-0,25 (-1,03; 0,52)	0,521	Δ=1,49 (0,44; 2,54)	**0,005**	0,864	Δ=-0,19 (-1,25; 0,87)	1,000	Δ=-0,32 (-1,46; 0,82)	1,000



Slika 4.3.2. Kumulativne krive cvetanja *I. pumila* u dve temperaturne sredine *in situ*.

Prikazane su prosečne kumulativne krive cvetanja, izražene kao procenat ukupnog broja cvetova otvorenih do određenog dana cvetanja, kod rameta *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 34; Populacija 2, *n* = 34), koji su se razvijali izvan OTC-a (zeleno) i unutar OTC-a (crveno) tokom proleća 2019. godine. Prikazane su: (**A.**) Populacija 1 (*n* = 34), (**B.**) Populaciji 2 (*n* = 34) i (**C.**) obe populacije zajedno (*n* = 68). Linije predstavljaju prosečne vrednosti, a senčene oblasti ± 1 standardnu grešku.

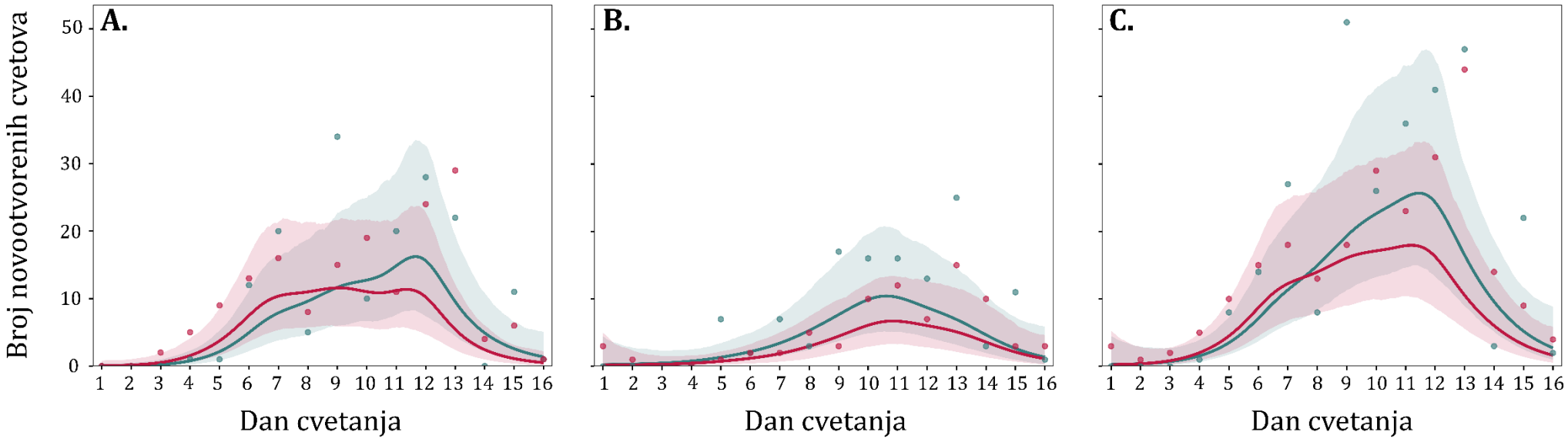
Tabela 4.3.3. Rezultati generalizovanog aditivnog mešovitog modela (GAMM) dnevne dinamike otvaranja cvetova klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 34 i Populacija 2, *n* = 34), praćenih izvan i unutar OTC-a tokom 2019. godine. Prikazani su članovi od interesa konačnog punog modela koji opisuju: (**A.**) oblk modelovane krive cvetanja i (**B.**) kontraste između celih modelovanih krivih cvetanja na nivou populacije i temperaturnog tretmana. edf - efektivni broj stepena slobode; Ref. df - referentni broj stepena slobode; χ^2 - test statistika za procenu značajnosti glatkog člana; T_{max}-maksimalno apsolutno standardizovano odstupanje između poređenih modelovanih krivih tokom čitavog perioda cvetanja.

A. Članovi konačnog punog modela

Efekat	Član formule	edf	Ref. df	χ^2	*P*
Osnovni oblik krive cvetanja- Populacija 1	$f1(t)$	5,138	6,013	44,025	**<0,0001**
Osnovni oblik krive cvetanja- Populacija 2	$f2(t)$	3,948	4,580	24,261	**0,0002**
Tretmanska promena oblika krive cvetanja - Populacija 1	$q1_j(t)$	1,000	1,001	2,832	0,093
Tretmanska promena oblika krive cvetanja - Populacija 2	$q2_j(t)$	1,616	1,939	0,234	0,863

B. Kontrasti između celih krivih cvetanja

Kontrast	T_{max}	*P*
Tretman (T)	1,947	0,244
Populacija (P)	3,303	**0,012**
T unutar Populacije 1	1,661	0,256
T unutar Populacije 2	1,601	0,453
T x P	1,747	0,339



Slika 4.3.3. Modelovane krive cvetanja *I. pumila* u dve temperaturne sredine *in situ*.

Prikazane su modelovane krive cvetanja kod rameta *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 34; Populacija 2, *n* = 34), koji su se razvijali izvan OTC-a (zeleno) i unutar OTC-a (crveno) tokom proleća 2019. godine. Prikazane su: (**A.**) Populacija 1, (**B.**) Populacija 2 i (**C.**) obe populacije zajedno. Pune linije predstavljaju očekivani broj novootvorenih cvetova po danu, modelovan negativno-binomnim GAMM-om, senčene oblasti 95% intervale poverenja, a tačke zabeleženi broj novootvorenih cvetova svakog dana. U panelu C modelovane vrednosti Populacije 1 i Populacije 2 sabrane su za svaki temperaturni tretman.

4.3.2. Reproduktivni uspeh

Deskriptivne vrednosti tri analizirana parametra reproduktivnog uspeha: proporcija oprašenih cvetova, broj razvijenih semena I masa razvijenih semena prikazane su u Tabeli 4.3.4. U obe populacije proporcija oprašenih cvetova bila je gotovo dvostruko veća izvan OTC-a nego unutar njega, a isti obrazac uočen je i kada su populacije posmatrane zajedno. Ovaj obrazac pokazuje da je proporcija oprašenih cvetova bila znatno niža unutar OTC-a, ali na osnovu ovih podataka nije moguće razdvojiti efekat povišene temperature od mogućeg uticaja OTC konstrukcije kao fizičke prepreke za posetu oprašivača cvetovima. Broj i masa razvijenih semena po čauri pokazali su različite obrasce između populacija. U Populaciji 1, oba parametra imala su više vrednosti kod rameta koji su se razvijali unutar OTC-a nego kod onih izvan OTC-a, dok je u Populaciji 2 uočen suprotan, ali manje izražen obrazac. Kada su populacije objedinjene, broj i ukupna masa razvijenih semena po čauri bili su veći kod rameta razvijenih unutar OTC-a (Tabela 4.3.4).

Rezultati mešovitih modela za efekte temperaturnog tretmana, populacije i njihove interakcije na analizirane parametre reproduktivnog uspeha prikazani su u Tabeli 4.3.5. Efekat temperaturnog tretmana, procenjen prosečno za obe populacije i unutar svake populacije pojedinačno, nije bio statistički značajan ni za broj ni za ukupnu masu razvijenih semena (sve $P > 0,05$). Međutim, efekat temperaturnog tretmana na ukupnu masu semena po čauri, prosečno za obe populacije, bio je marginalno značajan ($P = 0,067$). Procenjena ukupna masa semena bila je za 0,081 g veća kod rameta razvijenih unutar OTC-a nego kod rameta razvijenih izvan OTC-a, sto ukazuje na trend povećanja mase semena u uslovima povišene temperature. Efekat populacije bio je statistički značajan i za broj ($P = 0,006$) i za ukupnu masu semena ($P < 0,0001$), što ukazuje na to da su se populacije razlikovale u vrednostima oba analizirana parametra reproduktivnog uspeha, prosečno za oba temperaturna tretmana. Očekivani broj razvijenih semena bio je 29 % veći u Populaciji 1 nego u Populaciji 2, dok je ukupna masa razvijenih semena po čauri u Populaciji 1 bila prosečno veća za 0,22 g nego u Populaciji 2. Interakcija temperaturnog tretmana i populacije nije bila statistički značajna ni za broj ($P = 0,297$) ni za ukupnu masu semena ($P = 0,328$), što ukazuje da se odgovor ova dva parametra reproduktivnog uspeha na temperaturni tretman nije statistički značajno razlikovao između populacija (Tabela 4.3.5). Povezanost između broja i veličine semena ispitana je Spearmanovom korelacionom analizom između prosečnog broja semena po čauri i prosečne mase pojedinačnog semena za svaki temperaturni tretman, kako za obe populacije zajedno, tako i za svaku populaciju zasebno. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između ova dva parametra ni u jednom od analiziranih slučajeva (sve $P > 0,05$).

Tabela 4.3.4. Vrednosti deskriptivnih parametara reproduktivnog uspeha: proporcija oprašenih cvetova [*n*/*N* (%)], broj razvijenih semena [medijana (Q1–Q3)] i masa razvijenih semena po čauri [medijana (Q1–Q3)] klonalnih genotipove *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, n=34 i Populacija 2, n=34), čiji su se rameti razvijali izvan i unutar OTC-a tokom 2019. godine. *n* -broj oprašenih cvetova; *N*- ukupan broj cvetova; masa semena izražena je u gramima (g).

Parametar	**Populacija 1**		**Populacija 2**		**Obe populacije**	
	Izvan OTC-a	Unutar OTC-a	Izvan OTC-a	Unutar OTC-a	Izvan OTC-a	Unutar OTC-a
Proporcija oprašenih cvetova	125/165 (75,8 %)	62/162 (38,3 %)	93/121 (76,9 %)	34/77 (44,2 %)	218/286 (76,2 %)	96/239 (40,2 %)
Broj razvijenih semena	37,5 (25,2–48,0)	46 (37,0–56,5)	33 (22–41,5)	30 (23,0–44,0)	35 (24,0–46)	40,5 (29–51,2)
Masa razvijenih semena	0,377 (0,275–0,614)	0,539 (0,387–0,714)	0,315 (0,163–0,359)	0,284 (0,228–0,378)	0,317 (0,239–0,502)	0,418 (0,271–0,578)

Tabela 4.3.5. Rezultati mešovitih modela za efekte temperaturnog tretmana, populacije i njihove interakcije na parametre reproduktivnog uspeha: prosečan broj semena i ukupnu masu semena po čauri klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 34 i Populacija 2, *n* = 34), čiji su se rameti razvijali izvan i unutar OTC-a. Za broj semena efekat tretmana predstavljen je odnosom povišena/ambijentalna temperatura, a efekat populacije odnosom Populacija 1/Populacija 2. IRR (engl. *incidence rate ratio*) predstavlja odnos očekivanog broja semena. Za masu semena efekti su izraženi kao razlike (Δ), pri čemu je Δ za T računata kao povišena- ambijentalna temperatura, a Δ za P kao Populacija 1-Populacija 2. Vrednosti u zagradama predstavljaju intervale poverenja od 95%. Za kontraste tretmana unutar Populacije 1 i Populacije 2 prikazane su *P*-vrednosti korigovane Holmovom metodom (*P adj.*).

		Tretman (T)		**Populacija (P)**		**T x P**	**Populacija 1: T**		**Populacija 2: T**	
Parametar	Model	Efekat	*P*	Efekat	*P*	*P*	Efekat	*P adj.*	Efekat	*P adj.*
Broj semena	NB2 GLMM	IRR=1,14 (0,95; 1,37)	0,155	IRR=1,29 (1,08; 1,55)	**0,006**	0,297	IRR=1,26 (0,99; 1,59)	0,113	IRR=1,04 (0,79; 1,37)	0,806
Masa semena	LMM	Δ=0,08 (-0,01; 0,17)	0,067	Δ=0,22 (0,14; 0,31)	**<,0001**	0,328	Δ=0,12 (-0,02; 0,26)	0,173	Δ=0,04 (-0,06; 0,14)	0,446

4.3.3. Adaptivna vrednost i fenotipska selekcija

Kao mera adaptivne vrednosti korišćen je broj semena po cvetnom rametu. U analizi apsolutne adaptivne vrednosti korišćene su originalne vrednosti ove mere, dok je za analizu fenotipske selekcije izračunata relativna adaptivna vrednost. Prosečne vrednosti apsolutne adaptivne vrednosti prikazane su u Tabeli 4.3.6. Kada su obe populacije posmatrane zajedno, prosečna apsolutna adaptivna vrednost bila je veća kod biljaka koje su se razvijaleizvan OTC-a nego kod biljaka koje su se ravijaleunutar OTC-a. Isti obrazac uočen je i u obe populacije pojedinačno. Međutim, rezultati negativno-binomnog GLMM-a pokazali su da glavni efekti temperaturnog tretmana i populacije, kao ni njihova interakcija, nisu bili statistički značajni (sve $P > 0,05$; Tabela 4.3.7). Razlike između temperaturnih tretmana unutar pojedinačnih populacija takođe nisu bile statistički značajne (obe $P > 0,05$).

Rezultati multivarijatne selekcione analize na pojedinačne Hsp prikazani su u Tabeli 4.3.8. Statistički značajni linearni selekcioni gradijenti nisu utvrđeni ni za jedan od analiziranih Hsp. Ipak, u Populaciji 1 na ambijentalnoj temperaturi utvrđen je marginalno značajan pozitivan selekcioni gradijent za Hsp101 ($\beta = 0,511$; $P = 0,065$), što ukazuje na tendenciju ka većoj relativnoj adaptivnoj vrednosti genotipova sa većom relativnom količinom Hsp101. Nasuprot tome, za ukupni Hsp17.6 uočen je trend negativne selekcije ($\beta = -0,546$; $P = 0,073$), što ukazuje na tendenciju ka nižoj relativnoj adaptivnoj vrednosti genotipova sa većom relativnom količinom ovog proteina. Za razliku od Hsp, za pojedinačne komponente antioksidativnog sistema utvrđeni su statistički značajni linearni selekcioni gradijenti na osnovu bootstrap procene, ali samo pri povišenoj tempraturi. U Populaciji 1 utvrđeni su statistički značajni negativni selekcioni gradijenti za ukupni APX ($\beta = -0,714$; $P = 0,047$) i ukupni SOD ($\beta = -0,833$; $P = 0,048$), što ukazuje da su genotipovi sa većim vrednostima ukupnog APX i ukupnog SOD imali nižu relativnu adaptivnu vrendost. U Populaciji 2, selekcioni gradijent za CAT bio je pozitivan i statistički značajan ($\beta = 0,778$; $P = 0,021$), što ukazuje da su genotipovi sa većom relativnom količinom CAT imali veću relativnu adaptivnu vrednost. Iako su se smer i intenzitet pojedinačnih selekcionih gradijenata razlikovali između populacija i temperaturnih tretmana, formalni testovi interakcija nisu pokazali statistički značajne razlike u selekcionim gradijentima, između temperaturnih tretmana i populacija, niti značajnu interakciju T x P (sve $P > 0,05$; Tabela 4.3.9).

Univarijantna selekciona analiza nije pokazala statistički značajnu povezanost ukupne vrednosti Hsp sa relativnom adaptivnom vrednošću ni u jednoj kombinaciji populacije i temperaturnog tretmana (Tabela 4.3.10). Nasuprot tome, u Populaciji 1 na povišenoj temperaturi utvrđen je statistički značajan negativan linearni selekcioni diferencijal za ukupnu vrednost antioksidativnih enzima ($S = -1,206$; $P = 0,002$), što ukazuje da su genotipovi sa većom ukupnom vrednošću antioksidativnih enzima imali nižu relativnu adaptivnu vrednost (Tabela 4.3.10). U multivarijatnoj selekcionoj analizi, u kojoj su ukupne vrednosti Hsp i antioksidativnih enzima istovremeno uključene u model, parcijalni selekcioni gradijent za antioksidativne enzime u Populaciji 1 na povišenoj temperaturi bio je negativan i marginalno značajan ($\beta = -1,373$; $P = 0,055$; Tabela 4.3.11), što ukazuje na tendenciju ka negativnoj povezanosti ukupne vrednosti antioksidativnih enzima sa relativnom adaptivnom vrednošću i nakon uključivanja ukupne vrednosti Hsp u isti model, dok za Hsp nisu utvrđeni statistički značajni parcijalni selekcioni gradijenti.

Tabela 4.3.6. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SD) apsolutne adaptivne vrednosti (W) klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari koji su cvetali tokom 2019. godine (Populacija 1: izvan OTC-a, *n* = 27; unutar OTC-a, *n* = 30 i Populacija 2: izvan OTC-a, *n* = 28; unutar OTC-a, *n* = 23). W = ukupan broj razvijenih semena / ukupan broj cvetnih rameta.

Parametar	**Populacija 1**		**Populacija 2**		**Obe populacije**	
	Izvan OTC-a (n=27)	Unutar OTC-a (n=30)	Izvan OTC-a (n=28)	Unutar OTC-a (n=23)	Izvan OTC-a (n=55)	Unutar OTC-a (n=53)
W	11,25 ± 10,45	6,94 ± 12,11	11,87 ± 15,96	6,10 ± 10,59	11,57± 13,42	6,58 ± 11,38

Tabela 4.3.7. Rezultati negativno binomnog generalizovanog linearnog modela (GLMM) za efekte temperaturnog tretmana, populacije i njihove interakcije na apsolutnu adaptivnu vrednost (W) klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije koji su cvetali tokom 2019. godine (Populacija 1: izvan OTC-a, *n* = 27; unutar OTC-a, *n* = 30 i Populacija 2: izvan OTC-a, *n* = 28; unutar OTC-a, *n* = 23). W = ukupan broj razvijenih broj semena / ukupan broj cvetnih rameta. IRR (engl. *incidence rate ratio*) predstavlja odnos očekivane stope proizvodnje semena po cvetnom rametu. Vrednosti u zagradama predstavljaju intervale poverenja od 95%. Za kontraste tretmana unutar Populacije 1 i Populacije 2 prikazane su *P*-vrednosti korigovane Holmovom metodom.

		Tretman (T)		**Populacija (P)**		**T x P**	**Populacija 1: T**		**Populacija 2: T**	
Parametar	Model	Efekat	*P*	Efekat	*P*	*P*	Efekat	*P* adj.	Efekat	*P* adj.
W	NB2 GLMM	IRR=0,56 (0,23; 1,37)	0,206	IRR=1,04 (0,43; 2,52)	**0,935**	0,846	IRR=0,62 (0,18; 2,08)	0,633	IRR=0,52 (0,14; 1,88)	0,633

Tabela 4.3.8. Standardizovani linearni selekcioni gradijenti (β) za Hsp i antioksidativne enzime klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari koji su cvetali tokom 2019. godine (Populacija 1: izvan OTC-a, *n* = 12; unutar OTC-a, *n* = 14 i Populacija 2: izvan OTC-a, *n* = 12; unutar OTC-a, *n* = 11). Relativna adaptivna vrednost (w) izračunata je kao w = W/$\overline{W}$. Gradijenti su procenjeni u dve odvojene multivarijatne regresione analize za: (**A.**) pojedinačne Hsp i (**B.**) pojedinačne antioksidativne enzime; vrednosti pojedinačnih izoformi Hsp17.6, APX i SOD su objedinjene. Vrednosti u zagradama predstavljaju intervale poverenja od 95% dobijene bootstrap metodom. *P*-vrednosti dobijene su dvostranim neparametarskim bootstrap postupkom sa 2000 ponavljanja. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Osobina	**Populacija 1**				**Populacija 2**			
	Izvan OTC-a (n= 12)		**Unutar OTC-a** (n=14)		**Izvan OTC-a** (n=12)		**Unutar OTC-a** (n=11)	
	β	*P*	β	*P*	β	*P*	β	*P*
A. Hsp								
Hsp101	0,511 (-0,223; 1,147)	0,0650	-0,480 (-1,340; 1,247)	0,6643	-0,228 (-6,908; 6,487)	0,7426	-0,531 (-5,769; 5,589)	0,9579
Hsp70	-0,189 (-0,878; 0,740)	0,3868	0,546 (-2,387; 2,278)	0,6231	1,383 (-1,572; 3,354)	0,2749	0,109 (-5,281; 4,690)	0,9509
Hsp17.6	-0,546 (-1,344; 0,071)	0,0730	-0,959 (-2,330; 0,867)	0,1508	-0,955 (-7,136; 5,365)	0,6377	0,783 (-1,647; 3,121)	0,6760
B. Antioksidativni enzimi								
SOD	-0,230 (-1,143; 0,503)	0,4528	-0,833 (-1,764; -0,013)	**0,0483**	0,195 (-0,872; 0,847)	0,6997	-0,895 (-1,784; 0,456)	0,1210
APX	-0,196 (-0,901; 0,418)	0,4588	-0,714 (-1,777; -0,058)	**0,0473**	-0,001 (-0,700; 0,959)	0,9055	0,264 (-0,582; 1,743)	0,4447
CAT	0,097 (-0,693; 1,180)	0,8136	-0,136 (-1,123; 1,043)	0,8389	0,253 (-0,480; 0,958)	0,3428	0,778 (0,259; 2,536)	**0,0211**

Tabela 4.3.9. Rezultati formalnih testova razlika linearnih selekcionih gradijenata (β) za Hsp i antioksidativne enzime između temperaturnih tretmana i populacija kod klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari koji su cvetali tokom 2019. Godine (Populacija 1: izvan OTC-a, n = 12;i unutar OTC-a, n = 14 i Populacija 2: izvan OTC-a, n = 12; unutar OTC-a, n = 11). Prikazani su stepeni slobode (df), F-vrednosti i statistička značajnost (P) marginalnih testova fiksnih interakcionih efekata iz dva odvojena linearna mešovita modela (LMM) za: (**A.**) Hsp i (**B.**) antioksidativne enzime. U modelima je klonalni genotip uključen kao slučajni efekat. Relativna adaptivna vrednost izračunata je kao $w = W/\overline{W}$. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

A. Hsp	**Hsp101**			**Hsp70**			**Hsp17.6**		
Izvor variranja	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Osobina × tretman	1/8	0,281	0,6105	1/8	0,066	0,8044	1/8	0,219	0,6521
Osobina × populacija	1/8	0,345	0,5730	1/8	0,490	0,5038	1/8	0,552	0,4787
Osobina × tretman x populacija	1/8	0,175	0,6870	1/8	1,148	0,3152	1/8	0,979	0,3513
B. Antioksidativni enzimi	**SOD**			**APX**			**CAT**		
Izvor variranja	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*	df	*F*	*P*
Osobina × tretman	1/8	2,798	0,1329	1/8	0,075	0,7908	1/8	0,083	0,7804
Osobina × populacija	1/8	0,129	0,7293	1/8	1,621	0,2386	1/8	1,107	0,3235
Osobina × tretman x populacija	1/8	0,231	0,6434	1/8	0,723	0,4200	1/8	0,556	0,4771

Tabela 4.3.10. Standardizovani linearni selekcioni diferencijali (S) za ukupne vrednosti Hsp i antioksidativnih enzima klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1: izvan OTC-a, *n* = 12; unutar OTC-a, *n* = 14 i Populacija 2: izvan OTC-a, *n* = 12; unutar OTC-a, *n* = 11). Relativna adaptivna vrednost (w) izračunata je kao w = W/$\overline{W}$. Selekcioni diferencijali procenjeni su u dve odvojene univarijantne regresione analize, za ukupnu vrednost Hsp-ova i ukupnu vrednost antioksidativnih enzima. Vrednosti u zagradama predstavljaju intervale poverenja od 95% dobijene bootstrap metodom. *P*-vrednosti dobijene su dvostranim neparametarskim bootstrap postupkom sa 2000 ponavljanja.

Osobina	**Populacija 1**				**Populacija 2**			
	Izvan OTC-a (n= 12)		**Unutar OTC-a** (n=14)		**Izvan OTC-a** (n=12)		**Unutar OTC-a** (n=11)	
	S	*P*	S	*P*	S	*P*	S	*P*
Hsp	0,308 (-0,868; 0,085)	0,1079	-0,575 (-1,526; 0,209)	0,1179	0,175 (-0,271; 1,045)	06067	0,033 (-0,497; 1,031)	0,8384
Antioksidativni enzimi	-0,183 (-0,910, 0,284)	0,4648	-1,206 (-2,036; -0,420)	**0,0020**	0,286 (-0,531; 0,995)	0,5667	-0,361 (-1,172; 0,964)	0,9778

Tabela 4.3.11. Standardizovani linearni selekcioni gradijenti (β) za ukupne Hsp i antioksidativne enzime klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari koji su cvetali tokom 2019. godine (Populacija 1: izvan OTC-a, *n* = 12; unutar OTC-a, *n* = 14 i Populacija 2: izvan OTC-a, *n* = 12; unutar OTC-a, *n* = 11). Relativna adaptivna vrednost (w) izračunata je kao w = W/$\overline{W}$. Selekcioni gradijenti procenjeni su u multivarijatnoj regresionoj analizi u kojoj su ukupne vrednosti Hsp-ova i antioksidativnih enzima istovremeno uključene kao prediktori. Vrednosti u zagradama predstavljaju intervale poverenja od 95% dobijene bootstrap metodom. *P*-vrednosti dobijene su dvostranim neparametarskim bootstrap postupkom sa 2000 ponavljanja.

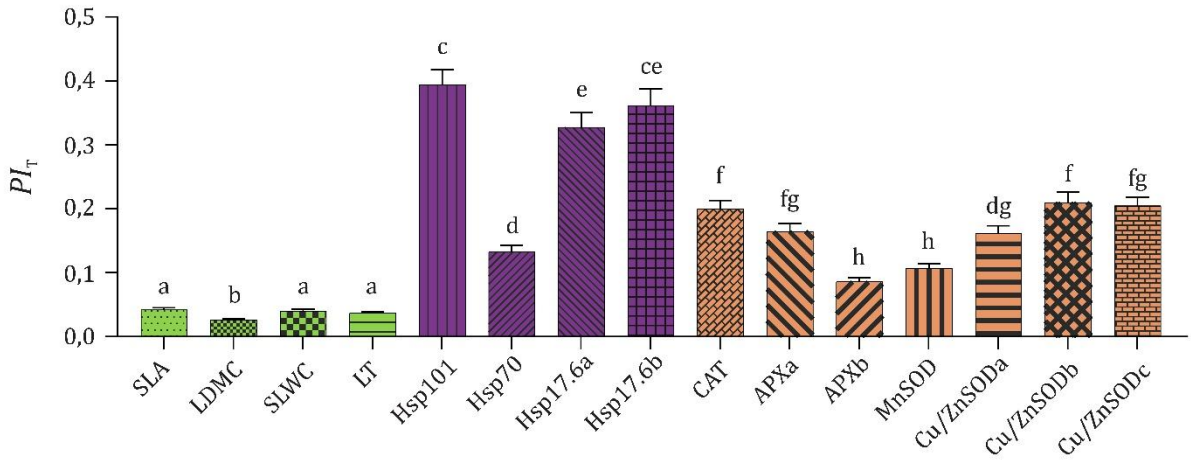
Osobina	**Populacija 1**				**Populacija 2**			
	Izvan OTC-a (n= 12)		**Unutar OTC-a** (n=14)		**Izvan OTC-a** (n=12)		**Unutar OTC-a** (n=11)	
	β	*P*	β	*P*	β	*P*	β	*P*
Hsp	-0,282 (-1,040; 0,286)	0,3058	0,271 (-1,425; 1,468)	0,7100	0,095 (-0,403; 1,055)	0,9035	0,302 (-0,655; 1,935)	0,5254
Antioksidativni enzimi	-0,060 (-0,897; 0,653)	0,9635	-1,373 (-2,539; 0,038)	0,0554	0,256 (-0,504; 0,982)	0,7586	-0,518 (-1,781; 0,706)	0,4008

4.4. Fenotipska plastičnost anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila*

4.4.1. Fenotipska plastičnost u odgovoru na temperaturni tretman

Način na koji se kvantitativno procenjuju fenotipske promene izazvane sredinskim uslovima značajno utiče na tumačenje ekoloških i evolucionih aspekata fenotipske plastičnosti (Valladares i sar, 2006). U ovoj studiji primenjen je indeks plastičnosti, PI_V, prema Valladares i saradnicima (2006), koji se smatra pogodnim indeksom za poređenje nivoa fenotipske plastičnosti kako između funkcionalnih osobina, tako i između grupa funkcionalno povezanih osobina. S obzirom na to da se vrednosti PI_V a kreću u rasponu od 0 do 1, predstavlja pogodan pokazetelj za poređenje nivoa fenotipske plastičnosti između osobina sa različitim mernim jedinicama i opsegom varijabilnosti.

Kako bi se ispitao uticaj povišene temperature na nivo i obrazac fenotipske plastičnosti anatomsko-morfoloških osobina lista, relativnu količinu Hsp i relativnu količinu antioksidativnih enzima izračunati su indeksi plastičnosti (PI_T) za sve ove osobine ispoljene u rametima izvan i unutar OTC-a (Slika 4.4.1). Prosečan nivo fenotipske plastičnosti bio je relativno nizak i zavisio je od analizirane osobine (Slika 4.4.1). Posmatrano na nivou grupa funkcionalno povezanih osobina, najviši nivo plastičnosti uočen je za Hsp (PI_T = 0,304), zatim za antioksidativne enzime (PI_T = 0,162) a najniži za anatomsko-morfološke osobine lista (PI_T = 0,037). Na nivou pojedinačnih osobina, najplastičniji odgovor ispoljili su Hsp101 (PI_T = 0,395), Hsp17.6a (PI_T = 0,328) i Hsp17.6b (PI_T = 0,362) a najmanje plastičan LDMC (PI_T = 0,027), LT (PI_T = 0,037), SLWC (PI_T = 0,040) i SLA (PI_T = 0,042). Rezultati Fridmanove ANOVA-e za sve analizirane osobine lista pokazali su da se nivoi plastičnosti značajno razlikuju ($\chi^2(14, N = 120) = 707{,}73$, $P < 0{,}0001$) (Slika 4.4.1).



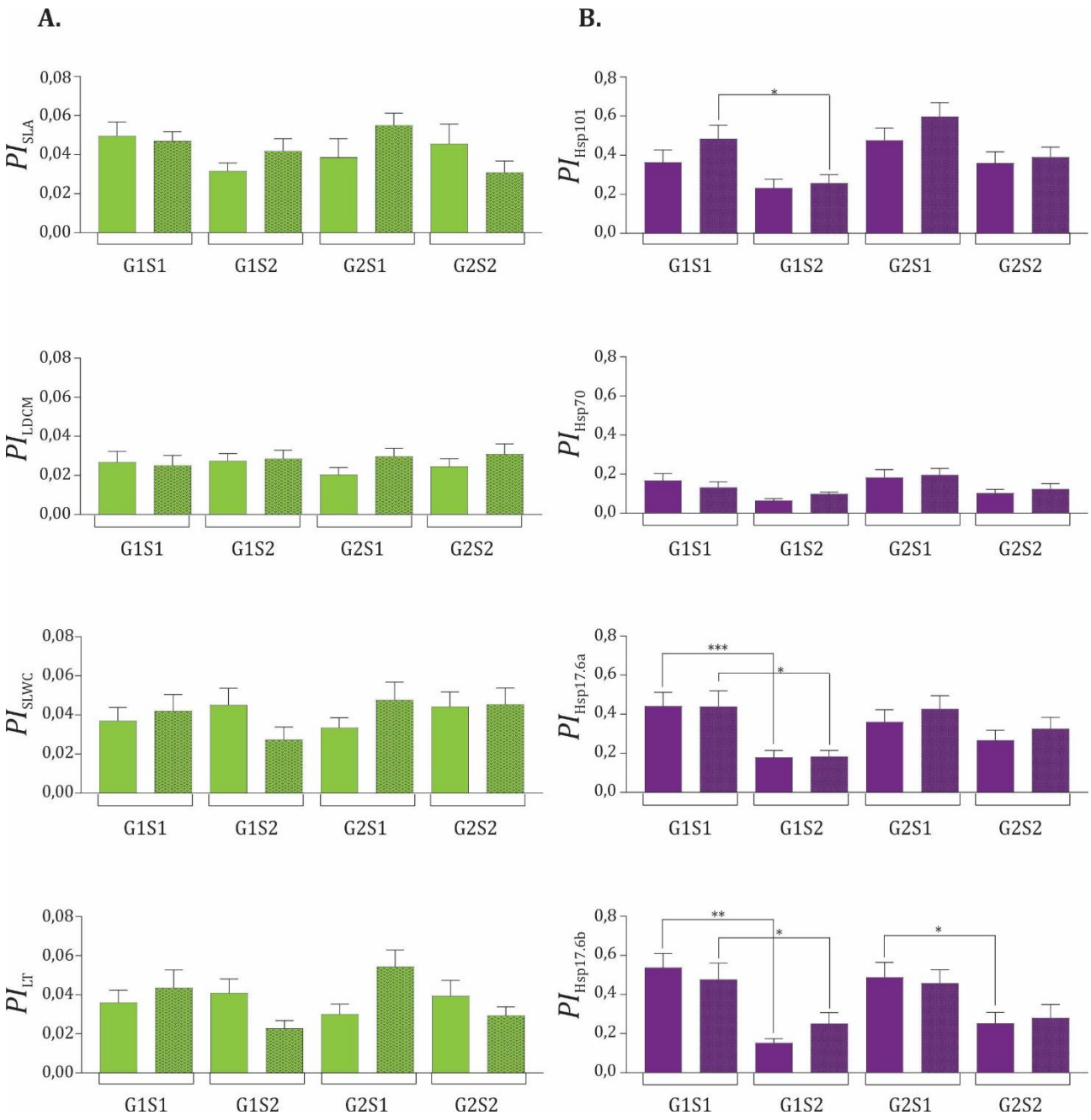
Slika 4.4.1. Indeksi fenotipske plastičnosti anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* između dve temperaturne sredine *in situ.*

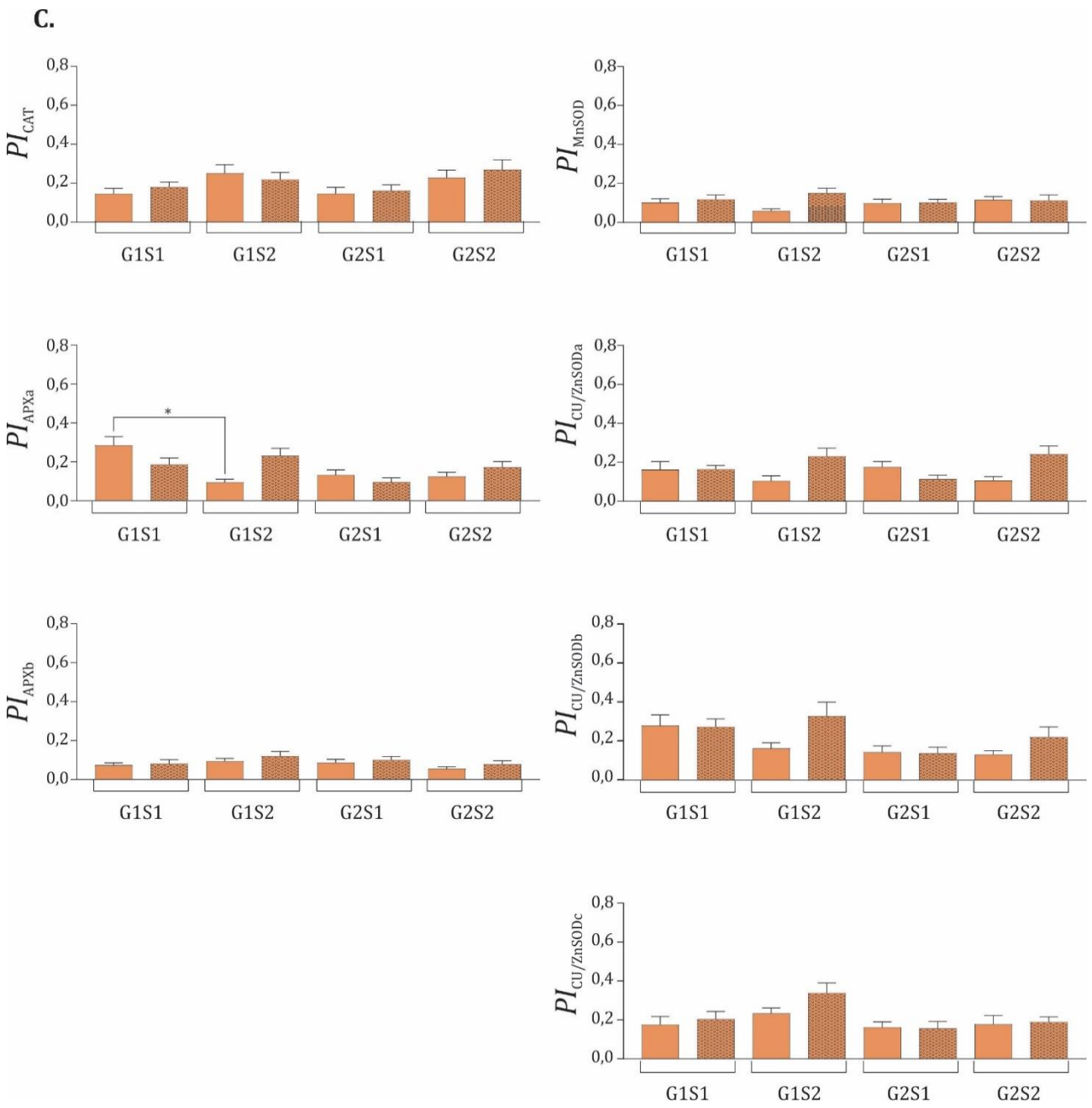
Prikazane su prosečne vrednosti (8 ± SE) indeksa fenotipske plastičnosti (PI_T) za anatomsko-morfološke osobine lista (SLA, LDMC, SLWC, LT) i biohemijske osobine lista: relativne količine proteina toplotnog stresa (Hsp101, Hsp70, Hsp17.6a, Hsp17.6b) i antioksidativnih enzima (CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc) genotipova *Iris pumila* (N=240), izračunate između rameta koji su se razvijali izvan i unutar OTC-a. Različitim slovima označene su prosečne vrednosti koje se statistički značajno razlikuju ($P < 0{,}05$; videti Materijal i metode). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.2.

Na Slici 4.4.2 prikazane su prosečne vrednosti PI_T analiziranih osobina lista za svaku populaciju *I. pumila*, tokom dve sezone i dve godine. Nivo plastičnosti svih anatomsko-morfoloških osobina lista bio je sličan tokom celog perioda istraživanja (sve *P adj.* > 0,05)(Slika 4.4.2. (A.)). Nasuprot tome, za sve Hsp uočen je trend smanjenja PI_T u leto u odnosu na proleće, tokom obe godine istraživanja (Slika 4.4.2. (B.)), što ukazuje na niži nivo fenotipske plastičnosti tokom stresnije sezone. Pošto je ovakav obrazac bio konzistentan u obe populacije, moglo bi se zaključiti da je sezonsko smanjenje nivoa fenotipske plastičnosti Hsp opšti odgovor na povišeni temperaturni stres, a ne populaciono specifična pojava. Rezultati Vilkoksonovog testa pokazali su da su se vrednosti PI_T za obe izoforme Hsp17.6 u većini slučajeva značajno razlikovale između sezona. Konkretno, PI_T za Hsp17.6a značajno se razlikovao između proleća i leta tokom prve godine u obe populacije (Populacija 1: *P adj.* = 0,0007; Populacija 2: *P adj.* = 0,0107), dok se PI_T za plastičnost Hsp17.6b značajno razlikovao tokom obe godine u Populaciji 1 (*P adj.* = 0,002 i *P adj.* = 0,020), a u Populaciji 2 samo u prvoj godini (*P adj.* = 0,020) dok rezultati ukazuju na tendenciju ka sezonskoj promeniu drugoj (*P adj.* = 0,083) (Slika 4.4.2. (B.)). Kada su u pitanju Hsp101 i Hsp70, sezonske razlike u vrednostima PI_T uočene su samo tokom prve godine istraživanja, pri čemu je ta razlika za Hsp101 bila statistički značajna samo u Populaciji 2 (*P adj.* = 0,041), dok je za Hsp70 bila marginalno značajna u Populaciji 1 (*P adj.* = 0,060) (Slika 4.4.2. (B.)). U poređenju sa Hsp101 i Hsp70 koji su pokazali stabilniji obrazac plastičnosti između sezona, sezonsko smanjenje plastičnosti bilo je izraženije za obe izoforme Hsp17.6, što može ukazivati na razlike u dinamici njihove regulacije i ekspresije u uslovima temperaturnog stresa.

Variranje nivoa fenotipske plastičnosti antioksidativnih enzima bilo je specifično za enzim i njegovu izoformu. Uočen je trend porasta vrednosti PI_T od proleća do leta, u obe godine istraživanja, za CAT i Cu/ZnSODc (Slika 4.4.2. (C.)), ali rezultati Vilkoksonovog testa nisu potvrdili statisitčku značajnost ovih promena. Nasuprot tome, za APXa i Cu/ZnSODa zabeležena je sezonska promena suprotnog smera u zavisnosti od populcije, vrednosti PI_T su rasle od proleća do leta u Populaciji 1, dok su u Populaciji 2 opadale (Slika 4.4.2. (C.)). Ovakav obrazac može ukazivati na postojanje populaciono uslovljenih razlika u plastičnom odgovoru. Statistički značajana potvrda ovog trenda utvrđena je samo za APXa, i to u Populaciji 1 tokom prve godine istraživanja (*P adj.* = 0,017) dok je u Populaciji 2 u drugoj godini zabeležena marginalna značajnost (*P adj.* = 0,06). Za APXb, MnSOD i Cu/ZnSODb nisu uočene značajne sezonske promene u vrednostima PI_T tokom celog perioda istraživanja (sve *P adj.* > 0,05) (Slika 4.4.2. (C.)).

Međupopulacione razlike u vrednostima PI_T analizirane su Vilkokson-Men-Vitnijevim testom. Statistički značajne razlike između populacija utvrđene su samo za APXa i MnSOD u leto prve godine (*P adj.* = 0,030 i *P adj.* = 0,011, redom) kao i za Cu/ZnSODa u leto prve) i druge godine (*P adj.* = 0,047 i *P adj.* = 0,039, redom). Za sve ostale ispitivane enzime nisu utvrđene značajne međupopulacione razlike u nivou fenotipkse plastičnosti. Ovi rezultati ukazuju da genotipovi obe populacije, generalno, ispoljavaju sličan obrazac plastičnog odgovora na temperaturne promene.


A.
B.
PI SLA
PI LDCM
PI SLWC
PI LT
PI Hsp101
PI Hsp70
PI Hsp17.6a
PI Hsp17.6b
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
G1S1
G1S2
G2S1
G2S2
*
**
***



Slika 4.4.2. Indeksi fenotipske plastičnosti anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* između dve temperaturne sredine, tokom dve sezone i dve uzastopne godine *in situ*.

Prikazane su prosečne vrednosti ($\bar{X}$ ± SE) indeksa fenotipske plastičnosti (PI_T) za anatomsko-morfološke i biohemijske osobine lista klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, bez šare i Populacija 2, šrafirano), između dve temperaturne sredine, tokom dve sezone i dve uzastopne godine. Prikazane su (**A.**) anatomsko-morfološke osobine lista i biohemijske osobine: (**B.**) proteini toplotnog stresa i (**C.**) antioksidativni enzimi. Statistička značajnost razlika između sezona u okviru iste populacije utvrđena je Vilkoksonovim testom označenih rangova uz BH korekciju (videti Materijal i metode): *P < 0,05; ** P < 0,01;*** P < 0,001. S – sezona; G – godina. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.2-

4.4.2. Sezonska dinamika fenotipske plastičnosti

Radi utvrđivanja uticaja sezone na dinamiku fenotipske plasičnosti analiziranih osobina lista, izračunati su indeksi fenotipske plastičnosti između proleća i leta, $PI_{P\text{-}L}$, unutar svakog temperaturnog tretmana, za svaku godinu pojedinačno kao i za obe godine objedinjeno.

Prosečne vrednosti ($\bar{X}$) i koeficijenti varijacije (CV%) $PI_{P\text{-}L}$ za anatomsko-morfološke osobina lista (SLA, LDMC, SLWC, LT), relativnu količinu Hsp (Hsp101, Hso70, Hsp17.6) i relativnu količinu antioksidativnih enzima (CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc) genotipova *I. pumila* iz Populacije 1 i 2, ponaosob, kao i za obe populacije objedinjeno prikazani su u Tabelama 4.4.1. A, B i C. Prosečan nivo sezonske fenotipske plastičnosti razlikovao se između analiziranih osobina i zavisio je od godine istraživanja. Najviše vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ zabeležene su za Hsp17.6a, Hsp17.6b i Hsp101, srednje vrednosti za antioksidativne enzime i Hsp70, dok su najniže vrednosti uočene za anatomsko-morfološke osobina lista. Ovakav obrazac utvrđen je u oba temperaturna tretmana, u obe populacije i tokom obe godine istraživanja.

Posmatrano sa aspekta temperaturnog tretmana, rameti koji su se razvijali unutar OTC-a pretežno su pokazivali više vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ u odnosu na ramete izvan OTC-a. Više vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ na povišenoj temperaturi tokom obe godine zabeležene su za LDMC, SLWC, Hsp101, APXb, MnSOD i Cu/ZnSODc, dok je za LT, APXa i Cu/ZnSODa takav obrazac uočen samo u prvoj, a za SLA, Hsp70, Hsp17.6a, Hsp17.6b i Cu/ZnSODb samo u drugoj godini istraživanja. Ipak, o ovim razlikama može se govoriti pre svega u smislu trenda s obzirom na to da je Vilkoksonov test statistički značajnu razliku potvrdio samo za SLA, Hsp17.6a i MnSOD u Populaciji 2 (Tabela 4.4.1).

Za razliku od uočenih sezonskih obrazaca plastičnosti između temperaturnih tremana, sezonski obrasci plastičnosti uslovljeni međugodišnjim promenama sredinskih faktora razlikovali su se za većinu analiziranih osobina (Tabela 4.4.1). Jedini izuzetak su tri izoforme Cu/ZnSOD (Tabela 4.4.1).

Razlike između populacija testirane su Vilkokson-Men-Vitnijevim testom, unutar svakog temperaturnog tretmana, svake godine, kao i za obe godine objedinjeno. Značajne među-populacione razlike utvrđene su za Hsp101 u obe godine i oba tretmana (sve $P\ adj. < 0{,}001$), za MnSOD u drugoj godini u oba tretmana ($P\ adj. = 0{,}0019$ i $P\ adj. = 0{,}0024$, na abijentalnoj i povišenoj temperaturi), kao i za Cu/ZnSODa i Cu/ZnSODb unutar OTC-a u prvoj godini ($P\ adj. = 0{,}0079$ i $P\ adj. = 0{,}0228$, redom), a za SLA u drugoj godini ($P\ adj. = 0{,}0016$). Za sve ostale analizirane osobine nisu utvrđene značajne među-populacione razlike u vrednostima $PI_{P\text{-}L}$.

Tabela 4.4.1. Prosečne vrednosti ($\bar{X}$) indeksa sezonske fenotipske plastičnosti ($PI_{P\text{-}L}$) za kontrast proleće-leto i koeficijenti varijacije (CV%) anatomsko-morfoloških osobina lista (SLA, LDMC, SLWC, LT), Hsp-ova (Hsp101, Hsp70, Hsp17.6a, Hsp17.6b) i antioksidativnih enzima (CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc) klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari, izvan i unutar OTC-a. Prikazane su vrednosti za: (**A.**) Populaciju 1 ($n = 15$), (**B.**) Populaciju 2 ($n = 15$) i (**C.**) obe populacije, tokom prve (G1, 2018.) i druge godine eksperimenta (G2, 2019.), za obe godine objedinjeno i za kontrast između godina. Boldovane vrednosti označavaju statistički značajne, a podvučene vrednosti marginalno značajne razlike između temperaturnih tretmana. Zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti međugodišnjih razlika: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ms – marginalno značajno; ns – statistički neznačajno. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

.

A.

	Godina1				Godina2				Obe godine				G1 vs G2	
	Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a	Unutar OTC-a
	$PI_{P\text{-}L}$	CV%	$PI_{P\text{-}L}$	CV%	$PI_{P\text{-}L}$	CV%	$PI_{P\text{-}L}$	CV%	$PI_{P\text{-}L}$	CV%	$PI_{P\text{-}L}$	CV%		
Populacija 1														
Anatomsko-morfološke osobine														
SLA	0,048	80,1	0,053	37,1	0,050	47,1	0,054	47,2	0,049	64,8	0,054	42,5	ns	ns
LDMC	0,175	17,6	0,190	20,1	0,015	86,9	0,038	58,0	0,095	87,8	0,114	72,2	***	***
SLWC	0,155	30,6	0,176	23,2	0,035	66,1	0,049	71,2	0,095	74,7	0,112	65,9	***	**
LT	0,117	38,5	0,133	26,5	0,042	62,7	0,048	69,5	0,079	66,1	0,091	60,5	***	***
Biohemijske osobine														
Hsp101	0,334	83,6	0,364	61,2	0,481	61,1	0,565	51,4	0,408	72,7	0,465	59,7	ns	ms
Hsp70	0,203	92,4	0,148	77,9	0,290	94,8	0,358	86,4	0,246	97,1	0,253	101,2	ns	ns
Hsp17.6a	0,574	43,5	0,519	63,0	0,800	24,7	0,905	6,8	0,687	36,7	0,712	42,7	*	*
Hsp17.6b	0,584	44,6	0,401	80,6	0,855	13,7	0,843	18,9	0,720	33,8	0,622	54,2	*	*
CAT	0,399	64,4	0,424	55,6	0,323	62,4	0,202	94,7	0,361	64,9	0,313	77,2	ns	*
APXa	0,232	72,9	0,225	63,8	0,123	93,2	0,137	65,1	0,178	86,9	0,181	70,3	ns	ns
APXb	0,111	66,8	0,112	69,2	0,199	67,1	0,247	40,6	0,155	75,3	0,180	62,6	ns	*
MnSOD	0,090	56,9	0,136	77,7	0,200	49,1	0,195	88,4	0,145	66,2	0,166	88,3	*	**
Cu/ZnSODa	0,212	75,1	0,157	86,4	0,205	62,5	0,165	56,1	0,208	69,3	0,161	72,2	ns	ns
Cu/ZnSODb	0,275	74,6	0,229	91,2	0,275	55,8	0,273	76,2	0,275	65,9	0,251	83,5	ns	ns
Cu/ZnSODc	0,359	63,7	0,511	37,4	0,447	36,0	0,488	33,4	0,403	50,3	0,500	35,6	ns	ns

B.

	Godina1				Godina2				Obe godine				G1 vs G2	
	Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a	Unutar OTC-a
	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%		
Populacija 2														
Anatomsko-morfološke osobine														
SLA	0,073	58,7	0,058	57,8	**0,062**	62,3	**0,021**	74,6	**0,067**	60,9	**0,040**	80,5	ns	**
LDMC	0,198	12,8	0,191	14,3	0,040	73,8	0,034	76,9	0,119	70,6	0,113	73,5	***	***
SLWC	0,169	35,4	0,161	33,4	0,044	83,7	0,051	54,1	0,106	75,1	0,106	65,9	**	**
LT	0,122	52,5	0,117	43,9	0,062	75,1	0,046	45,0	0,092	69,0	0,081	64,9	*	**
Biohemijske osobine														
Hsp101	0,244	65,3	0,277	59,8	0,487	55,9	0,572	44,2	0,365	69,5	0,425	61,2	*	*
Hsp70	**0,879**	12,2	**0,718**	34,6	0,870	10,7	0,941	6,0	0,874	11,5	0,829	25,6	ns	*
Hsp17.6a	0,724	32,5	0,627	46,4	0,899	11,9	0,948	8,2	0,811	24,9	0,788	33,8	*	**
Hsp17.6b	0,456	35,2	0,391	43,6	0,205	80,8	0,236	54,7	0,330	62,2	0,314	54,2	**	*
CAT	0,198	73,4	0,302	57,0	0,178	55,5	0,127	89,5	0,188	66,3	0,214	79,3	ns	*
APXa	0,120	69,6	0,129	73,5	0,265	58,3	0,339	64,3	0,193	74,7	0,234	84,8	*	*
APXb	**0,090**	78,5	**0,242**	61,4	0,456	48,0	0,469	40,7	**0,273**	89,7	**0,356**	57,8	**	**
MnSOD	0,247	100,1	0,386	49,5	0,261	63,9	0,175	54,3	0,254	83,1	0,280	65,7	ns	ms
Cu/ZnSODa	0,462	57,0	0,456	49,8	0,238	88,3	0,295	71,2	0,350	75,2	0,375	62,1	ns	ns
Cu/ZnSODb	0,434	76,8	0,473	66,1	0,482	57,1	0,461	51,3	0,458	66,9	0,467	59,4	ns	ns
Cu/ZnSODc	0,073	58,7	0,058	57,8	**0,062**	62,3	**0,021**	74,6	**0,067**	60,9	**0,040**	80,5	ns	**

C.

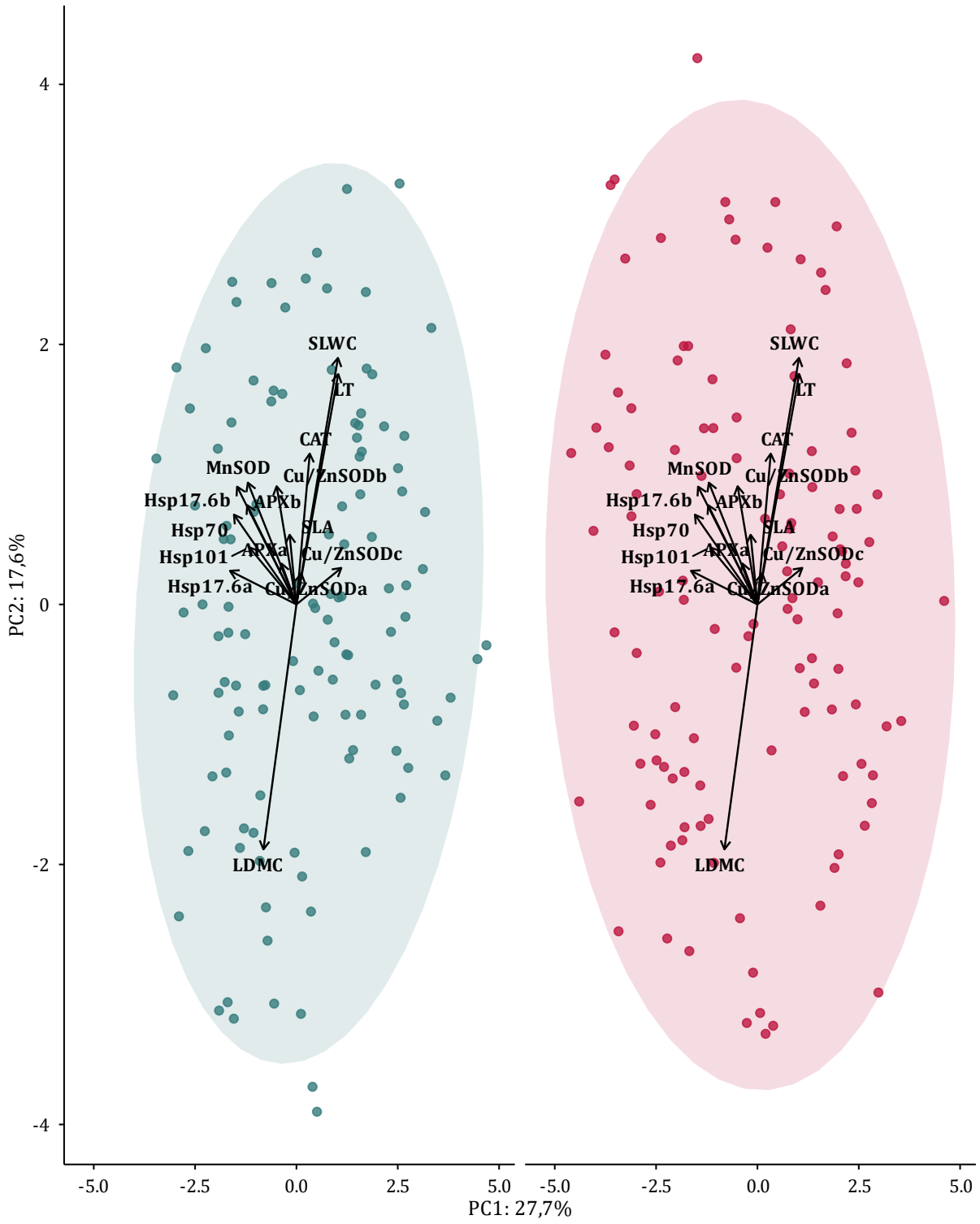
	Godina1				Godina2				Obe godine				G1 vs G2	
	Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a		Unutar OTC-a		Izvan OTC-a	Unutar OTC-a
	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%	PI_{P-L}	CV%		
Obe populacije														
Anatomsko-morfološke osobine														
SLA	0,060	70,4	0,056	49,6	**0,056**	57,9	**0,038**	71,0	0,058	65,0	0,047	61,3	ns	*
LDMC	0,187	16,3	0,191	17,4	0,027	94,3	0,036	67,4	0,107	79,0	0,113	72,9	***	***
SLWC	0,162	33,6	0,169	28,7	0,039	78,8	0,050	62,9	0,101	75,3	0,109	66,0	***	***
LT	0,119	46,4	0,125	35,8	0,052	75,2	0,047	59,1	0,086	68,4	0,086	62,9	***	***
Biohemijske osobine														
Hsp101	0,223	78,4	0,212	73,7	0,388	74,9	0,465	65,0	0,306	83,0	0,339	80,2	ms	*
Hsp70	0,726	33,8	0,618	49,6	0,835	19,0	0,923	6,7	0,781	27,3	0,770	34,9	ns	***
Hsp17.6a	0,654	39,4	0,514	63,7	0,877	13,0	0,896	15,2	0,766	29,8	0,705	44,7	**	***
Hsp17.6b	0,428	50,6	0,407	50,6	0,264	73,3	0,219	74,9	0,346	63,9	0,313	66,7	**	**
CAT	0,215	73,8	0,263	61,9	0,151	73,4	0,132	77,5	0,183	76,8	0,198	76,4	ns	**
APXa	0,116	68,5	0,120	72,2	0,232	63,9	0,293	59,9	0,174	76,1	0,207	79,1	*	**
APXb	**0,090**	68,6	**0,189**	73,7	0,328	64,7	0,332	68,6	0,209	94,1	0,261	77,5	***	*
MnSOD	0,229	90,9	0,271	74,2	0,233	65,0	0,170	55,3	0,231	78,8	0,221	74,8	ns	ns
Cu/ZnSODa	0,369	68,9	0,342	71,8	0,256	72,1	0,284	73,7	0,313	73,3	0,313	73,5	ns	ns
Cu/ZnSODb	0,396	72,7	0,492	52,8	0,465	48,7	0,475	42,9	0,430	60,7	0,483	48,3	ns	ns
Cu/ZnSODc	0,060	70,4	0,056	49,6	**0,056**	57,9	**0,038**	71,0	0,058	65,0	0,047	61,3	ns	*

Koeficijenti varijacije bili su veoma heterogeni kako između, tako i unutar analiziranih osobina (Tabela 4.4.1). Generalno, $PI_{P\text{-}L}$ za SLA, LDMC, SLWC, LT, Hsp101, Hsp70,APXa, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODc pokazali su veći CV% na ambijentalnoj temperaturi, dok su $PI_{P\text{-}L}$ za Hsp17.6a, Hsp17.6b, CAT, APXb i Cu/ZnSODb imali veći CV% na povišenoj temperaturi. *F*-test za jednakost varijansi potvrdio je da su razlike u CV% između temperaturnih tretmana tokom obe godine bile značajne samo za SLA ($F = 0,58$, $P = 0,0359$) i Hsp17.6b ($F = 1,90$, $P = 0,0146$), dok je za Hsp17.6a ova razlika uočena samo na nivou trenda ($F = 1,58$, $P = 0,0798$).

Korelaciona analiza izmedu $PI_{P\text{-}L}$ i CV% na nivou funkcionalno povezanih grupa osobina – anatomsko-morfoloških osobina lista, Hsp i antioksidativnih enzima – pokazala je značajnu negativnu vezu u svim grupama, u oba temperaturna tretmana. Ova veza je bila izuzetno jaka na nivou anatomsko-morfoloških osobina i Hsp i umereno jaka kod antioksidativnih enzima (anatomsko-morfološke osobine:$\rho = -0,859$ i $\rho = -0,888$, obe $P < 0,0001$; Hsp: $\rho = -0,971$ i $\rho = -0,926$, obe $P < 0,0001$; antioksidativni enzimi: $\rho = -0,375$, $P < 0,0001$ i $\rho = -0,662$, $P = 0,049$ na ambijentalnoj i povišenoj temperaturi redom). Dobijeni rezultati ukazuju da sa porastom vrednosti indeksa sezonske palstičnosti opada varijabilnost odgovora genotipova, odnosno da genotipovi sa višim vrednostima $PI_{P\text{-}L}$ ispoljavaju ujednačeniji odgovor na sezonske promene uslova sredine. Ovaj obrazac je naročito bio izražen kod izoformi Hsp17.6 u drugoj godini ekperimenta, gde su u oba temperaturna tretmana zabeležene visoke vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ uz istovremeno niske vrednosti CV% (Tabela 4.4.1.C).

4.5. Fenotipska integracija anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila*

Koncept fenotipske integracije temelji se na shvatanju da fenotipske osobine unutar iste funkcionalne celine (modula) organizma ne variraju nezavisno, već pokazuju međusobnu korelisanost. Ova povezanost odražava zajedničku varijaciju osobina koje doprinose istoj biološkoj funkciji. Stepen integrisanosti kvantifikuje se koeficijentima izvedenim iz kovarijacionih ili korelacionih matrica koji sumiraju strukturu zajedničke varijanse među osobinama. U okviru ove studije, analizirane osobine grupisane su u tri funkcionalne celine: anatomsko-morfološke osobine lista, proteine toplotnog stresa (Hsp) i antioksidativne enzime. Kako bi se procenilo da li ispitivane funkcionalno-povezane osobine obrazuju integrisane celine u okviru lista *I. pumila,* primenjena je analiza glavnih komponenti (PCA). Najpre je analiziran celokupan uzorak kako bi se uočila pozicija genotipova i identifikovao globalni obrazac kovarijacije osobina u zajedničkom multivarijatnom prostoru. Na Slici 4.5.1. prikazana je raspodela genotipova *I. pumila* koji su se razvijali u dve temperaturne sredine tokom celog eksperimentalnog perioda, projektovana na prve dve glavne komponente. Prva i druga glavna komponenta (PC1 i PC2) zajedno su objašnjavale 45,3 % ukupne varijanse, što ukazuje na to da variranje osobina nije koncentrisano duž ograničenog broja osa, već je raspoređeno duž većeg broja glavnih komponenti. Iako jasno razdvajanje rameta po temperaturnim tretmanima nije uočeno, rameti koji su se razvijali na povišenoj temperaturi (unutar OTC-a) pokazivali su veću prostornu disperziju, što ukazuje na povećano fenotipsko variranje u uslovima temperaturnog stresa.



Slika 4.5.1. Analiza glavnih komponenti (PCA) anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom celokupnog eksperimentalnog perioda *in situ*.

Prikazani su genotipovi *I. pumila* koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, projektovani na prve dve glavne komponente (PC1 i PC2), dobijene PCA analizom 15 anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista. Elipse predstavljaju 95% intervale poverenja za raspodelu genotipova unutar svakog temperaturnog tretmana. Strelice (vektori) predstavljaju smer i veličinu opterećenja pojedinačnih osobina na PC1 i PC2, koje zajedno objašnjavaju 45,3% ukupne varijanse.

U nastavku su su urađene odvojene PCA za svaki temperaturni tretman, kako bi se ispitalo da li se obrasci opterećenja osobina menjaju sa temperaturom i da li se funkcionalno povezane grupe osobina projektuju na iste glavne komponente. Rezultati, prikazani u Tabeli 4.5.1. ukazuju na visok stepen sličnosti u obrascima opterećenja između tretmana, što sugeriše očuvanje međusobnih odnosa među osobinama nezavisno od temperaturnih uslova. Hsp su konzistentno pokazivali istosmerna (negativna) opterećenja na prvoj glavnoj komponenti (PC1). Nasuprot tome, LDMC, SLWC i LT su dominantno doprinosili drugoj glavnoj komponenti (PC2), pri čemu je LDMC imao negativna, a SLWC i LT pozitivna opterećenja. Izoforme Cu/ZnSOD imale su najveći doprinos trećoj glavnoj komponenti (PC3), uz suprotan znak opterećenja između tretmana. Preostale ispitivane osobine (SLA, CAT, APX izoforme i MnSOD) nisu pokazale konzistentan obrazac opterećenja na prvim dvema glavnim komponentama, već su izraženija opterećenja ispoljile na višim komponentama, pri čemu se jačina opterećenja razlikovala između tretmana, a u pojedinim slučajevima uočen je i različit smer opetrećenja najizraženije grupisanje osobina, uočeno za Hsp na PC1 kao i za izoforme Cu/ZnSOD na PC3.

Tabela 4.5.1. Rezultati analize glavnih komponenti (PCA) anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista klonalnih genotipova *I. pumila* iz dve prirodne populacije u Deliblatskoj peščari (Populacija 1, *n* = 15 i Populacija 2, *n* = 15), izvan i unutar OTC-a tokom celokupnog eksperimentalnog perioda. Prikazana su opterećenja osobina na glavnim komponentama (PC); označena su opterećenja > ± 0,300, pri čemu boldovane vrednosti označavaju negativan, a boldovane i podvučene vrednosti pozitivan doprinos PC osi. λ = sopstvena vrednost. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

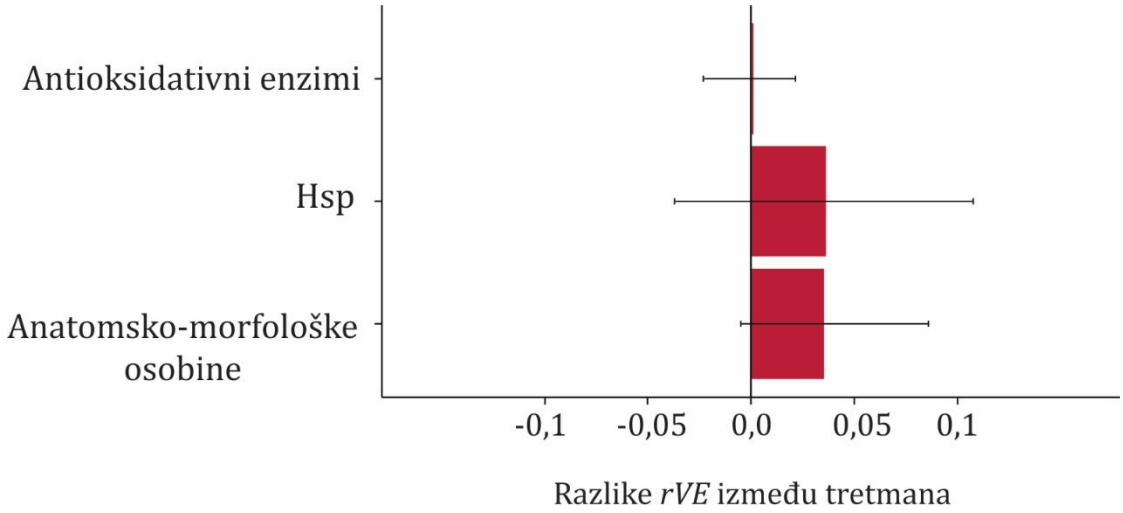
	Izvan OTC-a							**Unutar OTC-a**						
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
Anatomsko-morfološke osobine														
SLA	-0.077	0.111	**-0.453**	-0.380	0.186	-0.122	**-0.561**	0.043	0.188	0.215	**0.640**	-0.194	0.344	0.139
LDMC	-0.223	**-0.459**	0.265	0.034	-0.005	0.169	0.259	-0.214	**-0.473**	-0.170	-0.103	0.061	-0.148	-0.056
SLWC	0.300	**0.441**	-0.020	0.236	-0.100	-0.079	0.060	0.218	**0.488**	0.081	-0.244	-0.018	-0.062	-0.103
LT	0.306	**0.398**	0.013	0.323	-0.147	-0.050	0.093	0.210	**0.467**	0.052	-0.320	0.004	-0.113	-0.117
Biohemijske osobine														
Hsp101	**-0.374**	0.176	-0.106	0.176	-0.048	0.222	-0.058	**-0.390**	0.183	0.106	-0.049	0.154	-0.117	0.240
Hsp70	-0.278	0.098	-0.038	**0.473**	0.072	0.276	-0.031	**-0.296**	0.123	0.219	-0.281	-0.178	0.154	-0.285
Hsp17.6a	**-0.396**	0.072	0.136	0.211	0.141	-0.321	-0.042	**-0.416**	0.060	-0.032	-0.013	-0.360	-0.080	-0.160
Hsp17.6b	**-0.338**	0.240	0.134	0.107	0.035	**-0.449**	-0.037	**-0.374**	0.222	-0.057	0.043	-0.280	0.145	-0.148
CAT	0.094	0.345	0.050	-0.397	0.364	0.273	**0.470**	0.104	0.233	-0.178	**0.453**	0.257	**-0.518**	-0.327
APXa	-0.080	0.110	0.341	-0.285	**-0.656**	0.043	-0.149	-0.094	0.031	-0.471	-0.157	**0.409**	0.332	-0.328
APXb	-0.283	0.248	-0.023	-0.304	-0.179	-0.284	**0.378**	**-0.312**	0.160	-0.123	0.277	0.236	-0.021	-0.142
MnSOD	-0.283	0.289	-0.079	-0.021	0.036	**0.546**	-0.116	**-0.315**	0.205	0.013	-0.117	0.286	-0.247	**0.625**
Cu/ZnSODa	0.048	0.071	**0.446**	-0.020	**0.555**	-0.156	-0.097	0.016	0.016	**-0.470**	0.006	**-0.553**	**-0.423**	0.075
Cu/ZnSODb	-0.118	0.201	**0.470**	-0.212	0.017	0.170	-0.261	-0.113	0.232	**-0.466**	0.081	-0.002	0.343	0.179
Cu/ZnSODc	0.284	0.011	**0.362**	0.083	0.021	0.095	-0.351	0.282	0.073	**-0.379**	-0.086	-0.136	0.205	0.321
λ	4,189	2,524	2,235	1,378	0,974	0,691	0,641	4,144	2,832	2,169	1,399	0,899	0,732	0,602
kumulativno	0,279	0,448	0,597	0,688	0,753	0,799	0,842	0,276	0,465	0,610	0,703	0,763	0,812	0,852

Kao pokazatelj integrisanosti osobina lista u okviru svake od tri funkcionalno-povezane grupe, korišćena je relativna varijansa sopstvenih vrednosti (*rVE*). Posmatrano tokom celokupnog eksperimentalnog perioda (Tabela 4.5.2), najviši stepen fenotipske integracije uočen je kod anatomsko-morfoloških osobina lista, nešto niži kod Hsp, dok su antioksidativni enzimi pokazali najniži nivo integracije u obe temperaturne sredine. Kod sve tri grupe funkcionalno povezanih osobina uočene su veće prosečne vrednosti *rVE* kod rameta koji su se razvijali na povišenoj temperaturi u odnosu na ramete razvijane na ambijentalnoj temperaturi. Relativna širina intervala poverenja u odnosu na procenjene vrednosti *rVE* razlikovala se između grupa osobina: intervali poverenja bili su najuži kod anatomsko-morfoloških osobina, relativno uski kod Hsp, a najširi kod antioksidativnih enzima (Tabela 4.5.2). To ukazuje na pouzdaniju procenu integracije za prve dve grupe, i manje pouzdanu procenu integrisanosti za treću grupu osobina. Na Slici 4.5.2. prikazane su razlike u vrednostima *rVE* između temperaturnih tretmana. Prosečne vrednosti razlika *rVE* bile su pozitivne za sve tri grupe osobina, što ukazuje na viši stepen integracije na povišenoj temperaturi. Međutim, intervali poverenja od 95 % dobijeni bootstrap metodom bili su široki i obuhvatali su nulu, što ukazuje na izostanak statistički pouzdanih razlika u integraciji između temperaturnih tretmana. U skladu sa tim, permutacioni testovi kojima su poređene *rVE* između tretmana u okviru svake grupe nisu pokazali značajne razlike (sve $P > 0,05$), što potvrđuje da povišena temperatura nije značajno uticala na povećanje integracije posmatranih funkcionalnih celina.

U Tabeli 4.5.3 prikazane su vrednosti *rVE* za tri grupe funkcionalno povezanih osobina lista u okviru svakog temperaturnog tretmana, tokom dve sezone (proleće i leto) i dve uzastopne godine. Obrasci sezonskih i godišnjih promena razlika u vrednostima *rVE* između temperaturih tretmana prikazani su na Slici 4.5.3. Uočava se promena stepena fenotipske integracije tokom vremena, pri čemu se smer i veličina razlika između temperaturnih tretmana razlikuju u zavisnosti od grupe osobina i posmatranog perioda. Za anatomsko-morfološke osobine i antioksidativne enzime razlike u vrednostima *rVE* između tretmana zavisile su od godine: tokom prve godine viši stepen integracije uočen je kod rameta koji su se razvijali na povišenoj temperaturi, dok je tokom druge godine viši stepen integrisanosti uočen kod rameta koji su se razvijali na ambijentalnoj temperaturi. Razlike u vrednostima *rVE* za Hsp između tretmana zavisile su od sezone: kod rameta unutar OTC-a viši stepen integracije uočen je tokom proleća, dok je tokom leta integracija bila niža ili približno jednaka u poređenju sa rametima izvan OTC-a (Slika 4.5.3. i Tabela 4.5.3). Intervali poverenja za vrednosti *rVE* svih analiziranih grupa osobina bili su široki, što ukazuje na ograničenu pouzdanost procene integrisanosti osobna (Tabela 4.5.3). Takođe, intervali poverenja za razlike u *rVE* između temperaturnih tretmana bili su široki i obuhvatali su nulu za sve grupe osobina (Slika 4.5.3), što ukazuje da uočene razlike u integraciji između tretmana nisu pouzdane. U skladu s tim, permutacioni testovi (sprovedeni za svaku grupu osobina po sezonama i po godinama) nisu pokazali statistički značajne razlike između temperaturnih tretmana (sve $P > 0,05$).

Tabela 4.5.2. Relativni indeksi fenotipske integracije (*rVE*) sa intervalima poverenja (dati u zagradama) za grupe funkcionalno povezanih osobina lista klonalnih genotipova *I. pumila* ispoljenih izvan i unutar OTC-a tokom celokupnog eksperimentalnog perioda. Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Grupe osobina	Izvan OTC-a	Unutar OTC-a
Anatomsko-morfološke osobine	0,372 (0,345; 0,406)	0,408 (0,372; 0,465)
Hsp	0,316 (0,269; 0,385)	0,352 (0,303; 0,418)
Antioksidativni enzimi	0,061 (0,049; 0,092)	0,062 (0,054; 0,085)

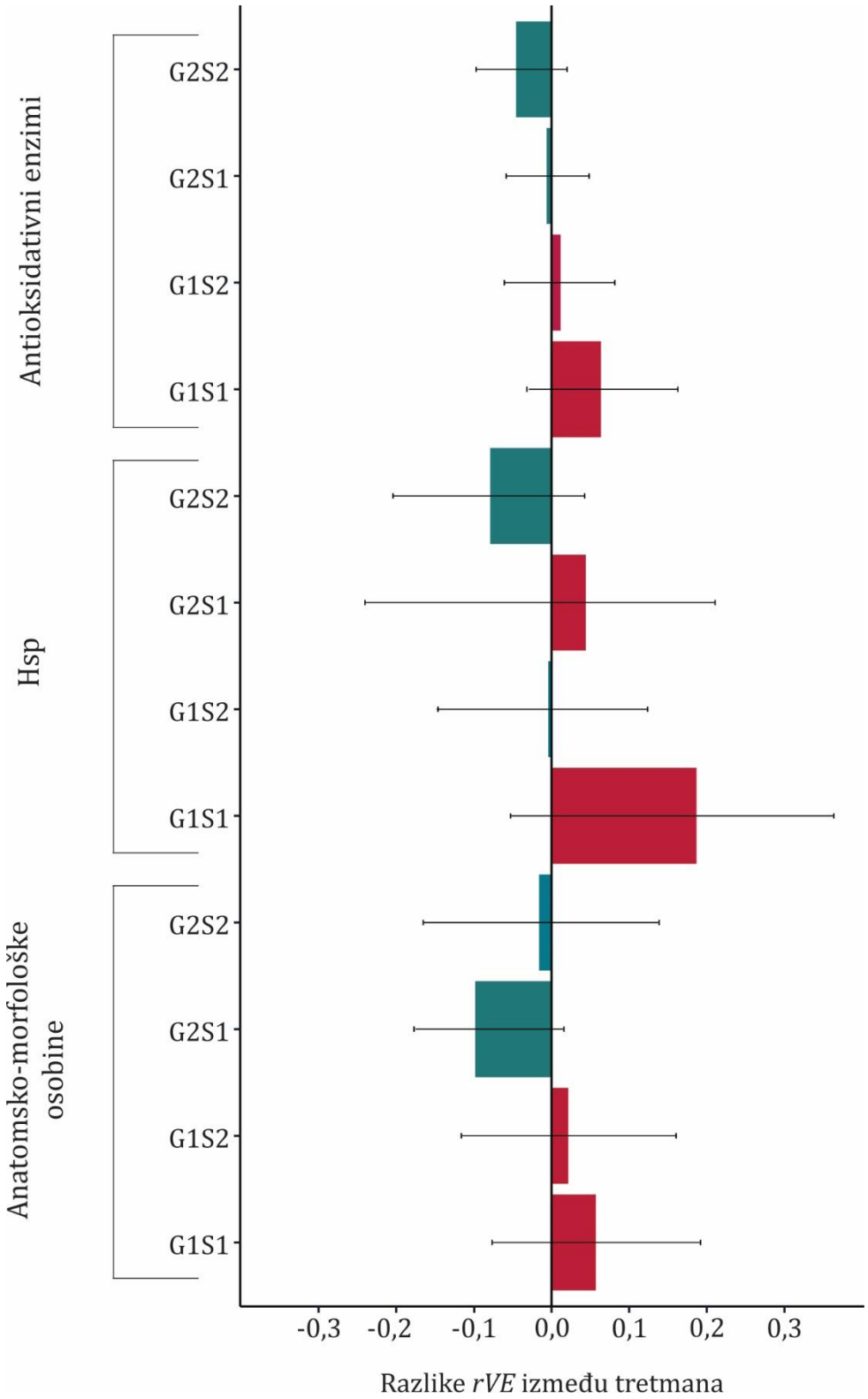


Slika 4.5.2. Razlike u indeksima fenotipske integracije za tri grupe funkcionalno povezanih osobina lista *I. pumila* između dve temperaturne sredine tokom celokupnog eksperimentalnog perioda *in situ*.

Prikazane su razlike u vrednostima indeksa fenotipske integracije (*rVE*) između genotipova razvijanih izvan i unutar OTC-a, za tri grupe funkcionalno povezanih osobina lista: anatomsko-morfološke osobine, proteine toplotnog stresa (Hsp) i antioksidativne enzime. Pozitivne vrednosti (crveno) označavaju viši stepen fenotipske integracije kod genotipova razvijanih unutar OTC-a. Horizontalne linije predstavljaju 95% intervale poverenja dobijene bootstrap metodom.

Tabela 4.5.3. Relativni indeksi fenotipske integracije (r*VE*) sa 95% intervalima poverenja (u zagradama), za tri grupe funkcionalno povezanih osobina lista klonalnih genotipova *I. pumila* ispoljenih izvan i unutar OTC-a tokom dve sezone (proleće i leto) i dve uzastopne godine (2018. i 2019). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.1.

Grupe osobina	**Godina 1**				**Godina 2**			
	Proleće		**Leto**		**Proleće**		**Leto**	
	Izvan OTC-a	**Unutar OTC-a**	**Izvan OTC-a**	**Unutar OTC-a**	**Izvan OTC-a**	**Unutar OTC-a**	**Izvan OTC-a**	**Unutar OTC-a**
Anatomsko-morfološke osobine	0,343 (0,238; 0,483)	0,395 (0,322; 0,514)	0,364 (0,299; 0,471)	0,382 (0,291; 0,494)	0,321 (0,264; 0,415)	0,225 (0,172; 0,350)	0,345 (0,215; 0,533)	0,329 (0,236; 0,486)
Hsp	0,260 (0,152; 0,495)	0,438 (0,316; 0,594)	0,217 (0,101; 0,395)	0,213 (0,106; 0,391)	0,256 (0,146; 0,524)	0,296 (0,143; 0,496)	0,208 (0,135; 0,357)	0,131 (0,079; 0,246)
Antioksidativni enzimi	0,072 (0,056; 0,158)	0,129 (0,089; 0,248)	0,083 (0,068; 0,173)	0,090 (0,057; 0,198)	0,068 (0,062; 0,137)	0,061 (0,055; 0,138)	0,091 (0,068; 0,169)	0,045 (0,045; 0,116)



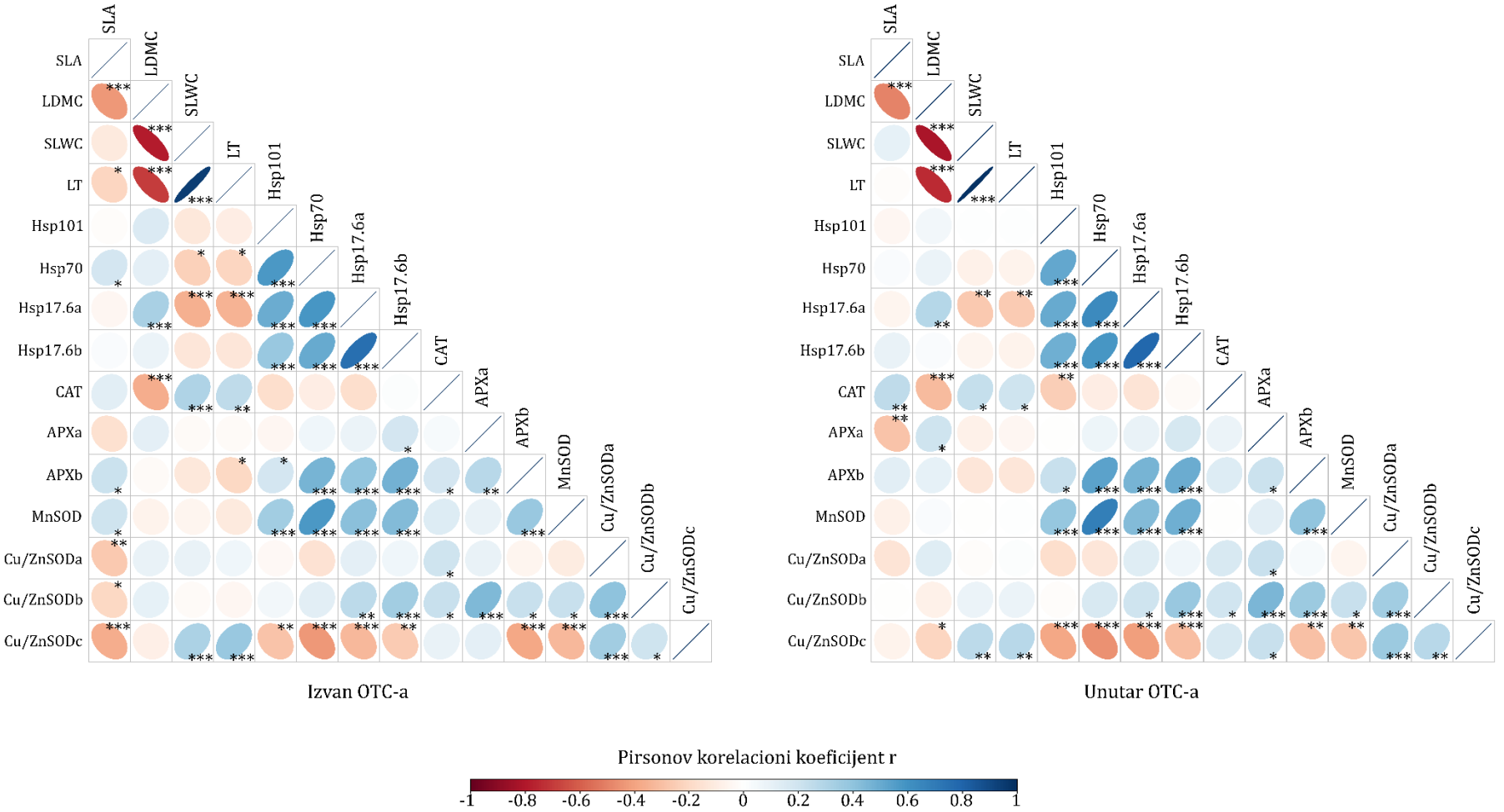
Slika 4.5.3. Sezonsko i godišnje variranje razlika u indeksima fenotipske integracije za tri grupe funkcionalno povezanih osobina lista *I. pumila* između dve temperaturne sredine *in situ*.

Prikazane su sezonske i godišnje razlike u vrednostima indeksa fenotipske integracije (*rVE*) između genotipova *I. pumila* razvijanih izvan i unutar OTC-a, za tri grupe funkcionalno povezanih osobina lista: anatomsko-morfološke, proteine toplotnog stresa (Hsp) i antioksidativne enzime. Pozitivne vrednosti (crveno) označavaju viši stepen fenotipske integracije kod genotipova razvijanih unutar OTC-a, a negativne vrednosti (zeleno) viši stepen integracije kod genotipova razvijanih izvan OTC-a. Horizontalne linije predstavljaju 95% intervale poverenja dobijene bootstrap metodom. S – sezona; G – godina.

Temperaturni tretman, sezona i godina uticali su na broj, veličinu i smer značajnih Pirsonovih keoficijenata korelacije, kako unutar, tako i između - grupa funkcionalno povezanih osobina lista *I. pumila* (Slika 4.5.4, 4.5.5, 4.5.6, 4.5.7, 4.5.8, 4.5.9, 4.5.10, 4.5.11. i 4.5.12). Kada se posmatra celokupan vremenski interval (Slika 5.4.4), rameti koji su se razvijali na ambijentlanoj temperaturi imali su veći broj značajnih korelacija (ukupno 56, od čega 37 pozitivnih i 19 negativnih) u poređenju sa rametima koji su se razvijali na povišenoj temperaturi (ukupno 50, od čega 35 pozitivnih i 15 negativnih). U oba temperaturna tretmana veći broj korelacija uočen je između osobina koje pripadaju različitim grupama nego između osobina u okviru iste grupe. Na ambijentalnoj temperaturi utvrđenesu 32 značajne korelacije između grupa (19 pozitivnih i 13 negativnih), a na povišenoj temperaturi 27 (17 pozitivnih i 10 negativnih).

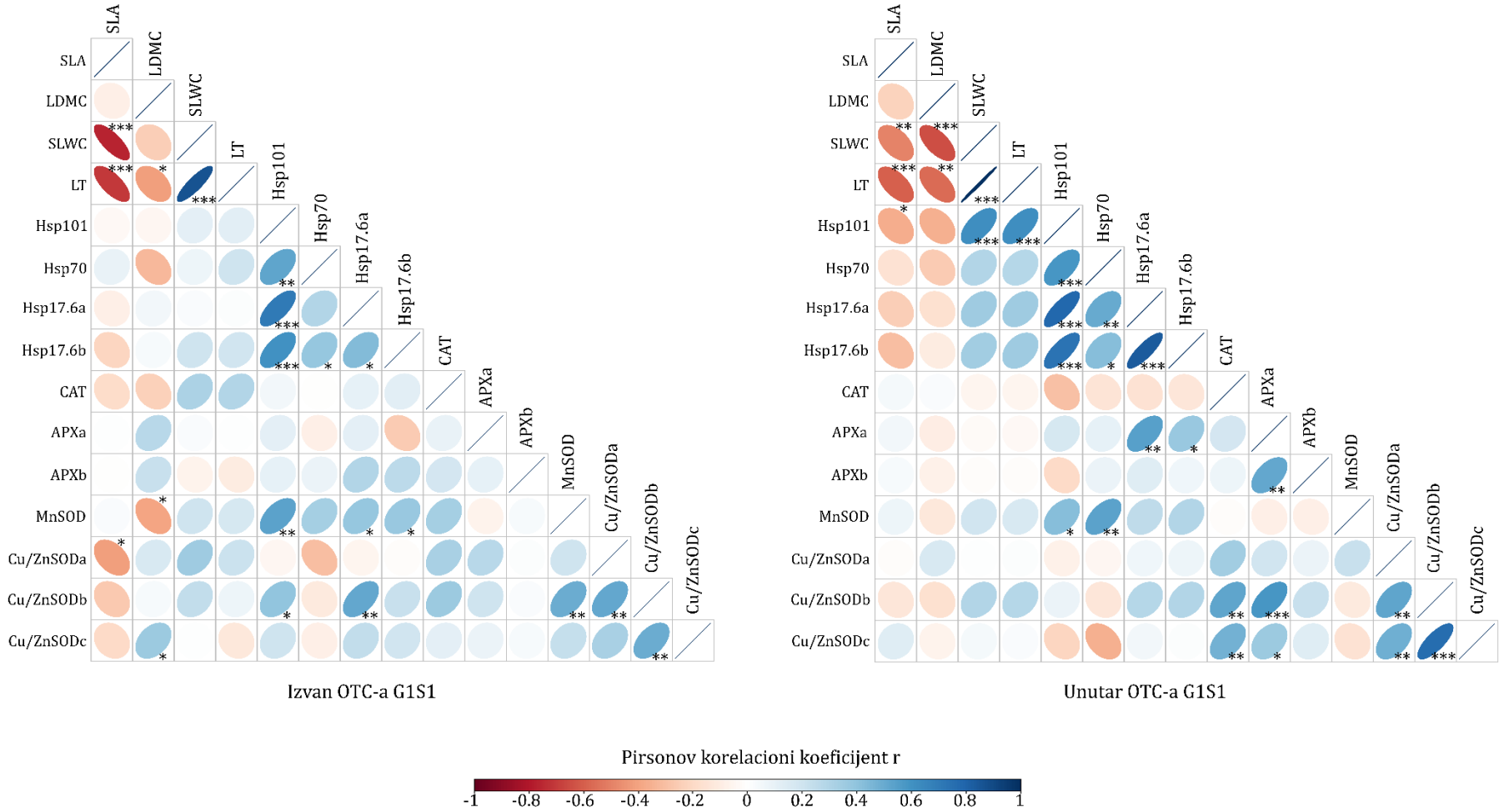
Korelacione matrice između svih analiziranih osobina, po temperaturnom tretmanu i za svaku kombinaciju sezone i godine, prikazane su na Slikama 4.5.5, 4.5.6, 4.5.7. i 4.5.8. U prvoj godini veći broj značajnih korelacija utvrđen je kod rameta koji su se razvijali na povišenoj temperaturi (unutar OTC-a), dok je u drugoj godini veći broj značajnih korelacija utvrđen kod rameta koji su se razvijali na ambijentalnoj temperaturi (izvan OTC-a). Kod rameta izvan OTC-a najveći broj značajnih korelacija utvrđen je u proleće druge godine (ukupno 25, od čega 17 pozitivnih i 8 negativnih) a najmanji u leto druge godine (ukupno 19, od čega 12 pozitivnih i 7 negativnih). Rameti unutar OTC-a imali su najveći broj značajnih korelacija u proleće prve godine (ukupno 26 od čega 21 pozitivna i 5 negativnih), a najmanji u leto druge godine (ukupno 12, od čega 8 pozitivnih i 4 negativne). U obe godine, kod rameta unutar OTC-a i generalno je utvrđen manji broj korelacija između grupa funkcionalno povezanih osobina nego kod rameta izvan OTC-a.

Na Slikama 4.5.9, 4.5.10, 4.5.11. i 4.5.12. prikazane su korelacione matrice unutar grupa funkcionalno povezanih osobina. Kada se posmatra celokupan eksperimentalni period, uočen je jednak broj značajnih korelacija u oba tretmana unutar svake grupe osobina (Slika 4.5.9). Broj i jačina korelacija unutar funkcionalnih grupa zavisilisu od temperaturnog tretmana, sezone, godine i grupe osobina. Tako je, za anatomsko-morfološke osobine veći broj korelacija kod rameta unutar OTC-a uočen samo tokom proleća prve godine, dok je u preostalom delu eksperimentalnog perioda veći broj korelacija utvrđen kod rameta izvan OTC-a, sa izuzetkom leta druge godine kada je utvrđen jednak broj korelacija u oba temperaturna tretmana. Za Hsp veći broj korelacija utvrđen je kod rameta unutar OTC-a tokom proleća obe godine, dok je tokom leta obe godine broj korelacija bio veći kod rameta izvan OTC-a. Za antioksidativne enzime, veći broj korelacija utvrđen je kod rameta unutar OTC-a u obe sezone tokom prve godine, dok je u obe sezone tokom druge godine veći broj korelacija utvrđen kod rameta koji su se razvijali izvan OTC-a. Uticaj sezone na broj značajnih korelacija i strukturu korelacionih matrica razlikovao se između grupa osobina. Konkretno, za anatomsko-morfološke osobine, broj korelacija se od proleća ka letu smanjivao tokom prve godine, a povećavao tokom druge godine, u oba temperaturna tretmana (Slika 4.5.10). Za Hsp broj korelacija se od proleća ka letu smanjivao tokom obe godine u oba temperaturna tretmana (Slika 4.5.11). Za antioksidativne enzime, kod rameta izvan OTC-a broj korelacija je rastao od proleća ka letu tokom prve godine, i ostajao približno isti između sezona tokom druge godine. Nasuprot tome, kod rameta unutar OTC-a broj korleacija se smanjivao od proleća ka letu tokom obe eksperimentalne godine (Slika 4.5.12).



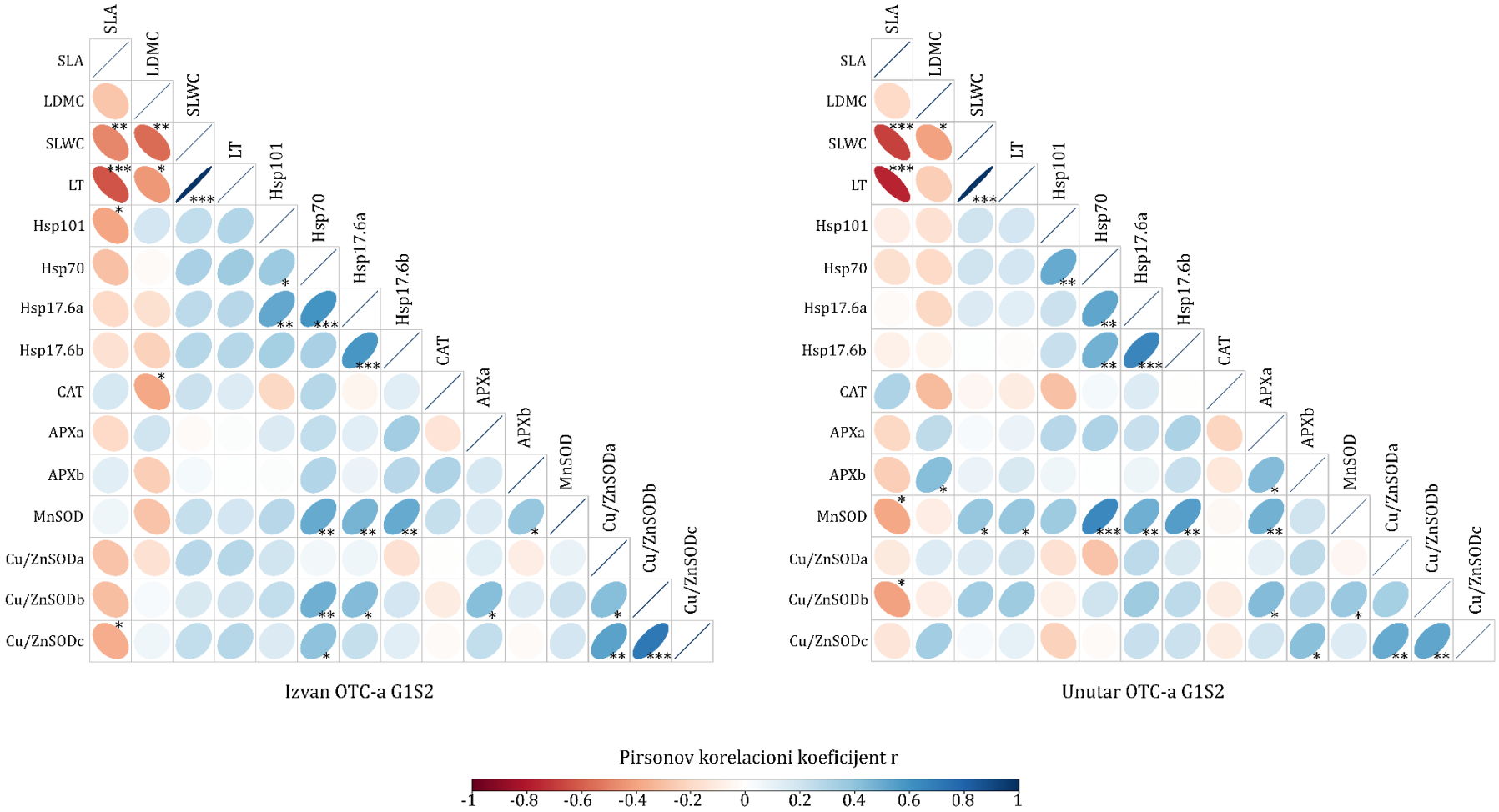
Slika 4.5.4. Toplotne mape korelacija između parova anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom celokupnog eksperimentlnog perioda *in situ*.

Prikazani su Pirsonovi koeficijenti korelacije (r) između 15 osobina lista genotipova *I. pumila* koji su se razvijali izvan OTC-a (levo) i unutar OTC-a (desno), tokom celog eksperimentalnog perioda. Analizirane su anatomsko-morfološke osobine (SLA, LDMC, SLWC, LT) i biohemijske osobine: relativne količine proteina toplotnog stresa (Hsp101, Hsp70, Hsp17.6a, Hsp17.6b) i antioksidativnih enzima (CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc). Gradijent boje i izduženost elipse odražavaju smer i jačinu korelacija. Statistička značajnost korelacija označena je zvezdicama: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.



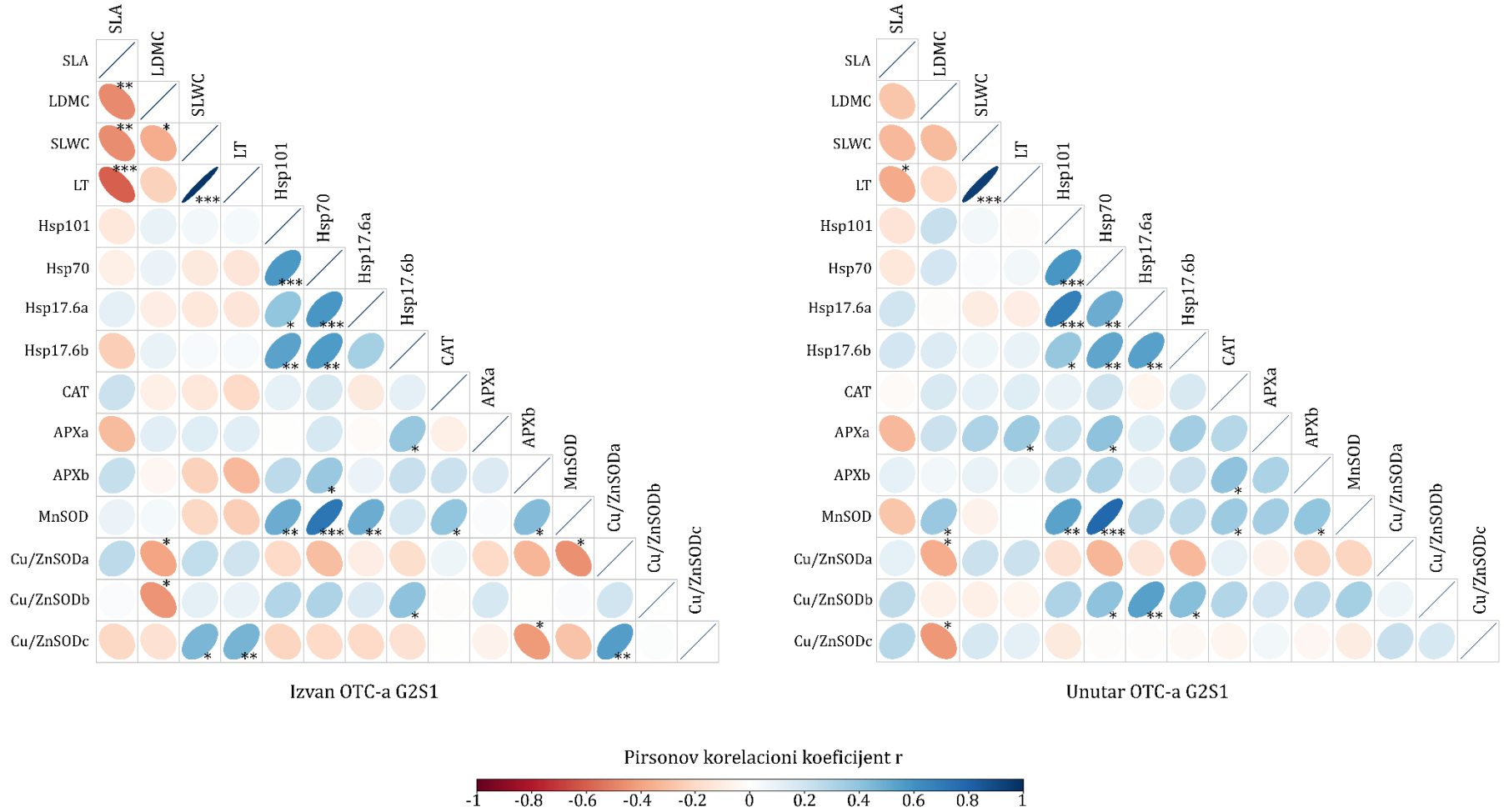
Slika 4.5.5. Toplotne mape korelacija između parova anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom proleća prve godine eksperimenta *in situ*.

Prikazani su Pirsonovi koeficijenti korelacije (r) između 15 osobina lista genotipova *I. pumila* koji su se razvijali izvan OTC-a (levo) i unutar OTC-a (desno), tokom proleća prve godine (G1S1). Analizirane su anatomsko-morfološke osobine (SLA, LDMC, SLWC, LT) i biohemijske osobine: relativne količine proteina toplotnog stresa (Hsp101, Hsp70, Hsp17.6a, Hsp17.6b) i antioksidativnih enzima (CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc). Gradijent boje i izduženost elipse odražavaju smer i jačinu korelacija. Statistička značajnost korelacija označena je zvezdicama: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.



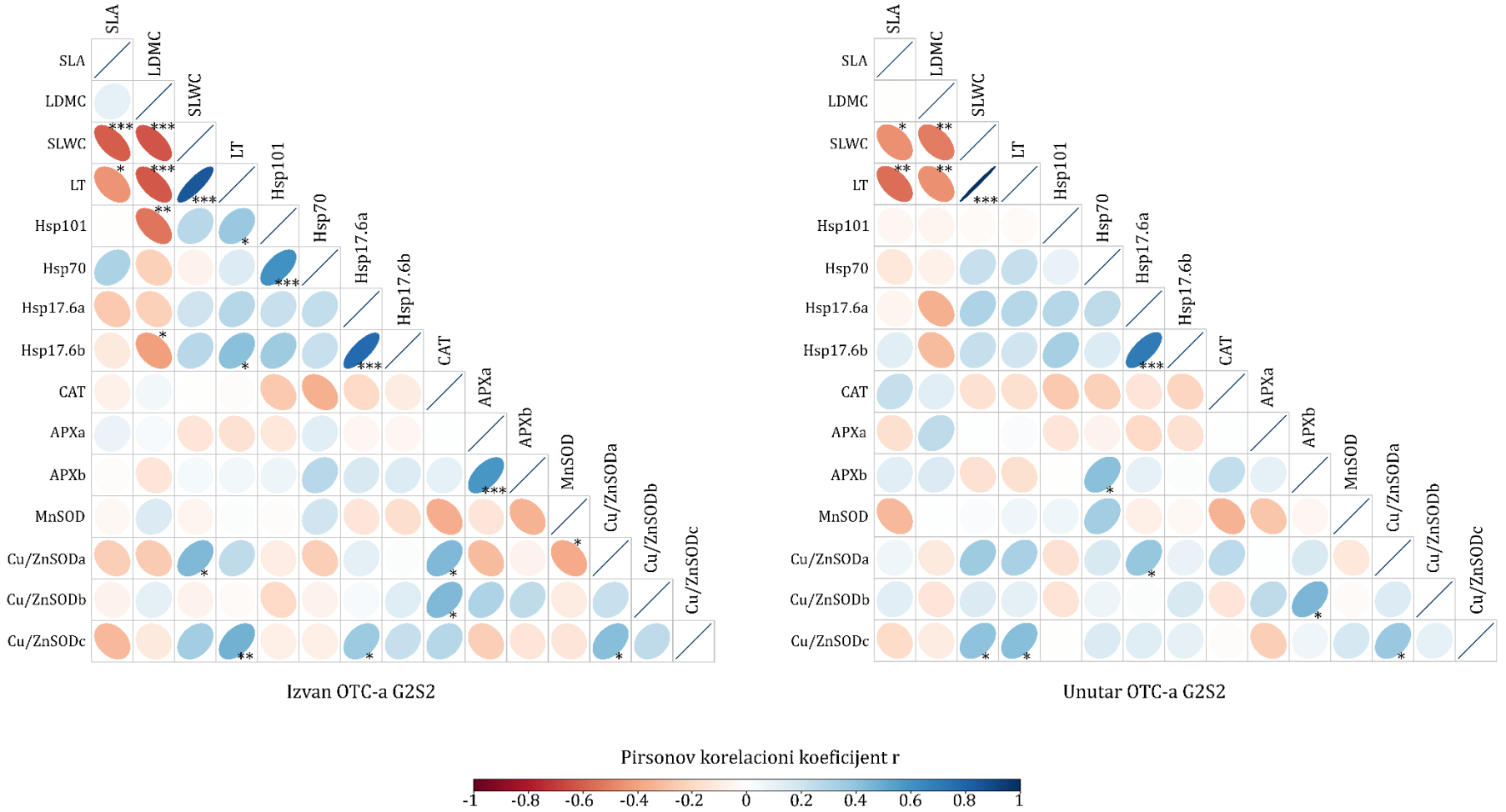
Slika 4.5.6. Toplotne mape korelacija između parova anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom leta prve godine eksperimenta *in situ*.

Prikazani su Pirsonovi koeficijenti korelacije (r) između 15 osobina lista genotipova *I. pumila* koji su se razvijali izvan OTC-a (levo) i unutar OTC-a (desno), tokom leta prve godine (G1S2). Analizirane su anatomsko-morfološke osobine (SLA, LDMC, SLWC, LT) i biohemijske osobine: relativne količine proteina toplotnog stresa (Hsp101, Hsp70, Hsp17.6a, Hsp17.6b) i antioksidativnih enzima (CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc). Gradijent boje i izduženost elipse odražavaju smer i jačinu korelacija. Statistička značajnost korelacija označena je zvezdicama: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.



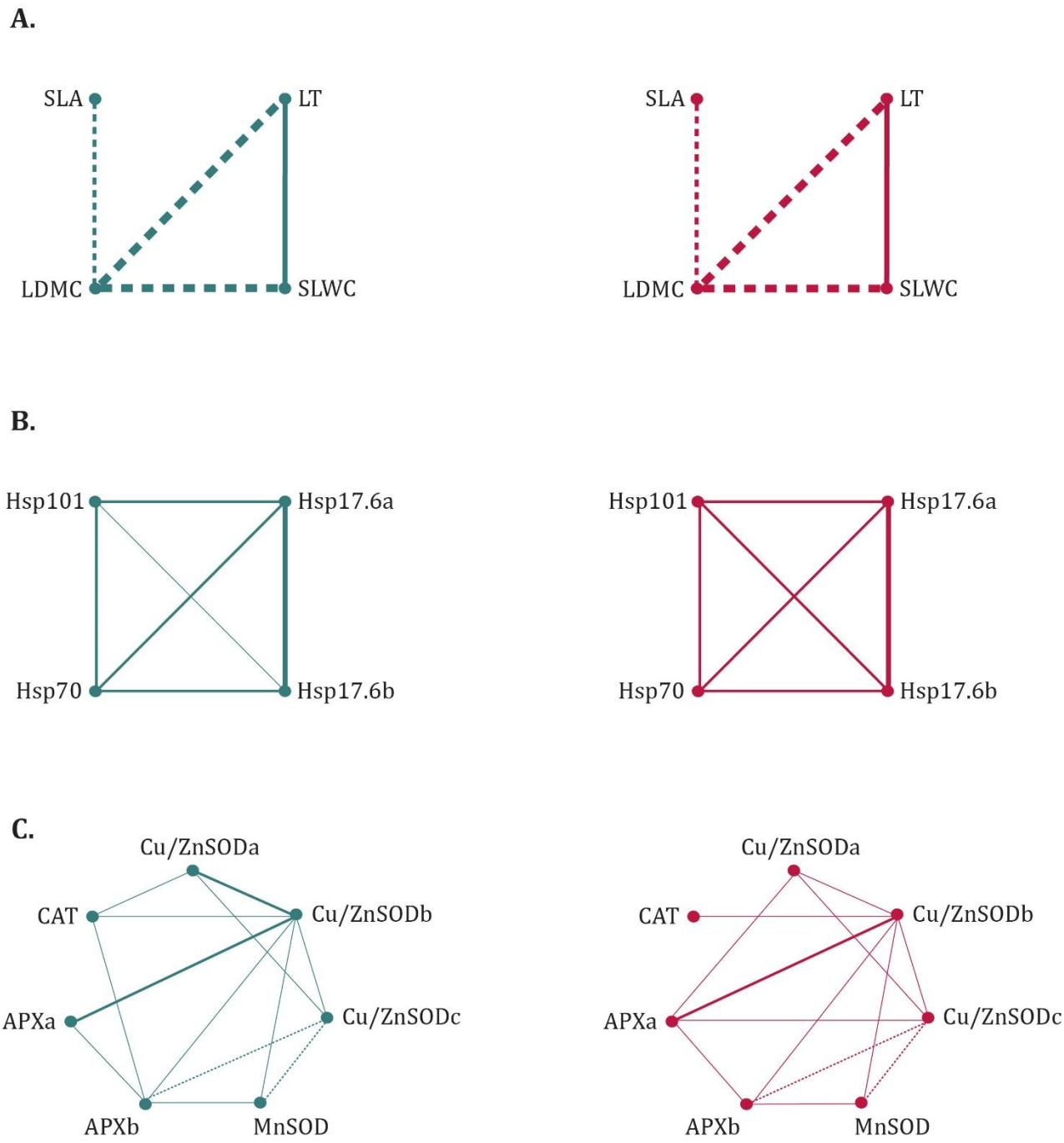
Slika 4.5.7. Toplotne mape korelacija između parova anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom proleća druge godine eksperimenta *in situ*.

Prikazani su Pirsonovi koeficijenti korelacije (r) između 15 osobina lista genotipova *I. pumila* koji su se razvijali izvan OTC-a (levo) i unutar OTC-a (desno), tokom proleća druge godine (G2S1). Analizirane su anatomsko-morfološke osobine (SLA, LDMC, SLWC, LT) i biohemijske osobine: relativne količine proteina toplotnog stresa (Hsp101, Hsp70, Hsp17.6a, Hsp17.6b) i antioksidativnih enzima (CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc). Gradijent boje i izduženost elipse odražavaju smer i jačinu korelacija. Statistička značajnost korelacija označena je zvezdicama: * $P < 0,05$; ** $P < 0.01$: *** $P < 0.001$.



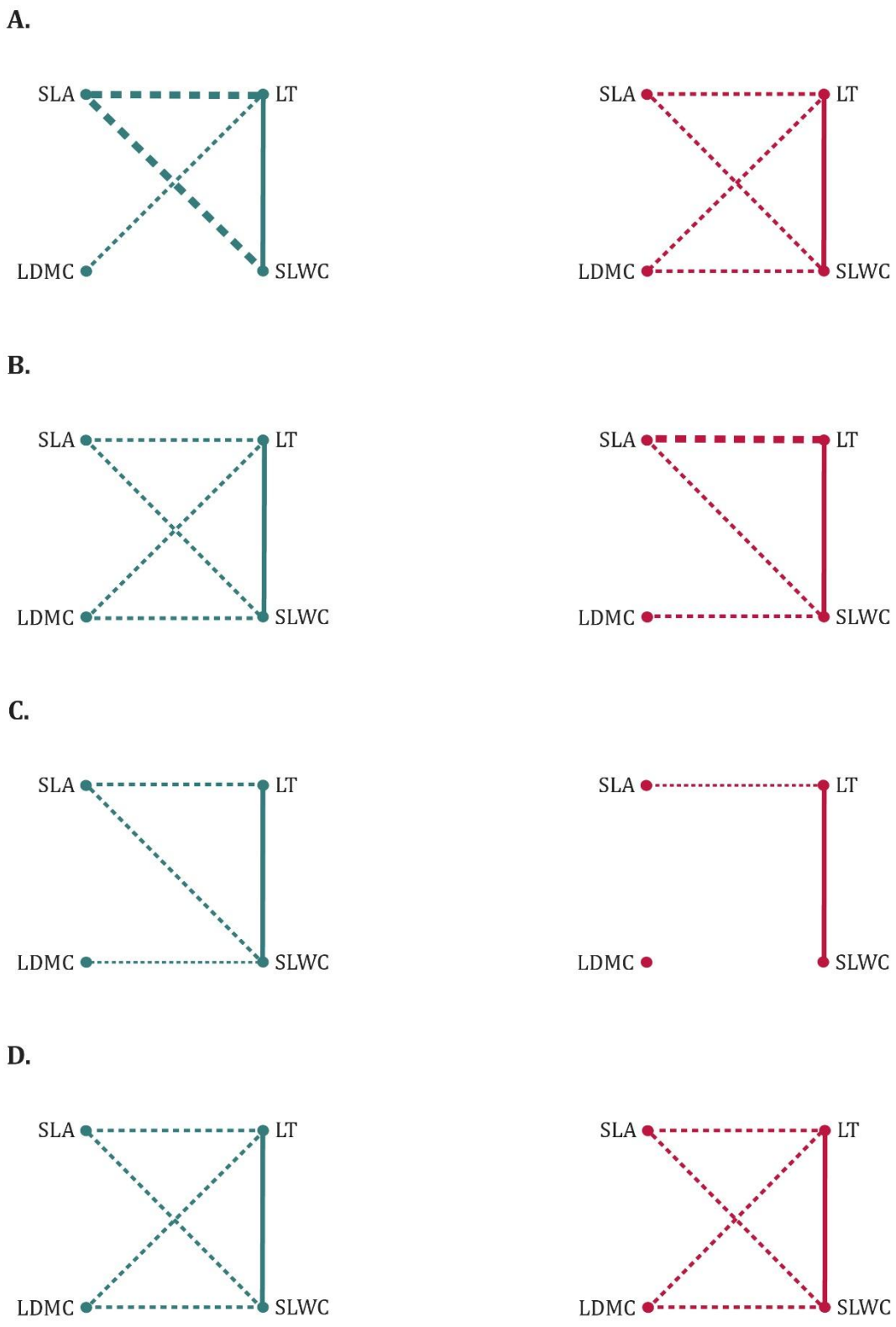
Slika 4.5.8. Toplotne mape korelacija između parova anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* u dve različite temperaturne sredine tokom leta druge godine eksperimenta *in situ*.

Prikazani su Pirsonovi koeficijenti korelacije (r) između 15 osobina lista genotipova *I. pumila* koji su se razvijali izvan OTC-a (levo) i unutar OTC-a (desno), tokom leta druge godine (G2S2). Analizirane su anatomsko-morfološke osobine (SLA, LDMC, SLWC, LT) i biohemijske osobine: relativne količine proteina toplotnog stresa (Hsp101, Hsp70, Hsp17.6a, Hsp17.6b) i antioksidativnih enzima (CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc). Gradijent boje i izduženost elipse odražavaju smer i jačinu korelacija. Statistička značajnost korelacija označena je zvezdicama: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0.001$.



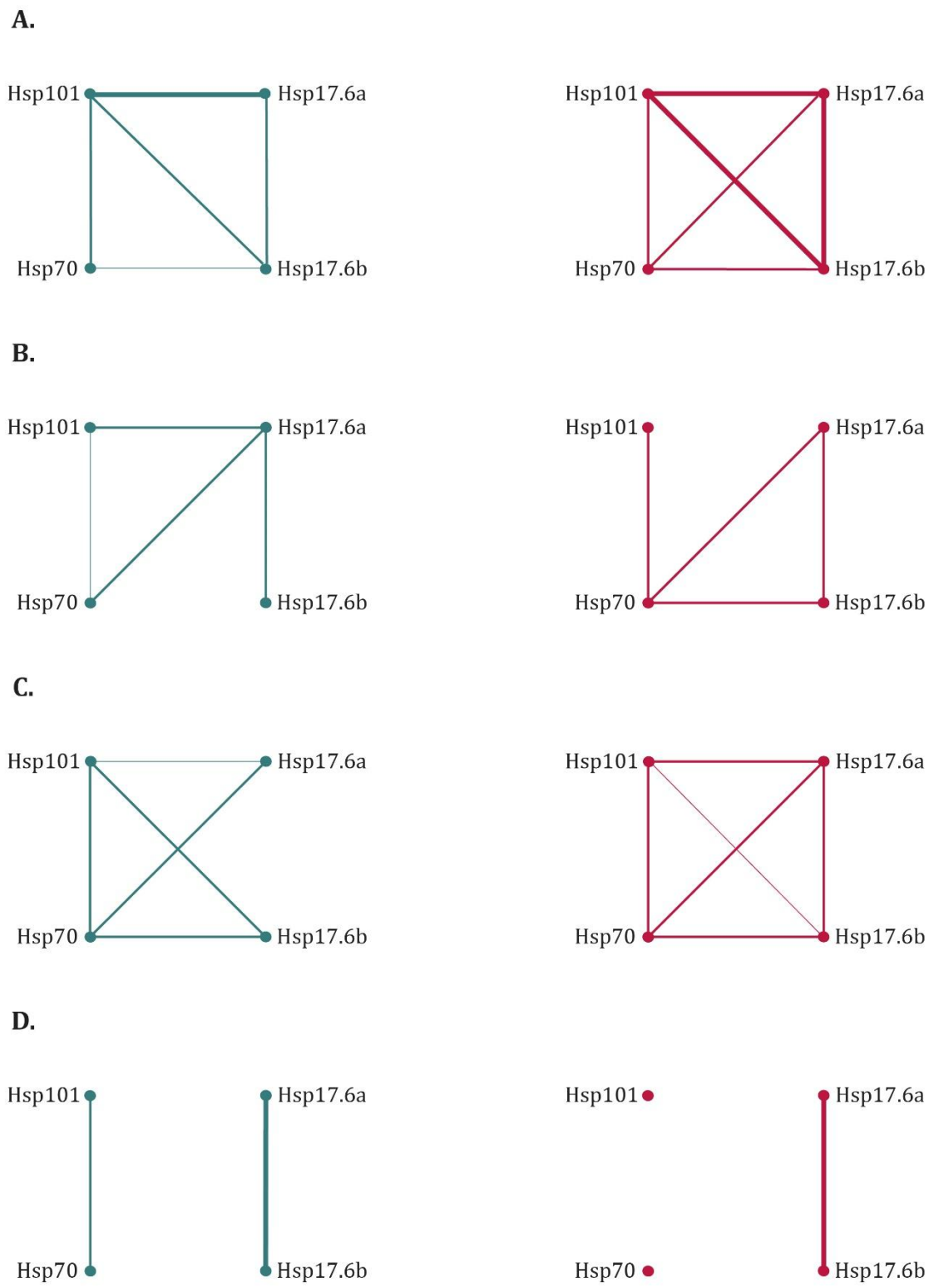
Slika 4.5.9. Obrasci korelacija između funkcionalno povezanih osobina lista *I. pumila* u dve temperaturne sredine tokom celokupnog eksperimentalnog perioda *in situ*.

Prikazani su obrasci korelacija između funkcionalno povezanih osobina lista genotipova *I. pumila* koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom celokupnog eksperimentalnog perioda. Obrasci korelacija (**A.**) anatomsko-morfoloških osobina, (**B.**) proteina toplotnog stresa i (**C.**) antioksidativnih enzima. Korelacije su izražene Pirsonovim koeficijentom korelacije (r). Statistički značajne pozitivne korelacije prikazane su punim, a statistički značajne negativne korelacije isprekidanim linijama. Jačina korelacija predstavljena je debljinom linija: najtanje linije označavaju slabe ($0 < |r| < 0,4$), srednje debele umerene ($0,4 < |r| < 0,7$), a najdeblje jake korelacije ($|r| \geq 0,7$).



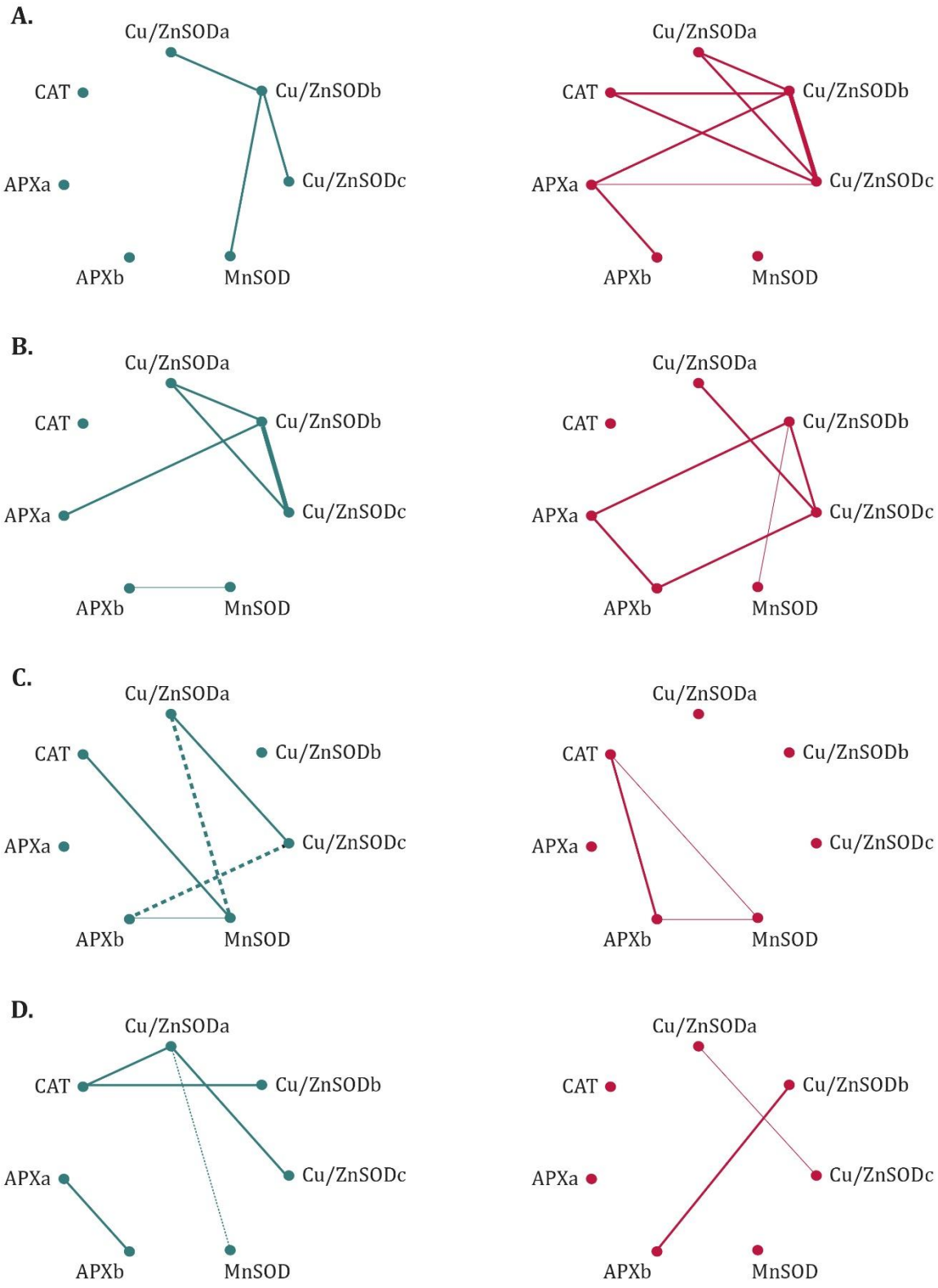
Slika 4.5.10. Obrasci korelacija između anatomsko-morfoloških osobina lista *I. pumila* u dve temperaturne sredine *in situ*.

Prikazani su obrasci korelacija između anatomsko-morfoloških osobina lista genotipova *I. pumila* koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom: (**A.**) proleća prve godine, (**B.**) leta prve godine, (**C.**) proleća druge godine i (**D.**) leta druge godine. Korelacije su izražene Pirsonovim koeficijentom korelacije (r). Statistički značajne pozitivne korelacije prikazane su punim, a statistički značajne negativne korelacije isprekidanim linijama. Jačina korelacija predstavljena je debljinom linija: najtanje linije označavaju slabe ($0 < |r| < 0,4$), srednje debele umerene ($0,4 < |r| < 0,7$), a najdeblje jake korelacije ($|r| \geq 0,7$).



Slika 4.5.11. Obrasci korelacija između Hsp u listovima *I. pumila* u dve temperaturne sredine *in situ*.

Prikazani su obrasci korelacija između relativnih količina proteina toplotnog stresa u listovima genotipova *I. pumila* koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom: (**A.**) proleća prve godine, (**B.**) leta prve godine, (**C.**) proleća druge godine i (**D.**) leta druge godine. Korelacije su izražene Pirsonovim koeficijentom korelacije (r). Statistički značajne pozitivne korelacije prikazane su punim, a statistički značajne negativne korelacije isprekidanim linijama. Jačina korelacija predstavljena je debljinom linija: najtanje linije označavaju slabe ($0 < |r| < 0,4$), srednje debele umerene ($0,4 < |r| < 0,7$), a najdeblje jake korelacije ($|r| \geq 0,7$).

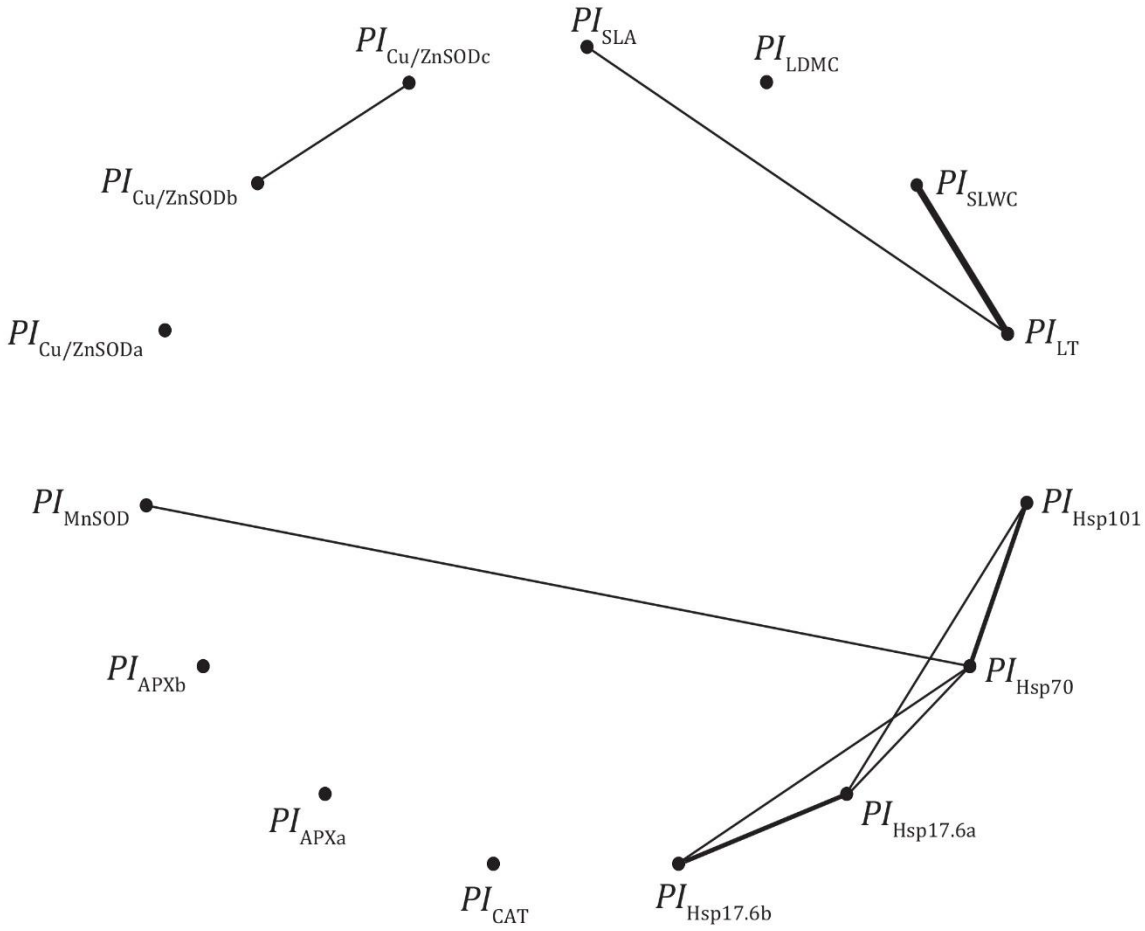


Slika 4.5.12. Obrasci korelacija između antioksidativnih enzima u listovima *I. pumila* u dve temperaturne sredine *in situ*.

Prikazani su obrasci korelacija između relativnih količina antioksidativnih enzima u listovima genotipova *I. pumila* koji su se razvijali izvan (zeleno) i unutar (crveno) OTC-a, tokom: (**A.**) proleća prve godine, (**B.**) leta prve godine, (**C.**) proleća druge godine i (**D.**) leta druge godine. Korelacije su izražene Pirsonovim koeficijentom korelacije (r). Statistički značajne pozitivne korelacije prikazane su punim, a statistički značajne negativne korelacije isprekidanim linijama. Jačina korelacija predstavljena je debljinom linija: najtanje linije označavaju slabe ($0 < |r| < 0,4$), srednje debele umerene ($0,4 < |r| < 0,7$), a najdeblje jake korelacije ($|r| \geq 0,7$).

Podudarnost parova korelacionih matrica funkcionalno povezanih osobina lista između temperaturnih tretmana procenjena je Mantelovim testom. Obrasci korelacionih matrica anatomsko-morfoloških osobina lista bili su visoko podudarni između temperaturnih tretmana tokom obe sezone i obe godine, ali je ta podudarnost bila statistički značajna samo u leto prve i proleće druge godine (G1S1: r = 0,924; *P* = 0,167; G1S2: r = 0,968; *P* = 0,042; G2S1: r = 0,992; *P* = 0,042; G2S2: r = 0,977; *P* = 0,167). Podudarnost korelacionih matrica Hsp između temepraturnih tretmana zavisila je od sezone i godine. U poleće prve godine i leto druge godine matrice su bile delimično slične, ali je ta sličnost bila statistički značajna samo u leto druge godine (G1S1: r = 0,636; *P* = 0,125; G2S2: r = 0,574; *P* = 0,042). Nasuprot tome, u leto prve i proleće druge godine matrice nisu bile podudarne (G1S2: r = 0,375; *P* = 0,167; G2S1: r = -0,443; *P* = 0,833). Obrasci korelacionih matrica antioksidativnih enzima između temperaturnih tretmana bili su nepodudarni u proleće prve godine (r = 0,344; *P* = 0,142), i slični u ostalim vremenskim tačkama (G1S2: r = 0,573; *P* = 0,004; G2S1: r = 0,737; *P* = 0,001; G2S2 r = 0,577; *P* = 0,011). Sveukupno, stabilnost korelacionih struktura između temperaturnih tretmana zavisila je od funkcionalne grupe osobina i sezonskog konteksta, pri čemu su obrasci anatomsko-morfoloških osobina bili konzistentniji kroz vreme u poređenju sa biohemijskim grupama osobina (Hsp i antioksidativni enzimi).

Dodatno, analizirana je korelisanost indeksa plastičnosti (PI_T) ispitivanih osobina lista. Detektovano je deset značajnih korelacija (sve pozitivne), pretežno unutar funcionalnih modula (Slika 4.5.13). Najveći broj značajnih korelacija (šest) utvrđen je za modul Hsp, pri čemu su svi analizirani šaperoni međusobno bili umereno do jako korelisani). Za modul anatomsko-morfoloških osobina detektovane su dve značajne korelacije (PI_{LT}–PI_{SLWC} i PI_{SLA}–PI_{LT}). Za modul antioksidativnih enzima uočena je samo jedna značajna korelacija - između plastičnosti dve izoforme Cu/ZnSOD. Između različitih funkcionalnih modula, statistički značajna je bila samo korelacija PI_{Hsp70} i PI_{MnSOD}. Ovakav obrazac ukazuje na to da funkcionalno povezane osobine pokazuju sličnije obrasce plastičnosti u odnosu na osobine koje pripadaju različitim modulima.



Slika 4.5.13. Obrasci korelacija između parova indeksa fenotipske plastičnosti osobina lista *I. pumila* tokom celokupnog eksperimentalnog perioda *in situ*.

Prikazani su obrasci korelacija između indeksa fenotipske plastičnosti (PI_T) 15 osobina lista *I. pumila* tokom celokupnog eksperimentalnog perioda. Analizirani su indeksi plastičnosti anatomsko-morfoloških osobina (SLA, LDMC, SLWC, LT) i biohemijskih osobina: relativnih količina proteina toplotnog stresa (Hsp101, Hsp70, Hsp17.6a, Hsp17.6b) i antioksidativnih enzima (CAT, APXa, APXb, MnSOD, Cu/ZnSODa, Cu/ZnSODb, Cu/ZnSODc). Korelacije su izražene Spirmanovim koeficijentom korelacije (ρ). Statistički značajne pozitivne korelacije prikazane su punim, a statistički značajne negativne korelacije isprekidanim linijama. Jačina korelacija predstavljena je debljinom linija: najtanje linije označavaju slabe ($0 < |\rho| < 0,4$), srednje deblja linija umerene ($0,4 < |\rho| < 0,7$), a najdeblja jake korelacije ($|\rho| \geq 0,7$). Opis skraćenica i jedinice dati su u Tabeli 3.3.2.

5. DISKUSIJA

5.1. Anatomsko-morfološki i biohemijski aspekti odgovora biljaka na povećanje temperature

Iako se uticaj ekstremnih temperatura na biljke intenzivno proučava, odgovori biljaka na relativno mala ali dugotrajna povećanja temperature, karakteristična za globalno zagrevanje, i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Listovi su vegetativni organi neposredno izloženi promenama spoljašnje sredine pa se promene temperaturnih uslova mogu brzo odraziti na njihov odgovor na anatomskom, morfološkom, biohemijskom i fiziološkom nivou (Atkin i sar., 2006; Wang i sar., 2020). Rezultati ove studije pokazuju da i relativno mali porast temperature dovodi do promena u anatomsko-morfološkim i biohemijskim osobinama lista *I. pumila*, pri čemu se pravac i intenzitet ovih promena razlikuju u zavisnosti od osobine, sezone i godine istraživanja (Manitašević Jovanović i sar., 2023). Ovakvi obrasci ukazuju na značajnu ulogu fenotipske plastičnosti u odgovoru biljaka na temperaturne promene, ali istovremeno pokazuju da taj odgovor nije uniforman, već zavisi od funkcionalne uloge same osobine kao i sredinskog konteksta.

5.1.1. Anatomsko-morfološki odgovori lista na povećanje temperature

Analizirane osobine lista predstavljaju važne komponente spektra ekonomije lista (LES), čije variranje i međusobna povezanost odražavaju ekološki kompromis između strategija usvajanja, korišćenja i očuvanja resursa kod biljaka (Westoby, 1998; Westoby i sar., 2002; Diaz i sar., 2004; Freschet i sar., 2010; Garnier i Navas, 2012; Kassout i sar., 2019;). U ovom istraživanju, specifična površina lista (SLA) i sadržaj suve materije u listu (LDMC) razmatrane su kao funkcionalne osobine povezane sa rastenjem, razvojem i preživljavanjem, dok su specifični sadržaj vode u listu (SLWC), debljina lista (LT), gustina stoma (SD) i indeks stoma (SI) razmatrane kao mehanističke osobine, jer neposrednije odražavaju fiziološke procese usvajanja i korišćenja resursa, vodni status, strukturu i termalnu dinamiku lista (Kassout i sar., 2019). S obzirom na to da temperatura predstavlja jedan od najvažnijih faktora spoljašnje sredine koji utiče na rastenje, razvoj i fiziologiju biljaka, očekuje se da globalno zagrevanje može značajno uticati na osobine povezane sa strukturom i funkcijom lista (Nicotra i sar., 2010; Madani i sar., 2018; Liu i Raftery, 2021). Rezultati ove studije pokazuju da je eksperimentalno povećanje temperature *in situ* imalo značajan uticaj na vrednosti SLA, LDMC, SLWC i LT, dok su osobine stominog aparata, SD i SI, bile izraženije uslovljene sezonskim kontekstom nego samim efektom temperaturnog tretmana. Ovakav obrazac ukazuje da funkcionalne i mehanističke osobine ne reaguju uniformno na povećanje temperature, već da njihova dinamika zavisi od kombinacije direktnih i kontekstualnih faktora.

Među analiziranim funkcionalnim osobinama, SLA predstavlja jedan od ključnih pokazatelja strategije korišćenja resursa, jer odražava odnos između lisne površine i suve mase, odnosno stepen ulaganja biljke u površinu za usvajanje svetlosti u odnosu na ulaganje u strukturnu biomasu (Knapp i sar., 2012; Madani i sar., 2018). Pokazano je da je solarno zračenje jedan od ključnih faktora koji određuju prostornu varijabilnost SLA na velikim prostornim skalama, dok na manjim prostornim skalama značajnu ulogu ima i dostupnost resursa (Madani i sar., 2018). Od svih analiziranih anatomsko-morfoloških osobina lista tokom dve godine eksperimenta, SLA je bila jedina osobina čije su prosečne vrednosti bile više kod rameta razvijenih unutar OTC-a nego kod rameta istih genotipova razvijenih izvan OTC-a. Ovakav rezultat ukazuje da formiranje listova sa većom površinom u odnosu na masu može predstavljati jedan od fenotipskih odgovora *I. pumila* na toplije uslove staništa. Takav odgovor potencijalno može povećati površinu dostupnu za presretanje svetlosti i doprineti efikasnijem odavanju toplote,

ali se njegovo fiziološko značenje mora tumačiti oprezno, jer u ovom delu istraživanja nisu direktno merene komponente razmene gasova, fotosintetska aktivnost niti transpiracija. Iako brojna istraživanja pokazuju da SLA raste sa porastom temperature (Atkin i sar., 2006; Rosbakh i sar., 2015; Kühn i sar., 2021), odnos između SLA i temperature nije univerzalno pozitivan, već zavisi od vrste, ekosistema i specifičnih uslova sredine (Henn i sar., 2018; Kühn i sar., 2021). Tako, pojedine studije pokazuju da SLA opada pri povišenim temperaturama, što se interpretira kao odgovor na toplotni stres, bilo kroz smanjeno širenje lista, bilo kroz povećanje njegove debljine (Manitašević i sar., 2007; Leigh i sar., 2012; Rodríguez i sar., 2015; Leigh i sar., 2017). U ovom istraživanju, uprkos značajnom efektu temperaturnog tretmana, nije utvrđena linearna povezanost između SLA i prosečne temperature vazduha tokom razvića lista. Ovakav rezultat ukazuje da temperatura, izolovano posmatrano, nije bila dovoljan prediktor variranja SLA u prirodnim uslovima. S obzirom na to da se listovi u *in situ* uslovima razvijaju pod istovremenim uticajem temperature, dostupnosti vode, svetlosnih uslova i drugih mikroklimatskih faktora, sezonske promene SLA odražavaju kombinovani efekat više sredinskih varijabli, a ne jednostavan linearan odgovor na porast temperature. Dwyer i saradnici (2014) pokazali su da se SLA značajno menja između godina sa različitim režimom padavina. U našem istraživanju, sezonski obrazac promene SLA bio je suprotan obrascu promene vlažnosti zemljišta, što sugeriše da odgovor ove osobine nije bio uslovljen samo temperaturom, već i vodnim režimom staništa. Budući da odgovor SLA na dostupnost vode nije univerzalan, već zavisi od vrste i sredinskog konteksta (Wellstein i sar., 2017), sezonske promene SLA kod *I. pumila* mogu se tumačiti kao posledica kombinovanog delovanja temperature i dostupnosti vode.

Nasuprot povećanju SLA sa porastom temperature, vrednosti LDMC bile su niže pri višim temperaturama, što ukazuje na suprotan pravac odgovora ove dve funkcionalne osobine na blago povećanje temperature. LDMC odražava stepen ulaganja u suvu materiju i strukturnu izgradnju lista, pri čemu se više vrednosti uglavnom povezuju sa čvršćim, dugotrajnijim i otpornijim tkivima, dok niže vrednosti mogu ukazivati na strategiju bržeg rastenja i intenzivnijeg prometa resursa (Díaz i sar., 2016; Reich, 2014). U tom smislu, smanjenje LDMC kod *I. pumila* može se tumačiti kao smanjeno relativno ulaganje u strukturne komponente lista pri povišenoj temperaturi. Odnos između LDMC i globalnog zagrevanja složen je i zavisi od konteksta, jer odgovor ove osobine može varirati u zavisnosti od vrste, ekosistema, dostupnosti resursa i promene vodnog statusa biljke (Duru i sar., 2008; Liancourt i sar., 2015; Niklas i sar., 2023). S obzirom na to da se pri višim temperaturama, u zavisnosti od dostupnosti vode i hranljivih materija, mogu povećati i usvajanje hranljivih materija i intenzitet asimilacije, uočeni trend opadanja LDMC sa porastom temperature mogao bi se posredno povezati sa većim ulaganjem azota u fotosintetski aparat, a time i sa intenzivnijom respiracijom lista i proizvodnjom biomase (Taber i Mitchell, 2023). Povišena temperatura može uticati na LDMC i posredno, preko promena u vodnom statusu, budući da visoke temperature mogu povećati evapotranspiraciju i gubitak vode iz biljnih tkiva (Akram i sar., 2022). U tom kontekstu, smanjenje LDMC sa porastom temperature kod *I. pumila* može ukazivati na reorganizaciju funkcionalnih osobina lista u pravcu manjeg relativnog ulaganja u suvu materiju i strukturno otpornija tkiva, uz potencijalno intenzivniji metabolizam i brži promet materije . Ovakav obrazac sugeriše da blago i dugotrajno povećanje temperature nije podstaklo konzervativniju strategiju lista, već pomeranje ka fenotipu koji je povezan sa bržim korišćenjem resursa. Uprkos nižim prosečnim vrednostima LDMC pri povišenoj temperaturi, utvrđena pozitivna povezanost između LDMC i prosečne temperature vazduha tokom razvića lista ukazuje na to da odnos ove osobine i temperature nije bio jednostavan ni linearan. Izražena vremenska dinamika LDMC, suprotna obrascu uočenom za SLA, sugeriše da je odgovor ove osobine bio dodatno oblikovan sezonskim promenama drugih faktora sredine. Istovremeno, inverzne promene SLA i LDMC zajedno sa negativnom korelacijom između ovih osobina, ukazuju na uzajamno ograničenje (*engl.* trade-off) između povećanja lisne površine i ulaganja u strukturne komponente lista.

Međutim, budući da ovaj odnos nije bio značajan u svim vremenskim tačkama, može se zaključiti da povezanost SLA i LDMC zavisi od specifičnog sredinskog konteksta u kome se list razvija.

SLWC je mehanistička osobina kojaneposredno odražava vodni status lisnog tkiva i povezan je sa termalnom regulacijom i asimilacijom ugljenika (Michaletz i sar., 2015; Wang i sar., 2022). Promene u obrascima padavina i dostupnosti vode, koje prate globalno zagrevanje, mogu uticati na ukupni vodni status biljaka, a time i na vrednosti SLWC (Wang i sar., 2022). S obzirom na to da različite biljne vrste ispoljavaju različit kapacitet za prilagođavanje promenama temperature i dostupnosti vode (Nicotra i sar., 2010), kao i da je SLWC kvantitativno povezan sa drugim osobinama lista, uključujući fotosintetski kapacitet, SLA i LDMC, ova osobina može se koristiti kao indikator aklimacije/aklimatizacije vrsta na promene uslova sredine (Wang i sar., 2022). Kod *I. pumila*, vrednosti SLWC bile su više kod rameta razvijenih izvan OTC-a, odnosno pri nižoj ambijentalnoj temperaturi, nego kod rameta istih genotipova razvijenih unutar OTC-a. Ovakav obrazac ukazuje da je blago povećanje temperature povezano sa promenama u hidrataciji lisnog tkiva i ravnoteži između usvajanja, zadržavanja i gubitka vode. U skladu sa tim, negativna povezanost između SLWC i prosečne temperature vazduha tokom razvića lista, utvrđena u oba temperaturna tretmana, dodatno ukazuje da topliji uslovi tokom razvića lista mogu doprineti formiranju listova sa nižim relativnim sadržajem vode. Za razliku od ranijih navoda prema kojima su varijacije LDMC, a posredno i SLWC, relativno stabilne tokom vegetacionog perioda (Al Haj Khaled i sar., 2005), rezultati ovog istraživanja pokazali su da su prosečne vrednosti SLWC značajno varirale između proleća i leta. Ovakav obrazac sugeriše da vodni status listova *I. pumila* ne zavisi samo od temperaturnog tretmana, već i od neposrednog mikroklimatskog konteksta u kome se list razvija, uključujući temperaturu vazduha i sezonske razlike u vodnom režimu staništa.

LT je mehanistička osobina povezana sa morfološkom i strukturnom organizacijom lista. U okviru LES-a, ova osobina može se tumačiti u kontekstu kompromisa između ulaganja u brže rastenje, sa jedne strane, i tolerancije na sušu i visoke temperature, sa druge strane. Tanji listovi imaju veći odnos površine prema zapremini, što može olakšati rasipanje viška toplote i doprineti efikasnijem hlađenju lista u uslovima povišene temperature (Leigh i sar., 2012; Ivanova i sar., 2016; Bramley i sar., 2022). Sa druge strane, manja debljina lista ukazuje na slabiju strukturnu potporu i manji kapacitet za zadržavanje vode, zbog čega se redukcija LT može tumačiti kao adaptivna modifikacija koja doprinosi ublažavanju toplotnog stresa i efikasnijem odavanju toplote (Syvertsen i Levy, 1982; Monteiro i sar., 2016; Gratani i sar., 2018). Odnos između LT i povećanja temperature nije univerzalan, već zavisi od vrste, uslova sredine, kao i intenziteta i trajanja zagrevanja (Coneva i Chitwood, 2018). U pojedinim studijama eksperimentalno zagrevanje dovodilo je do povećanja ukupne debljine lista ili pojedinih anatomskih slojeva, što se tumači kao strukturna modifikacija koja može doprineti smanjenju gubitka vode putem transpiracije (Schollert i sar., 2015; Kolyva i sar., 2025). Nasuprot tome, u drugim istraživanjima zabeleženo je smanjenje LT pri povišenoj temperaturi, često praćeno smanjenjem mase lista po jedinici površine što ukazuje na pomeranje alokacije resursa sa strukturnog ulaganja ka intenzivnijem usvajanju resursa (Wu i sar., 2020). Slični rezultati dobijeni su i u dugotrajnom *in situ* eksperimentalnom zagrevanju u tundri, gde je smanjenje LT bilo izraženo kod pojedinih žbunastih vrsta, ali nije nužno pratilo promene fotosintetske aktivnosti (Zhou i sar., 2019). Ovi nalazi ukazuju da pravac promene LT zavisi od vrste, trajanja i intenziteta zagrevanja, kao i od šireg ekološkog konteksta. U ovom istraživanju, vrednosti LT bile su niže pri višim temperaturama vazduha, što ukazuje na to da je malo povećanje temperature bilo povezano sa formiranjem tanjih listova. Dodatno, negativna povezanost između LT i prosečne temperature vazduha tokom razvića lista u oba temperaturna tretmana, potvrđuje da je smanjenje debljine lista bilo povezano sa toplijim uslovima tokom njegovog razvića. Slična sezonska dinamika LT i SLWC sugeriše da promene u debljini lista

delimično odražavaju promene u hidrataciji lisnog tkiva i kapacitetu za zadržavanje vode. Ovakav obrazac se može tumačiti kao brz fenotipski odgovor lista na toplije uslove koji doprinosi zaštiti lisnog tkiva od pregrevanja. Tome u prilog ide i stabilna pozitivna povezanost između LT i SLWC, koja ukazuje da su debljina lista i vodni status lista kod *I. pumila* funkcionalno povezani.

SD i SI predstavljaju osobine lista povezane sa organizacijom epidermisa i potencijalnim kapacitetom lista za razmenu gasova. Njihove vrednosti se u velikoj meri uspostavljaju tokom razvića lista i diferencijacije epidermalnih ćelija, iako na SD naknadno može uticati i širenje lisne površine tokom rastenja (Casson i Hetherington, 2010; Lawson i Blatt, 2014). U ovom istraživanju, SD i SI su pokazale izražen sezonski obrazac variranja, dok sam temperaturni tretman nije doveo do konzistentnih promena ovih osobina. Ovakav rezultat ukazuje da osobine stominog aparata kod *I. pumila* nisu reagovale na povećanje temperature kao jednostavan i jednosmeran odgovor, već su bile snažno uslovljene sezonskim kontekstom u kome se list razvijao. Značajna interakcija između sezone i temperaturnog tretmana za SD pokazuje da je efekat zagrevanja na gustinu stoma zavisio od uslova koji su vladali u proleće i leto. Više vrednosti SD na ambijentalnoj temperaturi u proleće, nasuprot višim vrednostima SD na povišenoj temperaturi tokom leta, ukazuju da isti temperaturni tretman može imati različite posledice u zavisnosti od sezonskog mikroklimatskog okruženja. Takav obrazac je u skladu sa nalazima da odgovor SD i SI na zagrevanje nije univerzalan, već zavisi od vrste, intenziteta tretmana i drugih činilaca sredine, naročito vodnog i svetlosnog režima (Ferris i sar., 2001; Zheng i sar., 2013). Dostupnost vode i atmosferski uslovi mogu dodatno modifikovati promenu gustine stoma izazvanu temperaturom, što je posebno važno u prirodnim uslovima, gde se efekat zagrevanja ispoljava zajedno sa sezonskim promenama temperature vazduha, temperature lista, temperature zemljišta i vlažnosti zemljišta (Xu i Zhou, 2008; Bertolino i sar., 2019). Za razliku od SD, SI izražava odnos broja stoma i ukupnog broja epidermalnih ćelija, pa je manje neposredno zavisan od promena veličine ćelija i ekspanzije lista, a više od procesa diferencijacije epidermisa (Casson i Hetherington, 2010). Značajan sezonski efekat za SI, uz odsustvo efekta temperaturnog tretmana, ukazuje da je kod *I. pumila* relativna zastupljenost stoma u epidermisu više uslovljena sezonskim uslovima razvoja lista nego samim blagim eksperimentalnim povećanjem temperature. Posmatrano zajedno, dobijeni rezultati za SD i SI pokazuju daosobine stominog aparata *I. pumila* nisu bile primarno određene umerenim zagrevanjem, već sezonskom heterogenošću sredine.

Na populacionom nivou, funkcionalne i mehaničke osobine lista nisu pokazale isti stepen diferencijacije. Funkcionalne osobine ispoljile su slabiju populacionu diferencijaciju, što ukazuje da su osnovni obrasci ulaganja u lisnu površinu i suvu materiju bili slični u obe populacije. Ipak, marginalno značajan efekat populacije na SLA mogao bi bi ukazivati na izvesnu diferencijaciju populacija u pogledu ove osobine. Međutim, ovaj obrazac ostaje relativno slab, što može biti povezano sa činjenicom da je SLA funkcionalna osobina čija vrednost zavisi od većeg broja sredinskih činilaca i odlikuje se izraženom fenotipskom varijabilnošću unutar vrste (Wilson i sar., 1999; Avramov i Tucic, 2006; Wellstein i sar., 2013; Siefert i sar., 2015; Henn i sar., 2018). Nasuprot tome, jasnije populacione razlike uočene su za pojedine mehaničke osobine, pre svega SLWC i LT, ali ne i SD i SI, što sugeriše da se populaciona diferencijacija kod *I. pumila* može ispoljiti i unutar istog tipa staništa, pre svega kroz osobine koje neposrednije odražavaju vodni status i strukturnu organizaciju tkiva.

Eksperimenti sprovedeni u kontrolisanim *ex situ* uslovima predstavljaju važan metodološki pristup u ekofiziološkim istraživanjima, jer omogućavaju jasnije razdvajanje efekata pojedinačnih faktora sredine od složene varijabilnosti prisutne u prirodnim populacijama. Za razliku od *in situ* eksperimenata, u kojima se efekat povećanja temperature ispoljava zajedno sa promenama intenziteta svetlosti, vlažnosti vazduha, dostupnosti vode i drugih

mikroklimatskih faktora, *ex situ* eksperimenti omogućavaju da se odgovor biljaka neposrednije poveže sa manipulisanim temperaturnim režimom. Na taj način se obezbeđuje pouzdanija interpretacija uzročno-posledičnih odnosa između abiotičkog faktora i odgovora biljke. U ovoj studiji, kontrolisanim *ex situ* eksperimentom sprovedenim u sobi za gajenje biljaka ispitivan je aklimacioni potencijal *I. pumila* u odgovoru funkcionalnih i mehanističkih osobina lista na blago povećanje temperature od 1 °C. Dobijeni rezultati pokazali su da je i relativno malo i kratkotrajno povećanje temperature bilo dovoljno da izazove značajne promene u analiziranim osobinama. Pravac i intenzitet odgovora bili su specifični za svaku osobinu, ali su opšti obrasci promena u velikoj meri bili u skladu sa rezultatima *in situ* eksperimenta, što ukazuje na konzistentnost odgovora ove vrste na povišenu temperaturu.

Rameti izloženi kontrolisanom *ex situ* eksperimentalnom zagrevanju imali su veće vrednosti SLA od rameta istih genotipova gajenih na ambijentalnoj temperaturi. Ovaj rezultat potvrđuje obrazac uočen u *in situ* istraživanju i pokazuje da povećanje SLA predstavlja jedan od konzistentnih fenotipskih odgovora *I. pumila* na blago povećanje temperature (Manitašević Jovanović i sar., 2023; Hočevar i sar., 2025). Budući da je u *ex situ* eksperimentu temperatura bila jedini faktor kojim se ciljano manipulisalo, podudarnost obrazaca u dva metodološki različita eksperimentalna pristupa podržava zaključak da je porast SLA stabilan deo aklimacionog/aklimatizacionog odgovora ove vrste na toplije uslove staništa. Dodatno, povećanje SLA u kontrolisanim uslovima bilo je približno jednako najvećoj razlici između temperaturnih tretmana zabeleženoj u *in situ* eksperimentu tokom najmanje stresnog perioda, odnosno u proleće 2019. godine. Ovaj rezultat sugeriše da u prirodnim uslovima dodatni sredinski faktori mogu modifikovati ili ograničiti veličinu promene SLA izazvane temperaturom. Smanjenje LDMC pri povišenoj temperaturi, zabeleženo i u kontrolisanim i prirodnim uslovima, dodatno potvrđuje da je ovaj odgovor konzistentan bez obzira na eksperimentalni pristup. U kontekstu istovremenog porasta SLA, niže vrednosti LDMC ukazuju na smanjeno relativno ulaganje u suvu materiju i strukturne komponente lista, odnosno na pomeranje ka fenotipu povezanom sa bržim korišćenjem resursa. Time se u kontrolisanim uslovima potvrđuje funkcionalni kompromis između povećanja lisne površine i smanjenog ulaganja u strukturno konzervativnije lisno tkivo. Blago povećanje temperature u kontrolisanim uslovima dovelo je i do smanjenja vrednosti SLWC. Ovaj rezultat je u skladu sa obrascem dobijenim u *in situ* eksperimentu i ukazuje da povišena temperatura utiče na hidrataciju lisnog tkiva i ravnotežu između usvajanja, zadržavanja i gubitka vode (Yoo i sar., 2009; Sikorska i sar., 2017; Manitašević Jovanović i sar., 2023). Međutim, smanjenje SLWC u kontrolisanim uslovima bilo je manje od maksimalnog smanjenja zabeleženog u prirodnim populacijama, što sugeriše da je odgovor ove osobine u *in situ* uslovima verovatno dodatno oblikovan mikroklimatskim faktorima, pre svega dostupnošću vode i evaporativnim zahtevima sredine. Sličan obrazac uočen je i za LT. Vrednosti ove osobine bile su niže pri povišenoj temperaturi, što potvrđuje da blago zagrevanje može biti povezano sa formiranjem tanjih listova. Podudarnost sa rezultatima prethodnog *in situ* eksperimenta ukazuje da smanjenje LT predstavlja konzistentan odgovor *I. pumila* na toplije uslove. Istovremeno smanjenje LT i SLWC sugeriše da promene u debljini lista delimično odražavaju promene u hidrataciji lisnog tkiva i kapacitetu za zadržavanje vode.

Za razliku od prethodnog *in situ* eksperimenta, u kome temperaturni tretman nije doveo do konzistentne promene SD, već je odgovor zavisio od sezonskog konteksta, u kontrolisanim *ex situ* uslovima utvrđeno je povećanje vrednosti SD sa porastom temperature. Ovakav rezultat ukazuje da blago povećanje temperature može neposredno uticati na formiranje listova sa većom gustinom stoma, dok je u prirodnim uslovima ovaj odgovor modifikovan sezonskom i mikroklimatskom heterogenošću sredine u kojoj se list razvija. Budući da i relativno male promene u gustini stoma mogu značajno uticati na razmenu gasova i transpiraciju (Brodribb i sar., 2009; Urban i sar., 2017), uočeni porast SD od oko 20 % pri povećanju temperature za

svega 1 °C može ukazivati na izražen aklimacioni odgovor vrste *I. pumila*, koji potencijalno doprinosi efikasnijoj regulaciji vodnog režima i održavanju fotosintetske aktivnosti. Ipak, na osnovu ovih rezultata ne mogu se donositi pouzdani zaključci o intenzitetu transpiracije, jer provodljivost stoma i dinamika njihovog otvaranja nisu direktno merene (Lawson i Blatt, 2014).

S obzirom na to da sadržaj hlorofila nije bio analiziran u prethodnom *in situ* eksperimentu, kontrolisani *ex situ* uslovi omogućili su dodatni uvid u fiziološke posledice blagog povećanja temperature na fotosintetski aparat biljke. Povećanje temperature za svega 1 °C dovelo je do izrazite promene I_1 indeksa, što ukazuje na smanjenje količine hlorofila. Ova osobina pokazala je najizraženiji odgovor među svim analiziranim osobinama lista, što sugeriše da je fotosintetski aparat posebno osetljiv čak i na relativno blage temperaturne promene. Pozitivna korelacija količine hlorofila sa LDMC i LT, uz negativnu korelaciju sa SLA, ukazuje na mogući funkcionalni kompromis između dva različita načina povećanja fotosintetske efikasnosti. Deblji listovi, sa većim ulaganjem u suvu materiju i strukturnu organizaciju, mogu održavati veću količinu hlorofila, dok tanji listovi, sa većom specifičnom površinom, povećavaju površinu za presretanje svetlosti uz relativno manju količinu hlorofila (Li i sar., 2018). Smanjenje količine hlorofila pri povišenoj temperaturi može imati različito fiziološko značenje: kod pojedinih vrsta ono se tumači kao zaštitni odgovor na toplotni stres (Tardy i sar., 1998; Cutolo i sar., 2023), dok kod drugih može odražavati destabilizaciju fotosintetskog aparata i oštećenje fotosintetskih pigmenata (Silla i sar., 2010; Li i sar., 2018; Hu i sar., 2021). Pošto merenja razmene gasova i fotosintetske aktivnosti nisu sprovedena, fiziološke posledice ovako izraženog odgovora ne mogu se precizno razdvojiti, pa bi buduća istraživanja trebalo da uključe direktna merenja provodljivosti stoma, transpiracije i fotosintetskih parametara. Posmatrano zajedno, rezultati kontrolisanog *ex situ* eksperimenta pokazuju da i mali porast temperature može dovesti do koordinisanih promena u organizaciji lisnog tkiva, vodnom statusu i fotosintetskom aparatu vrste *I. pumila*. Visok stepen podudarnosti sa obrascima dobijenim u *in situ* eksperimentu potvrđuje da promene SLA, LDMC, SLWC i LT predstavljaju konzistentne elemente odgovora ove vrste na povišenu temperaturu. Istovremeno, razlike u intenzitetu odgovora između kontrolisanih i prirodnih uslova ukazuju da sezonska i mikroklimatska heterogenost u prirodi može značajno modifikovati efekte zagrevanja. Zbog toga funkcionalne i mehaničke osobine lista predstavljaju osetljive pokazatelje aklimacionog/aklimatizacionog odgovora *I. pumila* na blago povećanje temperature, ali se njihov odgovor mora tumačiti u odnosu na eksperimentalni kontekst u kome se list razvija.

5.1.2. Vremenska dinamika koncentracije proteina toplotnog stresa u različitim temperaturnim sredinama

Proteini toplotnog stresa predstavljaju jednu od ključnih komponenti biljnog odgovora na povišenu temperaturu, jer učestvuju u stabilizaciji, ponovnom savijanju i uklanjanju oštećenih proteina (Vierling, 1991; Wang i sar., 2004). Iako su najčešće proučavani u uslovima kratkotrajnog i intenzivnog toplotnog stresa, novija istraživanja pokazuju da molekularni odgovor biljaka na povišenu temperaturu zavisi od intenziteta i trajanja zagrevanja, pri čemu produženo zagrevanje blagog intenziteta može aktivirati drugačiji obrazac ekspresije HSF transkripcionih faktora i Hsp u odnosu na klasičan odgovor na toplotni šok (Wang i sar., 2020). Zbog toga je sve jasnije da Hsp mogu imati važnu ulogu ne samo u odgovoru na kratkotrajni toplotni stres, već i u aklimatizacionom odgovoru biljaka na blago i dugotrajno povećanje temperature, karakteristično za globalno zagrevanje (Jagadish i sar., 2021). U ovom istraživanju, rameti razvijeni unutar OTC-a imali su veće relativne količine svih analiziranih Hsp u odnosu na ramete razvijene izvan OTC-a, što ukazuje da blago i dugotrajno *in situ* povećanje temperature aktivira molekularne mehanizme povezane sa očuvanjem proteinske homeostaze kod vrste *I. pumila*. Dobijeni obrazac sugeriše da Hsp101, Hsp70 i izoforme Hsp17.6

predstavljaju važne komponente aklimatizacionog odgovora vrste *I. pumila* na povišenu temperaturu u prirodnim uslovima.

Hsp101 ima važnu ulogu u razdvajanju proteinskih agregata i reaktivaciji denaturisanih proteina tokom stresa, zbog čega se smatra jednom od ključnih komponenti bazalne i stečene termotolerancije (Queitsch i sar., 2000; Hong i Vierling, 2001; Nieto-Sotelo i sar., 2002; Mishra i Grover, 2016). Funkcionalni značaj ovog proteina potvrđen je, između ostalog, kod mutanata *A. thaliana* bez funkcionalnog Hsp101, koji nisu sposobni da razviju stečenu termotoleranciju, dok smanjena ekspresija ovog proteina narušava i bazalnu termotoleranciju semena (Queitsch i sar., 2000). Pored toga, kod različitih biljnih vrsta veća akumulacija Hsp101 zabeležena je kod tolerantnijih genotipova u odnosu na osetljivije, što ukazuje na povezanost ovog proteina sa kapacitetom biljaka za aklimatizaciju na povišenu temperaturu (Tonsor i sar., 2008; Balfagón i sar., 2018). U ovom istraživanju, relativna količina Hsp101 bila je viša kod rameta razvijenih unutar OTC-a, a njenom variranju značajno su doprinosili i sezona i godina. Ovakav rezultat ukazuje da Hsp101 učestvuje u odgovoru *I. pumila* na blago *in situ* povećanje temperature, ali i da se njegova količina menja u zavisnosti od vremenskog konteksta u kome se list razvija. Regresiona analiza dodatno podržava ovu interpretaciju, jer je relativna količina Hsp101 bila pozitivno povezana sa temperaturom lista kod rameta razvijenih unutar OTC-a, kao i sa temperaturom zemljišta u oba temperaturna tretmana. Nasuprot tome, nije utvrđena značajna povezanost između količine Hsp101 i vlažnosti zemljišta, što sugeriše da je akumulacija ovog proteina u listovima *I. pumila* snažnije povezana sa termalnim uslovima nego sa dostupnošću vode. Takvo tumačenje u saglasnosti je sa rezultatima Balfagón i saradnika (2018), koji su pokazali da se Hsp101 kod citrusa ne akumulira pod dejstvom same suše, već prvenstveno u uslovima povišene temperature.

Iako povećana količina Hsp101 ukazuje na aktivaciju mehanizama povezanih sa očuvanjem proteinske homeostaze, razvoj termotolerancije ne zavisi isključivo od ovog proteina, već od koordinisanog delovanja šire mreže ćelijskih odgovora na stres. U prilog tome govore rezultati Bychkov i saradnika (2022) koji su pokazali da narušavanje aktivnosti hloroplastne FeSOD menja obrazac ekspresije Hsp101 i Hsp70 i dovodi do smanjene termotolerancije kod *A. thaliana*. Stoga se može pretpostaviti da doprinos Hsp101 aklimatizacionom odgovoru *I. pumila* zavisi od njegove povezanosti sa drugim signalnim i zaštitnim molekulima, uključujući ROS signalizaciju i antioksidativni sistem.

Proteini iz familije Hsp70 imaju važnu ulogu u održavanju proteinske homeostaze, jer prepoznaju delimično denaturisane proteine, sprečavaju njihovu agregaciju i omogućavaju njihovo pravilno ponovno savijanje ili usmeravanje ka sistemima za degradaciju (Vierling, 1991; Sung i sar., 2001; Wang i sar., 2004). Pored toga, Hsp70 učestvuje u *de novo* savijanju proteina, transportu polipeptida kroz membrane i oporavku proteoma nakon delovanja stresora (Boston i sar., 1996; Mayer i Bukau, 2005). Funkcionalni značaj ovog proteina u odgovoru na povišenu temperaturu potvrđen je u brojnim istraživanjima na različitim biljnim vrstama. Tako je pokazano da smanjena ekspresija Hsp70/Hsc70 kod *A. thaliana* narušava razvoj stečene termotolerancije (Lee i Schöffl, 1996), dok povećana ekspresija Hsp70 kod paprike doprinosi stabilnosti ćelijskih membrana i većoj otpornosti na toplotni stres (Guo i sar., 2014; Usman i sar., 2015). Slični rezultati dobijeni su i kod transgenih biljaka *A. thaliana* sa povećanom ekspresijom Hsp70 gena iz kserofitne vrste *Zygophyllum xanthoxylum*, kod kojih je povećana i bazalna i stečena termotolerancija (Bai i sar., 2026). Ovi nalazi ukazuju da povećana akumulacija Hsp70 može biti povezana sa većim kapacitetom biljaka za aklimaciju/aklimatizaciju na povišenu temperaturu i razvoj termotolerancije. U ovom istraživanju, relativna količina Hsp70 bila je pozitivno povezana sa temperaturom lista i zemljišta, a negativno sa vlažnošću zemljišta. Ovakav obrazac sugeriše da na povećanje količine Hsp70 u listovima *I. pumila* mogu uticati i povišena temperatura i smanjena dostupnost vode.

To je u skladu sa istraživanjima koja pokazuju da Hsp70 učestvuje u odgovoru biljaka na različite abiotičke stresore, uključujući toplotni stres, sušu i njihovo kombinovano delovanje (Ristic i sar., 1991; Wang i sar., 2004; Grigorova i sar., 2011a, 2011b; Augustine i sar., 2015; Davies i sar., 2018). U eksperimentima sa toplotnim talasima, Davies i saradnici (2018) pokazali su da se količina Hsp70 u listovima autohtonih australijskih trava prvenstveno povećava sa porastom temperature, ali da intenzitet ovog odgovora može zavisiti i od dostupnosti vode. U prethodnim istraživanjima na vrsti *I. pumila*, Manitašević i saradnice (2007) pokazale su da količina Hsp70 dostiže svoje najviše vrednosti tokom leta i da je viša kod biljka sa osunčanog dinskog staništa u odnosu na biljke iz zasenčenog šumskog staništa, što je protumačeno kao mogući odgovor na kombinovano delovanje visokih temperatura, intenzivnog zračenja i ograničene dostupnosti vode. Vuleta i saradnice (2014) takođe su pokazale da osunčani delovi istog klona akumuliraju više Hsp70 u odnosu na zasenčene delove, što dodatno ukazuje da kombinovano delovanje visokog intenziteta svetlosti i toplote mogu doprineti povećanju količine ovog proteina. Rezultati ovog istraživanja podržavaju zaključak da Hsp70 predstavlja jednu od važnih komponenti aklimacionog/aklimatizacionog odgovora vrste *I. pumila* na blago povišenu temperaturu u prirodnim uslovima, pri čemu intenzitet ovog odgovora može zavisiti i od vodnog režima staništa.

Pored direktne uloge u održavanju proteostaze, Hsp70 može učestvovati i u regulaciji drugih komponenti odgovora na toplotni stres. Na primer, pokazano je da citosolni Hsp70 u pirinču pojačava transkripcionu aktivnost transkripcionog faktora HsfA6a i time povećava ekspresiju gena Hsp101 (Singh i sar., 2021). U tom kontekstu, istovremeno povećanje količine Hsp70 i Hsp101 u listovima *I. pumila* podržava tumačenje da ovi proteini deluju kao funkcionalno povezane komponente odgovora na blago povećanje temperature.

Mali proteini toplotnog stresa (sHsp) funkcionišu kao ATP-nezavisni molekularni šaperoni koji se vezuju za delimično denaturisane proteine i sprečavaju njihovu nepovratnu agregaciju (Sun i sar., 2002; Waters i Vierling, 2020). Na taj način formiraju privremeni "rezervoar" supstrata pogodnih za naknadno ponovno savijanje, koje obavljaju ATP-zavisni sistemi, pre svega Hsp70 sa košaperonima i Hsp101. Zbog toga se sHsp smatraju ranom linijom zaštite proteoma, jer omogućavaju primarnu stabilizaciju oštećenih proteina pre aktivacije energetski zahtevnijih mehanizama oporavka (Sun i sar., 2002; Waters i Vierling, 2020). Istraživanja na različitim biljnim vrstama pokazala su da Hsp17.6 ima važnu ulogu u odgovoru na povišenu temperaturu i druge abiotičke stresore. Kod duvana je pokazano da NtHSP17.6 deluje kao efikasan molekularni šaperon koji sprečava agregaciju denaturisanih proteina tokom toplotnog stresa (Yoon i sar., 2005). Pored neposredne zaštitne uloge, Hsp17.6 može učestvovati i u održavanju toplotne memorije. Yamaguchi i saradnici (2021) pokazali su da Hsp17.6C, zajedno sa Hsp22, predstavlja jedan od ključnih gena „toplotne memorije" u laboratorijskim populacijama *A. thaliana*. Umereno povišena temperatura dovela je do brze indukcije Hsp17.6C, dok je epigenetičko održavanje njegovog lokusa u transkripciono aktivnom stanju omogućilo bržu ponovnu aktivaciju pri narednom izlaganju toplotnom stresu. Smanjena sposobnost aklimacije na toplotu kod dvostrukog mutanta *hsp22 hsp17.6c* dodatno ukazuje da Hsp17.6 može doprineti ne samo neposrednoj zaštiti proteina, već i održavanju stečene termotolerancije (Yamaguchi i sar., 2021). Iako su Balfagón i saradnici (2018) zaključili da Hsp17.6 nema centralnu ulogu u termotoleranciji kod citrusa, njihovi rezultati su ipak pokazali da se ovaj protein akumulira u odgovoru na povišenu temperaturu. To ukazuje da doprinos Hsp17.6 termotoleranciji može zavisiti od vrste, intenziteta stresa i funkcionalne uloge drugih komponenti sistema zaštite. Pored odgovora na povišenu temperaturu, Hsp17.6 može biti uključen i u odgovor na smanjenu dostupnost vode. Tako su Almoguera i saradnici (1993) pokazali da se ekspresija Hsp17.6 u suncokretu povećava tokom vodnog stresa i pozitivno koreliše sa stepenom dehidratacije, što ukazuje na moguću ulogu ovog proteina u zaštiti proteoma i tokom vodnog deficita. U ovom istraživanju, relativna količina obe izoforme Hsp17.6 bila je pozitivno povezana sa

temperaturom lista i zemljišta, što ukazuje da je njihova akumulacija povezana sa termalnim uslovima. Istovremeno, negativna povezanost sa vlažnošću zemljišta bila je izraženija i konzistentnija za Hsp17.6b nego za Hsp17.6a, što bi moglo značiti da regulacija izoforme Hsp17.6b može biti osetljivija na promene u dostupnosti vode. Ovakav obrazac je u skladu sa rezultatima Davies i saradnika (2018), koji su pokazali da se količina Hsp17.6 povećava prvenstveno u odgovoru na toplotni stres, dok vodni deficit može dodatno modifikovati intenzitet tog odgovora u zavisnosti od vrste i kombinacije stresnih faktora. Pored ukupne promene količine Hsp17.6, rezultati ovog istraživanja ukazuju i na razlike u relativnoj zastupljenosti njegovih izoformi. Tokom gotovo celog eksperimentalnog perioda udeo izoforme Hsp17.6b bio je veći od udela Hsp17.6a, što ukazuje da Hsp17.6b predstavlja dominantnu izoformu ovog proteina u listovima *I. pumila*. Jedini izuzetak zabeležen je tokom leta 2018. godine, koje je bilo toplo i kišovito, kada je udeo Hsp17.6a bio veći. Ovakav obrazac sugeriše da relativna zastupljenost izoformi Hsp17.6 ne zavisi samo od temperature, već i od šireg sezonskog konteksta, uključujući dostupnost vode. Takav nalaz dodatno sugeriše da Hsp17.6a i Hsp17.6b verovatno nisu funkcionalno ekvivalentne, već da mogu imati delimično različite obrasce regulacije u odgovoru na kombinovano delovanje temperature i vodnog režima. U skladu sa tim, Scharf i saradnici (2001) pokazali su da kod *A. thaliana* postoje četiri blisko srodne izoforme Hsp17.6, raspoređene u dve citosolne klase (CI i CII), koje se razlikuju po obrascima ekspresije, što ukazuje na njihovu moguću funkcionalnu specijalizaciju.

Hsp17.6 ne deluje izolovano, već kao deo šaperonske mreže u kojoj ostvaruje funkcionalne interakcije sa drugim Hsp. Forreiter i Nover (1998) su pokazali kod *A. thaliana* da AtHsp17.6-CI sprečava inaktivaciju luciferaze tokom toplotnog stresa, dok prisustvo Hsp70 značajno ubrzava njenu reaktivaciju. Ovaj rezultat ukazuje na komplementarnu ulogu Hsp17.6 i Hsp70 u stabilizaciji i oporavku denaturisanih proteina. Slično tome, McLoughlin i saradnici (2016) pokazali su da citosolni sHsp, uključujući Hsp17.6, deluju koordinisano sa Hsp101 u zaštiti termolabilnih proteina tokom toplotnog stresa. Hsp17.6 vezuje delimično denaturisane proteine i stabilizuje ih u citosolnim granulama toplotnog stresa, dok Hsp101 nakon prestanka stresa omogućava njihovu resolubilizaciju i ponovno uspostavljanje funkcije. Ovi rezultati ukazuju da Hsp17.6, Hsp70 i Hsp101 predstavljaju funkcionalno povezane komponente šaperonske mreže koja doprinosi očuvanju proteinske homeostaze i razvoju termotolerancije kod biljaka. U skladu s tim, savremena istraživanja pokazuju da termotolerancija ne zavisi samo od povećane ekspresije pojedinačnih Hsp ili HSF gena, već od usklađenog delovanja HSF regulatora i različitih Hsp u okviru šire mreže odgovora na stres (Zhao i sar., 2020). Istovremeno povećanje količine Hsp101, Hsp70 i Hsp17.6 u listovima *I. pumila* podržava tumačenje da odgovor ove vrste na blago i dugotrajno povećanje temperature nije zasnovan na promeni količine pojedinačnih proteina, već na koordinisanom delovanju više funkcionalno povezanih komponenti uključenih u održavanje proteinske homeostaze.

Pored razlika između temperaturnih tretmana, rezultati ove studije pokazuju da su sezonske promene imale važnu ulogu u variranju Hsp kod vrste *I. pumila*. Veća akumulacija svih analiziranih Hsp tokom leta ukazuje da letnji sredinski uslovi, koje karakterišu više temperature, intenzivno sunčevo zračenje i često smanjena dostupnost vode, predstavljaju snažan signal za aktivaciju ćelijskih mehanizama zaštite. Ovakav obrazac sugeriše da se Hsp odgovor pojačava u periodu kada se više stresnih faktora istovremeno preklapa u prirodnom staništu. Posebno je značajna sezonska promena u relativnoj zastupljenosti pojedinačnih Hsp. Tokom proleća najzastupljeniji bio je Hsp70, dok se tokom leta njegov relativni udeo smanjivao, uz istovremeni porast udela Hsp101 i naročito Hsp17.6, koji je postajao dominantan među analiziranim Hsp. Ovakva promena sugeriše da se sa pojačavanjem sezonskog stresa menja i relativni značaj pojedinačnih komponenti Hsp sistema: u proleće, izraženiju ulogu ima Hsp70, dok tokom leta važniju ulogu dobijaju Hsp17.6 i Hsp101, povezani sa stabilizacijom i oporavkom proteina u stresnijim uslovima.

Populacione razlike u količini Hsp ukazuju da nivo ovih proteina nije bio potpuno uniforman unutar vrste. Više relativne količine svih analiziranih Hsp kod rameta Populacije 1 sugerišu da se prirodne populacije *I. pumila* mogu razlikovati u stepenu aktivacije Hsp sistema, odnosno u nivou proteina uključenih u održavanje proteinske homeostaze.

5.1.3. Vremenska dinamika koncentracije antioksidativnih enzima u različitim temperaturnim sredinama

Povišena temperatura može dovesti do narušavanja redoks homeostaze i povećane produkcije ROS-a, zbog čega antioksidativni enzimi imaju važnu ulogu u regulaciji njihove koncentracije i zaštiti ćelije od oksidativnih oštećenja (Mittler, 2002; Gill i Tuteja, 2010; Awasthi i sar., 2015; Hasanuzzaman i sar., 2020). Iako su brojna istraživanja pokazala da intenzivan i kratkotrajan toplotni stres može dovesti do promena u aktivnosti ili količini SOD, APX i CAT (Almeselmani i sar., 2009; Ergin i sar., 2016; Khan i sar., 2017; Balfagón i sar., 2018, 2022; Fortunato i sar., 2023), znatno manje je poznato kako ove komponente antioksidativnog sistema reaguju na blago i dugotrajno povećanje temperature u prirodnim uslovima (Wang i sar., 2020; Jagadish i sar., 2021). U ovom istraživanju nije utvrđen značajan efekat blagog *in situ* eksperimentalnog povećanja temperature na prosečne vrednosti CAT, APX, MnSOD i Cu/ZnSOD u listovima *I. pumila*. Ovakav rezultat ne znači nužno da redoks regulacija nije bila uključena u odgovor na povišenu temperaturu, već ukazuje na to da porast temperature od približno 1,5 °C nije doveo do statistički značajnog povećanja količine nijednog odanaliziranih antioksidativnih enzima. ROS se pri umerenim nivoima stresa ne smatraju isključivo štetnim produktima oksidativnog oštećenja, već mogu imati i signalnu ulogu u regulaciji rastenja, razvoja i aklimacionih/aklimatizacionih odgovora biljaka (Mittler, 2002; Suzuki i Mittler, 2006; Mittler, 2017). Pri umerenim nivoima stresa, ROS učestvuju u signalizaciji između hloroplasta i jedra i time doprinose regulaciji rastenja i razvića biljaka (Sun i Guo, 2016). Wang i saradnici (2020) pokazali su da produženo blago zagrevanje kod *A. thaliana* dovodi do povećanja nivoa ROS-a u odnosu na kontrolu, ali znatno slabijeg nego pri toplotnom šoku, što sugeriše da ROS u takvim uslovima mogu pre svega delovati kao signalni molekuli, bez pokretanja snažnog antioksidativnog odgovora i bez ozbiljnijih oštećenja fotosintetskog aparata i PSII. Zbog toga se izostanak značajnog efekta temperaturnog tretmana u ovom istraživanju može tumačiti kao pokazatelj da se odgovor *I. pumila* na blago zagrevanje nije zasnivao na opštem povećanju količine antioksidativnih enzima. Ipak, odsustvo njihove opšte akumulacije ne isključuje mogućnost redoks regulacije odgovora na promenu sredinskih faktora. Tako su Kumazaki i Suzuki (2019) pokazali da povećana tolerantnost *A. thaliana* na kombinovano delovanje toplotnog stresa i suše može biti praćena većom akumulacijom H_2O_2, bez paralelnog povećanja ekspresije SOD, CAT i APX1. U našem istraživanju određivana je relativna količina antioksidativnih enzima, a ne njihova aktivnost. Zbog toga se ne može isključiti mogućnost da je deo antioksidativnog odgovora ostvaren na funkcionalnom nivou, kroz promene enzimske aktivnosti, dostupnosti kofaktora ili posttranslacionu regulaciju. Na to ukazuju i rezultati Balfagón i saradnika (2022), koji su pokazali da promene u količini SOD, APX i CAT proteina ne moraju uvek biti praćene odgovarajućim promenama njihove enzimske aktivnosti. Dodatno, razlika između odgovora antioksidativnih enzima i Hsp može odražavati različitu regulaciju antioksidativnog i šaperonskog sistema. Na primer, tokom toplotnog stresa, HSF transkripcioni faktori klase A, koji predstavljaju važne regulatore ekspresije Hsp gena, mogu aktivirati i miR398, koja negativno reguliše ekspresiju gena za Cu/ZnSOD (CSD1 i CSD2), čime se uspostavlja složena povratna sprega između ROS signalizacije i HSR regulatorne mreže (Guan i sar., 2013; Zhao i sar., 2020).

Uprkos izostanku opšteg efekta temperaturnog tretmana, analizirani antioksidativni enzimi pokazali su izraženu vremensku dinamiku tokom eksperimentalnog perioda. Ovaj obrazac ukazuje da količina pojedinačnih komponenti antioksidativnog sistema nije bila stabilna, već je

zavisila od sezone, godine i specifičnosti samog enzima ili izoforme. Takav rezultat je očekivan, imajući u vidu da se u prirodnim uslovima list razvija pod istovremenim uticajem temperature, dostupnosti vode, intenziteta zračenja i drugih mikroklimatskih faktora.

SOD predstavljaju prvu liniju enzimske zaštite od oksidativnog stresa, jer katalizuju dismutaciju superoksid anjon radikala do vodonik peroksida, koji se zatim uklanja delovanjem drugih komponenti antioksidativnog sistema, pre svega APX i CAT (Alscher, 2002; Gill i Tuteja, 2010). U našem istraživanju, pojedinačni tipovi i izoforme SOD nisu pokazali jedinstven vremenski obrazac, što ukazuje da se SOD odgovor kod *I. pumila* ne može tumačiti kao uniformna promena celog enzimskog sistema. Naprotiv, sezonska dinamika razlikovala se između pojedinačnih komponenti: MnSOD i Cu/ZnSODb pokazale su izraženiju akumulaciju tokom letnjih sezona, dok je kod Cu/ZnSODc zabeležen suprotan trend, a Cu/ZnSODa nije imala konzistentnu sezonsku dinamiku. Ovakav obrazac sugeriše da različiti tipovi i izoforme SOD kod *I. pumila* verovatno imaju različitu osetljivost na sezonske promene sredinskih uslova, a time i delimično različit doprinos održavanju redoks ravnoteže. Iako su pojedinačni SOD tipovi pokazali različite sezonske obrasce, pozitivne korelacije između pojedinačnih Cu/ZnSOD izoformi, prisutne u više vremenskih tačaka i u oba temperaturna tretmana, ukazuju da promene njihove relativne količine nisu bile potpuno nezavisne. Regresiona analiza je dodatno pokazala da su pojedinačni SOD tipovi bili različito povezani sa mikroklimatskim uslovima. MnSOD je bila pozitivno povezana sa temperaturom lista i zemljišta, a negativno sa vlažnošću zemljišta, što sugeriše da je variranje količine ovog enzima bilo povezano sa toplijim i suvljim mikroklimatskim uslovima. Nasuprot tome, među Cu/ZnSOD izoformama jedino je Cu/ZnSODc pokazala značajnu negativnu povezanost sa temperaturom lista i zemljišta, dok za ostale izoforme nije utvrđena jasna povezanost sa analiziranim abiotičkim parametrima. Diferencijalna regulacija pojedinačnih tipova SOD opisana je i u drugim istraživanjima. Tsang i saradnici (1991) pokazali su da toplotni stres kod meksičkog divljeg duvana indukuje ekspresiju citosolne Cu/ZnSOD, dok mitohondrijalna MnSOD i hloroplastna FeSOD ne pokazuju značajne promene. Slično tome, Camejo i saradnici (2007) pokazali su da tokom toplotne aklimacije kod paradajza dolazi do povećanja aktivnosti FeSOD i MnSOD, uz istovremeno smanjenje aktivnosti Cu/ZnSOD. Pored toga, različiti geni koji kodiraju pojedinačne SOD tipove i izoforme mogu biti regulisani na transkripcionom, posttranskripcionom i translacionom nivou, pri čemu njihov odgovor zavisi od vrste stresa, unutarćelijske lokalizacije i fiziološkog stanja biljke (W. Wang i sar., 2016). U skladu sa tim, rezultati našeg istraživanja sugerišu da regulacija pojedinačnih tipova i izoformi SOD kod *I. pumila* verovatno odražava njihove delimično različite funkcionalne uloge u održavanju redoks ravnoteže u promenljivim uslovima sredine.

Na osnovu procentualnog učešća pojedinačnih tipova SOD u ukupnoj količini SOD proteina, Cu/ZnSOD izoforme imale su dominantan udeo tokom celog eksperimentalnog perioda. Ovakav obrazac je očekivan s obzirom na njihovu široku zastupljenost u citosolu i hloroplastima, odnosno ćelijskim odeljcima u kojima reaktivne vrste kiseonika intenzivno nastaju tokom fotosinteze i drugih metaboličkih procesa (Alscher, 2002; Gill i sar., 2015). Istovremeno, tokom letnje sezone zabeležen je relativno veći udeo MnSOD, što može ukazivati na povećan značaj mitohondrijalne redoks regulacije tokom toplijeg dela godine, kada viša temperatura povećava respiratornu aktivnost i metaboličke zahteve ćelije. Pozitivna povezanost količine MnSOD sa temperaturom lista i zemljišta dodatno podržava ovakvo tumačenje. Značaj MnSOD u održavanju mitohondrijalne redoks ravnoteže potvrđen je i kod vrste *A. thaliana*, gde je smanjena ekspresija ovog enzima bila povezana sa narušavanjem mitohondrijalnog metabolizma i oksidativnog statusa ćelije (Morgan i sar., 2008). Prethodna istraživanja na vrsti *I. pumila* pokazala su da relativni odnos između MnSOD i Cu/ZnSOD može varirati između različitih svetlosnih uslova (Vuleta i sar., 2016), što dodatno ukazuje na to da različiti tipovi SOD mogu imati promenljiv doprinos održavanju redoks homeostaze u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine.

APX predstavlja važnu komponentu antioksidativnog sistema biljaka, jer zahvaljujući visokom afinitetu prema H_2O_2 omogućava finu regulaciju njegove koncentracije i održavanje ćelijske redoks homeostaze (Shigeoka, 2002b; Pandey i sar., 2017). U ovom istraživanju, izoforme APXa i APXb pokazale su sličan opšti sezonski trend, sa tendencijom povećanja od proleća ka letu, pri čemu je statistički značajna sezonska promena utvrđena samo tokom druge godine eksperimenta. Porast je bio izraženiji kod APXb, dok su promene APXa bile slabijeg intenziteta, što sugeriše da se ove dve izoforme ne razlikuju nužno u pravcu sezonske promene, već pre u intenzitetu odgovora. Regresiona analiza dodatno je ukazala na razlike između APX izoformi. APXb je bila pozitivno povezana sa temperaturom lista i zemljišta, a negativno sa vlažnošću zemljišta, dok za APXa nije utvrđena povezanost sa analiziranim abiotičkim parametrima. Ovakvi rezultati sugerišu da je variranje APXb bilo tesnije povezano sa mikroklimatskim uslovima, dok je variranje APXa bilo slabije povezano sa analiziranim sredinskim faktorima. Razlike između izoformi mogu se povezati sa činjenicom da APX predstavlja multigensku familiju čiji članovi mogu imati različitu unutarćelijsku lokalizaciju, biohemijska svojstva i osetljivost na abiotičke stresore, zbog čega isti faktor sredine ne mora jednako regulisati sve izoforme (Shigeoka, 2002b; Caverzan i sar., 2012; Pandey i sar., 2017). Na osnovu procentualnog učešća pojedinačnih izoformi, APXb je imala dominanatan udeo tokom najvećeg dela eksperimentalnog perioda, sa izuzetkom u proleće druge godine, kada je zastupljenija bila APXa. Budući da je ovaj period karakterisala niža temperatura i veća dostupnost vode u odnosu na ostale vremenske tačke, ovakav obrazac sugeriše da se međusobni odnos APX izoformi može menjati u zavisnosti od trenutnih sredinskih uslova. Pri tome se APXb izdvaja kao izoforma čija je relativna količina izraženije povezana sa toplijim i suvljim uslovima. Istovremeno, pozitivna povezanost APXa i APXb, uočena u ukupnom uzorku i kod biljaka razvijanih unutar OTC-a tokom prve godine, ukazuje da ove izoforme mogu deliti određeni nivo zajedničke regulacije, uprkos razlikama u intenzitetu njihovog odgovora.

CAT predstavlja važnu komponentu antioksidativnog sistema biljaka, jer zahvaljujući visokom kapacitetu za razgradnju H_2O_2 omogućava efikasno uklanjanje većih količina ovog molekula, naročito u peroksizomima tokom intenzivne fotorespiracije (Mittler, 2002; Mhamdi i sar., 2010; A. Baker i sar., 2023). U ovom istraživanju, količina CAT značajno je varirala između sezona i godina, ali bez konzistentnog obrasca između dve eksperimentalne godine. Ovakva dinamika ukazuje da CAT nije reagovala na blago povišenu temperaturu kao stabilan i jednosmeran odgovor, već da je njeno variranje bilo povezano sa promenljivim mikroklimatskim uslovima tokom vegetacionog perioda, pre svega sa dostupnošću vode i temperaturom. Takvo tumačenje podržava negativna povezanost CAT sa vlažnošću zemljišta u oba temperaturna tretmana, kao i sa temperaturom zemljišta kod rameta razvijenih unutar OTC-a.

Svi analizirani antioksidativni enzimi, izuzev Cu/ZnSODa, pokazivali su značajnu populacionu diferencijaciju. Ovaj rezultat ukazuje da genotipovi poreklom iz dve prirodne populacije održavaju različite nivoe pojedinačnih komponenti antioksidativnog sistema, što može ukazivati na razlike u kapacitetu redoks zaštite. Budući da analizirane populacije pripadaju istom tipu staništa i izložene su veoma sličnim abiotičkim uslovima, dobijeni rezultat sugeriše da fiziološka diferencijacija može postojati i između populacija koje ne pokazuju izraženu divergentnost ekoloških faktora. Prosečne vrednosti CAT, APXa, APXb, MnSOD i Cu/ZnSODb bile su više u Populaciji 1, dok su prosečne vrednosti Cu/ZnSODc bile više u Populaciji 2, što ukazuje da populacione razlike nisu bile uniformne, već da su se populacije verovatno razlikovale u relativnom doprinosu pojedinačnih komponenti unutar antioksidativnog sistema.

5.2. Temperatura i fenotip

5.2.1. Fenotipsko variranje anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista u odgovoru na povećanje temperature

Fenotipska plastičnost predstavlja sposobnost genotipa da menja fenotipsku ekspresiju svojih osobina u zavisnosti od uslova sredine i smatra se jednom od ključnih strategija koja biljkama omogućava odgovor na promene ekoloških uslova (Bradshaw, 1965). Njena evoluciona uloga, međutim, nije jednoznačna, jer se plastičnost posmatra i kao kvantitativna, delimično genetički određena osobina koja može evoluirati pod delovanjem prirodne selekcije, i kao razvojni mehanizam koji otvara nove mogućnosti za evolucione promene (G. De Jong, 2005; Scheiner, 1993; West-Eberhard, 2003). Budući da obuhvata i adaptivne i neadaptivne odgovore na variranje uslova sredine, plastična promena može predstavljati regulisan odgovor na variranje sredine, ali i pasivnu posledicu razvojnih ograničenja ili stresnih uslova, pa se njen adaptivni značaj ne može utvrditi bez podataka o fitnesu i fenotipskoj selekciji (Pigliucci, 2001; Ghalambor i sar., 2007). U kontekstu savremenih klimatskih promena, poseban značaj ima plastični odgovor biljaka na variranje temperature. S obzirom na to da temperatura predstavlja jedan od najdinamičnijih abiotičkih faktora koji neposredno utiče na metabolizam biljaka, plastičnost osobina lista može imati važnu ulogu u održavanju funkcionalnosti biljaka u uslovima globalnog zagrevanja (Knight i Ackerly, 2003; W. Huang i sar., 2024). U ovoj studiji, norme reakcije, analiza profila odgovora i indeksi fenotipske plastičnosti pokazali su da odgovor vrste *I. pumila* na blago povećanje temperature nije bio uniforman, već je zavisio od analizirane osobine, odnosno grupe funkcionalno povezanih osobina.

Norme reakcije pružaju uvid u pravac i obim fenotipskih promena izazvanih variranjem sredine, pri čemu njihovo pouzdano tumačenje zahteva odgovarajući broj ispitivanih sredina i statističku procenu razlika u obliku i nivou odgovora (Stearns, 1989; Morrissey i Liefting, 2016; Arnold i sar., 2019). Karakterizacija oblika normi reakcije zato predstavlja važan preduslov za razumevanje načina na koji fenotipska plastičnost može doprineti opstanku populacija u novim i brzo promenljivim sredinama (Arnold i sar., 2019).

U *in situ* eksperimentu, relativno slični vremenski obrasci u oba temperaturna tretmana, uočeni su za SLA, LDMC, SLWC, LT, sve analizirane Hsp, APXb i Cu/ZnSODc, što ukazuje da je vremensko variranje uslova sredine kod većine genotipova dovelo do relativno konzistentne promene ovih osobina. Nasuprot tome, izraženije ukrštanje individualnih normi reakcije uočeno je za SD, SI, CAT, APXa, MnSOD, Cu/ZnSODa i Cu/ZnSODb, što ukazuje na veću međugenotipsku heterogenost u smeru i intenzitetu njihovog odgovora kroz vreme. Dakle, anatomsko-morfološke osobine i Hsp pokazali su ujednačenije vremenske obrasce, dok je heterogenost odgovora bila izraženija kod osobina stominog aparata i većine antioksidativnih enzima. Takva razlika među grupama osobina pokazuje da genotipovi ne menjaju sve osobine na isti način, već da su smer i intenzitet plastičnog odgovora zavisili od analizirane osobine i njene funkcionalne pripadnosti. Posebno kod antioksidativnih enzima i osobina stominog aparata, izraženija varijabilnost između genotipova može ukazivati da odgovor ovih osobina na sezonske promene sredine nije bio ujednačen među genotipovima. Dobijeni rezultati u skladu su sa nalazima da različite osobine mogu ispoljiti izrazito različite oblike normi reakcije čak i duž istog sredinskog gradijenta (Vitasse i sar., 2010; Arnold i sar., 2019)

Analiza prosečnih profila odgovora omogućila je jasnije razdvajanje efekta temperaturnog tretmana na nivo fenotipske ekspresije osobina od njihove sezonske i međugodišnje dinamike. Paralelni profili anatomsko-morfoloških osobina, Hsp101 i Hsp70, uz značajne razlike u nivou između tretmana, ukazuju da je zagrevanje menjalo nivo njihove fenotipske ekspresije, ali ne i osnovni obrazac sezonskog i međugodišnjeg variranja. Nasuprot tome, prosečni profili SI i

većine antioksidativnih enzima, izuzev APXb, menjali su se tokom vremena, ali se nisu razlikovali u nivou između temperaturnih tretmana, što ukazuje da je njihova dinamika bila snažnije povezana sa sezonskim i međugodišnjim uslovima nego sa prosečnim efektom blagog zagrevanja. Odsustvo paralelizma prosečnih profila obe izoforme Hsp17.6 pokazuje da razlika između temperaturnih tretmana nije bila jednaka tokom čitavog eksperimentalnog perioda. Konvergencija profila u proleće druge godine, praćena njihovom divergencijom tokom leta, ukazuje da je odgovor ovih proteina na povišenu temperaturu zavisio od sezone i godine, pri čemu su razlike između tretmana bile izraženije tokom leta. Odsustvo paralelizma uočeno je i kod SD, čiji su se prosečni profili ukrštali između temperaturnih tretmana, što pokazuje da odgovor gustine stoma na povišenu temperaturu nije bio jednak u proleće i leto i ukazuje na značaj mikroklimatskih uslova tokom razvića lista.

Dodatni uvid u temperaturno indukovanu plastičnost pružio je *ex situ* eksperiment, u kome je temperatura bila jedini eksperimentalno manipulisani faktor sredine. U kontrolisanim uslovima sve analizirane osobine lista ispoljile su kose prosečne norme reakcije, što pokazuje da je i relativno blago povećanje temperature bilo dovoljno da izazove promenu njihove fenotipske ekspresije. Istovremeno, promene varijabilnosti između genotipova razlikovale su se u zavisnosti od analizirane osobine. Konvergencija individualnih normi reakcije za LDMC pri povišenoj temperaturi pokazuje približavanje fenotipskih vrednosti ove osobine kod različitih genotipova. Nasuprot tome, divergencija individualnih normi reakcije za indeks I_1 na povišenoj temperaturi ukazuje na izraženije razlike u fenotipskim vrednostima ove osobine među genotipovima izloženim istim temperaturnim uslovima (Kaiser i sar., 2015). Posmatrani zajedno, ovi rezultati pokazuju da povišena temperatura nije na isti način menjala varijabilnost između genotipovasvih osobina: smanjila ju je kod LDMC, a povećala kod indeksa I_1.

Kvantitativna procena fenotipske plastičnosti pokazala je jasnu hijerarhiju odgovora među grupama funkcionalno povezanih osobina. *U in situ* eksperimentu, najviše prosečne vrednosti PI_T imali su Hsp, antioksidativni enzimi pokazali su intermedijarni nivo plastičnosti, dok su anatomsko-morfološke osobine lista bile najmanje plastične. Ovakav obrazac pokazuje da su se pri blagom i dugotrajnom zagrevanju relativne količine pojedinih proteina menjale izraženije od anatomsko-morfoloških osobina lista. Ovaj rezultat je saglasan sa shvatanjem da relativno manji obim promena morfoloških osobina može biti praćen većom plastičnošću fizioloških i biohemijskih komponenti fenotipa (Schlichting, 1986; Sun i sar., 2016b). SLA, LDMC, SLWC i LT pokazale su relativno nizak i međusobno sličan nivo plastičnosti u oba eksperimentalna sistema. Najnižu plastičnost pokazao je LDMC, što je saglasno sa relativnom konzervativnošću osobina povezanih sa ulaganjem u suvu materiju i strukturnu organizaciju lista (Poorter i De Jong, 1999). Niže vrednosti indeksa za SLA, SLWC i LT pokazuju da je relativni obim njihovih promena bio manji nego kod najplastičnijih osobina. U *ex situ* eksperimentu najveću plastičnost pokazao je indeks I_1, što ukazuje na izraženu temperaturnu osetljivost optičkih svojstava lista povezanih sa sadržajem hlorofila. Pošto fotosintetska aktivnost nije merena, promena indeksa I_1 ne može se neposredno izjednačiti sa promenom fotosintetske efikasnosti. Drugu najvišu vrednost plastičnosti u *ex situ* eksperimentu pokazala je SD. Visoka plastičnost SD ukazuje na izraženu osetljivost gustine stoma na temperaturu, ali ne pruža neposredan dokaz o promenama provodljivosti stoma ili transpiracije. Viša prosečna plastičnost mehaničkih u odnosu na funkcionalne osobine bila je u velikoj meri uslovljena visokim vrednostima za I_1 i SD, dok su SLWC i LT pokazale relativno nizak nivo plastičnosti. Među Hsp, Hsp101 je imao najvišu prosečnu vrednost PI_T, dok su svi analizirani Hsp pokazali srednje visoku do visoku plastičnost. To ukazuje na izraženu osetljivost njihove relativne količine na blago povećanje temperature. Vrednosti PI_T svih Hsp bile su uglavnom niže tokom leta, iako su njihove relativne količine u toj sezoni bile više. Ovaj obrazac pokazuje da više relativne količine proteina ne moraju biti praćene i većom proporcionalnom razlikom između temperaturnih tretmana. Drugim rečima, povećanje relativne količine Hsp tokom leta nije podrazumevalo i viši nivo njihove plastičnosti

prema temperaturnom tretmanu. Antioksidativni enzimi pokazali su srednji nivo plastičnosti, ali su se intenzitet i vremenska dinamika odgovora razlikovali među enzimima i izoformama, bez jedinstvenog sezonskog obrasca. Međupopulacione razlike u vrednostima PI_T bile su ograničene na pojedine antioksidativne enzime i vremenske tačke, zbog čega rezultati ne podržavaju opštu divergentnost plastičnog odgovora između populacija, ali ne potvrđuju ni njihovu potpunu jednakost.

Analiza sezonske plastičnosti pokazala je konzistentnu hijerarhiju odgovora među grupama funkcionalno povezanih osobina. Najviše vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ zabeležene su za Hsp101 i obe izoforme Hsp17.6, intermedijarne vrednosti za antioksidativne enzime i Hsp70, a najniže za anatomsko-morfološke osobine lista. Ovaj redosled bio je isti u oba temperaturna tretmana. Sličan redosled grupa utvrđen je i za PI_T, što pokazuje da je opšta hijerarhija plastičnosti bila u velikoj meri očuvana bez obzira na to da li je odgovor procenjivan između temperaturnih tretmana ili između sezona. Vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ bile su pretežno više kod rameta unutar OTC-a, ali su statistički značajne razlike između temperaturnih tretmana utvrđene samo za SLA, Hsp17.6a i MnSOD u Populaciji 2. Ovaj trend može ukazivati na povećanje sezonske plastičnosti pojedinih osobina pri zagrevanju, ali ne potvrđuje njeno opšte povećanje. Vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ razlikovale su se između eksperimentalnih godina kod većine osobina, što ukazuje da je intenzitet sezonske plastičnosti zavisio od međugodišnjih promena uslova sredine. Slično tome, Montgomery i sar. (2020) utvrdili su međugodišnje razlike u fenološkom odgovoru na eksperimentalno zagrevanje, koje su zavisile od prirodnih prolećnih temperatura. Takvi nalazi ukazuju da intenzitet sezonskog odgovora može zavisiti od klimatskih uslova karakterističnih za konkretnu godinu. U prirodnim uslovima sezonski odgovor nastaje pod istovremenim delovanjem više abiotičkih faktora, pa se ne može nužno predvideti na osnovu efekta svakog faktora pojedinačno (Valladares i sar., 2007). Značajna negativna povezanost između $PI_{P\text{-}L}$ i CV% utvrđena je u sve tri grupa osobina u oba temperaturna tretmana, a bila je najjača kod Hsp. Ova povezanost pokazuje da su više prosečne vrednosti $PI_{P\text{-}L}$ bile praćene manjom relativnom varijabilnošću ovog indeksa između genotipova. Na osnovu ove korelacije ne može se zaključiti da su fenotipske vrednosti genotipova konvergirale, jer je analizirana varijabilnost indeksa plastičnosti, a ne približavanje samih fenotipskih vrednosti.

5.2.2. Uticaj eksperimentalnog povećanja temperature na fenologiju cvetanja i reproduktivni uspeh *I. pumila*

Jedna od posledica globalnog zagrevanja je promena vremena početka i/ili trajanja vegetativnih i reproduktivnih fenofaza biljaka (Collins i sar., 2021). Vegetativne i reproduktivne fenofaze ne moraju podjednako reagovati na povećanje temperature, što može biti posledica razlika u fiziologiji vegetativnih i reproduktivnih organa, ali i različitih selekcionih i koevolucionih pritisaka koji oblikuju njihovu fenologiju (Collins i sar., 2021). Reproduktivna fenologija određuje vremenski raspored ključnih događaja reproduktivnog ciklusa biljke i njihovo usklađivanje sa sezonskim promenama uslova sredine (Segrestin i sar., 2020). Fenologija cvetanja, kao komponenta reproduktivne fenologiije, posebno je osetljiva na sezonske promene uslova sredine. Vreme cvetanja regulisano je delovanjem više sredinskih signala, među kojima temperatura ima značajnu ulogu, naročito kod vrsta koje cvetaju u proleće (Tarasjev, 1997; Collins i sar., 2021; Geissler i sar., 2023). Povećanje temperature usled globalnog zagrevanja često je povezano sa ranijim cvetanjem, ali smer i intenzitet fenološkog odgovora nisu jednoznačni i mogu se znatno razlikovati među vrstama i u zavisnosti od konkretnih uslova životne sredine (Dorji i sar., 2020; Collins i sar., 2021; Geissler i sar., 2023). Pored toga, različiti pokazatelji fenologije cvetanja mogu pokazivati različitu osetljivost na povećanje temperature (Dorji i sar., 2020). U našoj studiji, odgovor fenologije cvetanja *I. pumila* na blago *in situ* povećanje temperature nije bio jedinstven, već su veličina i smer promena zavisili od analiziranog parametra i populacije.

Prvi cvetovi formirali su se ranije unutar OTC-a u obe populacije, dok se efekat temperaturnog tretmana na prosečno vreme cvetanja razlikovao između populacija. U Populaciji 1 cvetovi su se u proseku otvarali 1,19 dana ranije unutar OTC-a, dok u Populaciji 2 nije utvrđena statistički značajna razlika između tretmana. Ovi rezultati ukazuju da odgovor prosečnog vremena cvetanja na blago povećanje temperature nije bio isti u dve analizirane populacije. Ranije cvetanje u odgovoru na povišenu temperaturu predstavlja čest, ali ne i univerzalan fenološki odgovor biljaka. Na primer, Dorji i saradnici (2020) su u sedmogodišnjem eksperimentu pasivnog povećanja temperature pomoću OTC-a pokazali da je zagrevanje dovelo do ranijeg početka cvetanja kod obe analizirane vrste roda *Potentilla*, ali se veličina odgovora razlikovala između vrsta. Dugoročna fenološka istraživanja takođe pokazuju da su više temperature, naročito tokom proleća, često povezane sa ranijim cvetanjem, ali da se jačina odgovora znatno razlikuje između vrsta (Lavoie i Lachance, 2006; Davis i sar., 2015; I. W. Park i Schwartz, 2015; Geissler i sar., 2023). Nasuprot tome, kod pojedinih vrsta povećanje temperature može dovesti do kasnijeg početka cvetanja ili ne mora izazvati njegovu značajnu promenu (McEwan i sar., 2011; Calinger i sar., 2013; Hart i sar., 2014; Cao i sar., 2016). Ovakvi nalazi pokazuju da sama promena temperature nije dovoljna za predviđanje veličine, pa ni smera fenološkog odgovora, već je neophodno uzeti u obzir osobine vrste i konkretne uslove životne sredine u kojima se zagrevanje odvija. Termalna osetljivost fenologije cvetanja može se razlikovati i unutar iste vrste (Tarasjev, 1997; Valdés i sar., 2019; Kotilainen i sar., 2024). Na primer, Kotilainen i saradnici (2024) pokazali su da se termalna plastičnost početka cvetanja kod *Hypericum maculatum* razlikovala između populacija različitog porekla. Rezultati naše studije ukazuju da se odgovor fenologije cvetanja *I. pumila* na povećanje temperature ne može opisati samo kao opšte pomeranje ka ranijem cvetanju, već da se razlikuje između populacija. Ranija studija na *I. pumila* pokazala je da vreme cvetanja može varirati i na maloj prostornoj skali (Tarasjev, 1997). U istom istraživanju utvrđena je i genetička varijabilnost vremena cvetanja unutar populacija. Različit odgovor dve populacije u našoj studiji mogao bi, stoga, odražavati genetičke razlike između populacija, lokalne razlike u uslovima sredine ili njihovo zajedničko delovanje. Za nedvosmisleno razdvajanje genetičke komponente plastičnog odgovora od uticaja populaciono specifičnih uslova staništa bila bi potrebna dodatna istraživanja. Tumačenje populacionih razlika dodatno je ograničeno time što je fenologija cvetanja praćena tokom samo jedne godine. S obzirom na to da eksperimentalna istraživanja pokazuju da se vreme početka cvetanja pri sličnom povećanju temperature može razlikovati između godina u zavisnosti od drugih sredinskih faktora (Hovenden i sar., 2008), za procenu stabilnosti utvrđenog populaciono specifičnog odgovora bilo bi potrebno višegodišnje praćenje fenologije cvetanja kod *I. pumila*.

Za razliku od prosečnog dana otvaranja cvetova, trajanje centralnog perioda cvetanja (T90-T10) nije se statistički značajno razlikovalo između temperaturnih tretmana, niti je utvrđena značajna interakcija tretmana i populacije. Ovaj rezultat ukazuje da pomeranje prosečnog vremena cvetanja u Populaciji 1 nije bilo praćeno promenom trajanja centralnog perioda cvetanja. Različita osetljivost pojedinih komponenti fenologije cvetanja na zagrevanje zabeležena je i u drugim eksperimentalnim istraživanjima. Dorji i saradnici (2020) utvrdili su raniji početak cvetanja bez promene njegovog trajanja, dok su Collins i saradnici (2021) pokazali da je zagrevanje pomerilo i početak i završetak cvetanja ka ranijem delu sezone, ali bez značajne promene dužine perioda cvetanja. Ipak, trajanje cvetanja može reagovati na povećanje temperature, pa su u literaturi zabeleženi primeri njegovog skraćivanja (Črepinšek i sar., 2012), ali i produžavanja (Dunne i sar., 2003; Miller-Rushing i sar., 2007). U našoj studiji**,** centralni period cvetanja bio je, nezavisno od temperaturnog tretmana, značajno duži u Populaciji 1 nego u Populaciji 2, u proseku za 1,49 dana. Razlike između populacija u trajanju cvetanja utvrđene su i kod drugih višegodišnjih zeljastih vrsta (Olsson i Ågren, 2002; Wunder i sar., 2023). Ovi

nalazi ukazuju da trajanje cvetanja, kao i vreme njegovog početka, predstavlja komponentu reproduktivne fenologije čije se vrednosti mogu razlikovati između populacija.

Analiza celokupne dnevne dinamike cvetanja nije pokazala statistički značajnu promenu oblika krive cvetanja usled temperaturnog tretmana ni u jednoj populaciji. Ipak, marginalno značajan efekat temperaturnog tretmana u Populaciji 1 ukazuje na trend promene vremenskog rasporeda otvaranja cvetova. Poređenje celih modelovanih krivih potvrdilo je da ovaj efekat nije bio dovoljno izražen da dovede do statistički značajne razlike u ukupnoj dinamici cvetanja. Analiza celokupne dinamike cvetanja može pružiti informacije koje se ne mogu dobiti razmatranjem samo pojedinačnih fenoloških parametara, jer početak, maksimum i završetak cvetanja ne moraju reagovati međusobno usklađeno (Elmendorf i Hollister, 2023). Eksperimentalno zagrevanje stoga ne mora uticati na sve delove vremenskog obrasca cvetanja na isti način. Kod nekih vrsta zagrevanje dovodi do približno ravnomernog pomeranja cvetanja u vremenu, dok kod drugih menja oblik krive njenim sažimanjem ili širenjem (Lorer i sar., 2024). Promene oblika krive u toplijim uslovima zabeležene su i u dugoročnim fenološkim istraživanjima, uključujući pojavu izraženije bimodalne raspodele cvetanja (Aldridge i sar., 2011). U tom kontekstu, marginalno značajan efekat temperaturnog tretmana u Populaciji 1 može ukazivati na slabije izraženu promenu vremenskog rasporeda otvaranja cvetova, koja nije bila dovoljna da dovede do statistički značajne razlike između celih modelovanih krivih. Nasuprot tome, celokupne modelovane krive cvetanja značajno su se razlikovale između populacija. Ova razlika može odražavati istovremene razlike u broju cvetova i njihovom rasporedu tokom vremena, ali poređenje celih modelovanih krivih ne omogućava odvojenu procenu doprinosa ova dva aspekta. Razlike između populacija mogu odražavati genetičke razlike, razlike u lokalnim uslovima sredine ili njihovo zajedničko delovanje.

Povećanje temperature može uticati ne samo na vreme cvetanja već i na broj proizvedenih cvetova, pri čemu smer i intenzitet ovog odgovora zavise od vrste i uslova sredine (Pan i sar., 2017; Zi i sar., 2023). U našoj studiji utvrđen je marginalno značajan trend smanjenja očekivanog broja cvetova kod rameta razvijenih unutar OTC-a u odnosu na ramete razvijene izvan njih. Iako je trend smanjenja broja cvetova bio izraženiji u Populaciji 2, interakcija temperaturnog tretmana i populacije nije bila statistički značajna, pa razlika u intenzitetu odgovora između populacija nije statistički potvrđena. Meta-analiza Zi i saradnika (2023) nije pokazala opšti efekat eksperimentalnog zagrevanja na broj cvetova kod kopnenih biljaka, ali je ukazala na to da odgovor zavisi od ekološkog i eksperimentalnog konteksta. Smanjenje broja cvetova utvrđeno je u polusušnim travnim ekosistemima, dok u drugim tipovima ekosistema nije zabeležen opšti efekat zagrevanja. Takođe, smanjenje broja cvetova bilo je izraženije pri blagom zagrevanju manjem od 2 °C, dok pri zagrevanju od 2 °C i više nije utvrđen opšti odgovor. Meta-analiza je takođe pokazala da je odgovor broja cvetova zavisio od trajanja eksperimenta, pri čemu je u studijama koje su trajale duže od pet godina utvrđeno izraženije smanjenje broja cvetova, dok u kraćim studijama jasan obrazac nije potvrđen (Zi i sar., 2023). Relativno kratko trajanje eksperimentalnog zagrevanja u našem istraživanju (približno 22 meseca) do praćenja fenologije cvetanja moglo bi biti jedan od razloga zbog kojih je smanjenje broja cvetova u odgovoru na povišenu temperaturu utvrđeno samo na nivou trenda. Verovatnoća cvetanja nije se statistički značajno razlikovala između temperaturnih tretmana, prosečno za obe populacije. Ipak, marginalno značajna interakcija T × P ukazuje na trend različitog odgovora verovatnoće cvetanja između populacija, iako razlike između tretmana unutar pojedinačnih populacija nisu bile statistički značajne. Dobijeni rezultati sugerišu da se odgovor *I. pumila* na blago povećanje temperature u većoj meri ispoljava kroz promenu broja proizvedenih cvetova, nego kroz promenu verovatnoće cvetanja.

Iako fenologija cvetanja određuje početne uslove za polnu reprodukciju, njen konačan ishod zavisi i od uspešnosti narednih faza, od oprašivanja do formiranja ploda i semena, koje ne

moraju biti jednako osetljive na povećanje temperature (Collins i sar., 2021; Pan i sar., 2017). U našem istraživanju, proporcija oprašenih cvetova bila je gotovo dvostruko veća kod rameta razvijenih izvan OTC-a nego kod onih unutar njih, u obe populacije. Ovako velika razlika, uočena u obe populacije, ukazuje na mogućnost da je, pored povećanja temperature, na uspešnost oprašivanja uticalo i fizičko prisustvo OTC-a. Mogućnost da OTC konstrukcija otežava oprašivačima pristup cvetovima pokazana je i u drugim studijama na različitim entomofilnim vrstama biljaka. Adamson i Iler (2021) utvrdili su da je učestalost poseta oprašivača kod subalpskih vrsta *Delphinium nuttallianum* i *Potentilla pulcherrima* bila manja unutar OTC-a za 92 %, odnosno 85 %, dok je kod *D. nuttallianum* zabeležena i manja količina polena na žigovima tučka. Smanjena učestalost poseta insekata biljkama unutar OTC-a zabeležena je i u eksperimentu na zajednici niskoarktičke tundre, u kojem su Khorsand i saradnici (2025) pratili posete oprašivača na 27 biljnih vrsta. Na osnovu ovih nalaza može se pretpostaviti da manji udeo oprašenih cvetova *I. pumila* unutar OTC-a u našem *in situ* eksperimentu ne odražava isključivo odgovor na povećanje temperature, već i mogući uticaj fizičke barijere koju predstavlja OTC konstrukcija. Zbog toga je reproduktivni učinak nakon uspešnog formiranja čaure posebno razmatran na osnovu broja i ukupne mase semena po čauri. Broj semena po čauri nije se statistički značajno razlikovao između temperaturnih tretmana, što ukazuje da u uspešno formiranim čaurama nije utvrđena značajna promena broja razvijenih semena u odgovoru na blago povećanje temperature. Meta-analiza Zi i saradnika (2023) takođe nije pokazala opšti efekat eksperimentalnog zagrevanja na broj semena, uz veliku varijabilnost odgovora između studija. Ukupna produkcija semena zavisi od uspešnosti prethodnih faza reproduktivnog procesa, uključujući formiranje cvetova, oprašivanje i oplodnju, formiranje plodova i uslove tokom razvića samog semena (Zi i sar., 2023). Povezanost odgovora uzastopnih reproduktivnih faza pokazana je i u meta-analizi Zi i saradnika (2023), u kojoj su efekti zagrevanja na broj cvetova bili povezani sa efektima na broj plodova i semena. Jedan od mogućih puteva kroz koji se ovaj odnos ostvaruje pokazan je u eksperimentima Liu i saradnika (2012) i Pan i saradnika (2017), u kojima je smanjenje ukupne produkcije semena pri zagrevanju bilo prvenstveno povezano sa manjim brojem cvetova, dok broj semena po uspešno formiranom plodu nije bio smanjen. Sličan obrazac uočen je i u našem istraživanju, u kojem je pri povišenoj temperaturi utvrđen trend smanjenja broja cvetova, dok se broj semena po uspešno formiranoj čauri nije statistički značajno promenio. Za razliku od broja semena po čauri, za ukupnu masu semena po čauri utvrđen je marginalno značajan trend povećanja u odgovoru na povišenu temperaturu. Meta-analiza Zi i saradnika (2023) pokazala je prosečno povećanje mase semena pri eksperimentalnom zagrevanju, dok broj semena nije bio promenjen. Autori su povećanje mase semena povezali sa većim ulaganjem resursa u reprodukciju usled povećane količine biomase, kao i sa ranijim početkom razvića semena, koji omogućava duži period za njegovo formiranje. Pojedinačne studije, međutim, pokazuju da odgovor mase semena nije uniforman, pa se pri zagrevanju može povećati (Ø. Totland, 1997, 1999; Zhang i sar., 2019), smanjiti (C. Zhang i sar., 2019; X.-H. Zhou i He, 2020) ili ostati nepromenjena (Alatalo i Totland, 1997; Hovenden i sar., 2008), što ukazuje na izraženu zavisnost odgovora od vrste i konkretnih uslova sredine. U našem istraživanju nije utvrđena statistički značajna povezanost između prosečnog broja semena po čauri i prosečne mase pojedinačnog semena ni u jednom od analiziranih slučajeva. Ovakav rezultat ne potvrđuje očekivanu negativnu povezanost između broja i veličine semena, koja bi mogla ukazivati na kompromis između ove dve komponente reproduktivnog uspeha. Ni rezultati meta-analize Zi i saradnika (2023) nisu pokazali očekivanu negativnu povezanost između broja i mase semena. Autori su povećanje mase semena uz nepromenjen broj semena tumačili kao pokazatelj većeg ulaganja resursa u reprodukciju pri zagrevanju. U našem istraživanju, nepromenjen broj semena po čauri i marginalno značajan trend povećanja ukupne mase semena po čauri ukazuju da veća masa semena u uslovima povišene temperature nije bila praćena smanjenjem broja semena po čauri. Međutim, na osnovu korelacione analize nije moguće zaključiti o mehanizmu

raspodele resursa između broja i veličine semena. Nezavisno od temperaturnog tretmana, Populacija 1 imala je veći očekivani broj i veću ukupnu masu semena po čauri od Populacije 2. Razlike između populacija, prethodno utvrđene za pojedine parametre fenologije i broj cvetova, uočene su i u reproduktivnom učinku nakon formiranja čaure. Ovi rezultati pokazuju da se dve populacije nisu razlikovale samo u pojedinim komponentama fenologije i broju cvetova već i u broju i ukupnoj masi semena u uspešno formiranim čaurama.

Kod klonalnih biljaka relativni doprinos polnogi vegetativnog razmnožavanja može se menjati u zavisnosti od uslova sredine, pri čemu ova dva načina reprodukcije imaju različite ekološke i evolucione posledice (Herben i sar., 2015; Y. Y. Yang i Kim, 2016). Jiang i saradnici (2025) su u dvadesettrogodišnjem istraživanju klonalne vrste *Spartina alterniflora* pokazali da je u toplijim godinama polna reprodukcija opadala, dok je vegetativna reprodukcija ostajala relativno stabilna, čime se njihov odnos pomerao ka većem oslanjanju na vegetativno razmnožavanje. Autori ukazuju da bi dugotrajno održavanje takvog obrasca moglo ograničiti protok gena, stvaranje novih genotipova i širenje semenom, a time potencijalno doprineti smanjenju genetičke varijabilnosti. Rezultati našeg istraživanja, međutim, ne ukazuju na jedinstven odgovor svih analiziranih komponenti seksualne reprodukcije *I. pumila* na blago povećanje temperature. Verovatnoća cvetanja i broj semena po čauri nisu se statistički značajno promenili, dok je za broj cvetova utvrđen marginalno značajan trend smanjenja, a za ukupnu masu semena po čauri marginalno značajan trend povećanja. Istovremeno, gotovo dvostruko manji udeo oprašenih cvetova unutar OTC-a ne može se pripisati isključivo povećanju temperature zbog mogućeg uticaja same OTC konstrukcije. Dobijeni obrasci ukazuju na različitu osetljivost pojedinih faza polne reprodukcije na blago povećanje temperature, a ne na jedinstveno smanjenje polnereprodukcije. Kako vegetativna reprodukcija u ovom eksperimentu nije praćena, na osnovu dobijenih rezultata nije moguće zaključiti da li je došlo do promene relativnog doprinosa polnog i vegetativnog razmnožavanja *I. pumila*.

U našoj studiji, broj proizvedenih semena po cvetnom rametu korišćen je kao mera adaptivne vrednosti. Iako su prosečne vrednosti apsolutne adaptivne vrednosti bile niže unutar OTC-a, nije utvrđen statistički značajan efekat blagog povećanja temperature na apsolutnu adaptivnu vrednost, niti značajna interakcija temperaturnog tretmana i populacije. Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima drugih eksperimenata u prirodi koji pokazuju da efekat zagrevanja na komponente adaptivne vrednosti biljaka nije jedinstven, već može zavisiti od načina zagrevanja, osobina vrste i sredinskog konteksta u kojem se zagrevanje odvija (Jacques i sar., 2015; Anderson, 2016).

Rezultati selekcionih analiza pokazali su da veće vrednosti biohemijskih osobina uključenih u odgovor na stres nisu po pravilu bile povezane sa većom relativnom adaptivnom vrednošću. Za pojedinačne Hsp nisu utvrđeni statistički značajni linearni selekcioni gradijenti. Ipak, u Populaciji 1, na ambijentalnoj temperaturi utvrđen je marginalno značajan pozitivan selekcioni gradijent za Hsp101 i marginalno značajan negativan selekcioni gradijent za ukupni Hsp17.6. Ovi rezultati ukazuju na suprotne trendove povezanosti relativnih količina ova dva Hsp sa relativnom adaptivnom vrednošću, ali ne predstavljaju statistički potvrđenu selekciju na ove osobine. Odsustvo statistički značajnih selekcionih gradijenata za Hsp ne isključuje njihov značaj u odgovoru biljaka na temperaturni stres. Pokazano je, na primer, kod *A. thaliana* da se efekat Hsp101 na adaptivnu vrednost može razlikovati između genotipova i temperaturnih uslova, uz moguće troškove povećane ekspresije povezane sa smanjenim rastom korena (Tonsor i sar., 2008). Ovakvi nalazi pokazuju da veća količina proteina uključenih u odgovor na stres ne mora nužno biti povezana sa većom adaptivnom vrednošću. Za razliku od Hsp, za pojedinačne komponente antioksidativnog sistema utvrđeni su statistički značajni linearni selekcioni gradijenti kod rameta razvijenih na povišenoj temperaturi. U Populaciji 1 utvrđeni su negativni selekcioni gradijenti za ukupni APX i ukupni SOD, dok je u Populaciji 2 selekcioni

gradijent za CAT bio pozitivan. Negativni gradijenti za ukupni APX i ukupni SOD ukazuju da su u Populaciji 1 genotipovi sa većim vrednostima ovih osobina imali nižu adaptivnu vrednost, dok pozitivan gradijent za CAT u Populaciji 2 ukazuje na suprotan obrazac. S obzirom na to da pojedinačni antioksidativni enzimi imaju različite funkcionalne uloge, njihove veće vrednosti ne moraju imati iste posledice po adaptivnu vrednost. Procenjene vrednosti pojedinačnih selekcionih gradijenata za obe grupe biohemijskih osobina pokazivale su razlike u smeru i veličini između eksperimentalnih grupa. Ipak, formalni testovi interakcija nisu pokazali statistički značajne razlike u selekcionim gradijentima između temperaturnih tretmana ili populacija, niti značajnu interakciju T × P. Zbog toga se na osnovu ovih rezultata ne može zaključiti da su se selekcioni gradijenti sistematski razlikovali između populacija ili temperaturnih uslova. Na nivou ukupnih vrednosti biohemijskih osobina statistički značajan rezultat selekcione analize utvrđen je za ukupnu vrednost antioksidativnih enzima u Populaciji 1 na povišenoj temperaturi. Univarijantna selekciona analiza pokazala je statistički značajan negativan linearni selekcioni diferencijal, što ukazuje na to da su genotipovi sa većom ukupnom vrednošću antioksidativnih enzima imali nižu relativnu adaptivnu vrednost. U multivarijatnoj selekcionoj analizi, u kojoj su ukupne vrednosti Hsp i antioksidativnih enzima istovremeno uključene u model, parcijalni selekcioni gradijent za antioksidativne enzime takođe je bio negativan, ali marginalno značajan. Ovaj rezultat ukazuje na tendenciju ka negativnoj povezanosti ukupne vrednosti antioksidativnih enzima sa relativnom adaptivnom vrednošću i kada je ukupna vrednost Hsp istovremeno uključena u model. Negativna povezanost ukupne vrednosti antioksidativnih enzima sa relativnom adaptivnom vrednošću ne znači nužno da je izraženiji antioksidativni odgovor maladaptivan. Ovakav obrazac može odražavati fiziološke troškove intenzivnijeg biohemijskog odgovora, ali i veće opterećenje stresom kod genotipova koji istovremeno ispoljavaju izraženiji antioksidativni odgovor i nižu adaptivnu vrednost. Na osnovu sprovedene selekcione analize ova dva moguća objašnjenja nije moguće razdvojiti. Sherrard i Maherali (2006) pokazali su da je veći biohemijski kapacitet fotosinteze kod divljeg ovsa bio nepovoljan u uslovima suše, što su povezali sa troškovima ulaganja u stvaranje i održavanje fotosintetskog aparata koji u takvim uslovima nije mogao biti u potpunosti iskorišćen. Iako se ovaj nalaz ne odnosi neposredno na antioksidativni sistem, on pokazuje da veći fiziološki ili biohemijski kapacitet u stresnim uslovima ne mora nužno biti povezan sa većom adaptivnom vrednošću. Carvalho i saradnici (2022) pokazali su da se povezanost fizioloških i biohemijskih osobina sa adaptivnom vrednošću može menjati u zavisnosti od uslova sredine, pri čemu su se smer i intenzitet selekcije razlikovali između biljaka izloženih suši i onih gajenih u uslovima dobre snabdevenosti vodom. U našem istraživanju, procenjene vrednosti pojedinačnih selekcionih gradijenata takođe su pokazivale različite smerove i veličine između eksperimentalnih grupa, ali te razlike nisu bile statistički potvrđene formalnim testovima interakcija. Rezultati naše studije stoga pokazuju da veće vrednosti komponenti biohemijskog odgovora na povišenu temperaturu nisu po pravilu bile povezane sa većom adaptivnom vrednošću. Najjasniji obrazac utvrđen je za ukupnu vrednost antioksidativnih enzima u Populaciji 1 na povišenoj temperaturi, dok nije utvrđeno da su se selekcioni gradijenti statistički značajno razlikovali između populacija i temperaturnih uslova.

5.2.3. Integrisani fenotip

Fenotipska integracija podrazumeva da osobine organizma ne variraju potpuno nezavisno, već su međusobno povezane funkcionalnim, genetičkim i/ili ontogenetskim vezama (Armbruster i sar., 2014). Odgovor biljaka na promene sredine zato ne obuhvata samo promene fenotipskih vrednosti pojedinačnih osobina, odnosno njihov plastični odgovor, već može uključivati i promene obrazaca korelacije i kovarijacije među osobinama (Bradshaw, 1965; Schlichting, 1989; Pigliucci i Preston, 2004). Stepen integracije pritom nije nužno jedinstveno svojstvo celog fenotipa, već se može razlikovati među funkcionalnim modulima iste biljke i menjati u zavisnosti od uslova sredine (Preston i Ackerly, 2004; De Kroon i sar., 2005). Takva modularna

organizacija može omogućiti da se pojedine grupe osobina menjaju relativno nezavisno, uz očuvanje veza neophodnih za njihovu zajedničku funkciju. Iako sredinski uslovi mogu menjati obrasce kovarijacije među osobinama, smer i biološki značaj tih promena zavise od vrste i konkretnog sredinskog konteksta, pa njihove ekološke i evolucione posledice još uvek nisu potpuno razjašnjene (Matesanz i sar., 2021; He i sar., 2024; Stotz i sar., 2025). Zbog toga se uticaj zagrevanja na integrisani fenotip ne može proceniti samo na osnovu pojedinačnih korelacija, već zahteva istovremeno razmatranje njihove ukupne strukture i stepena zajedničkog variranja osobina.

Analiza fenotipskih korelacija predstavlja jedan od pristupa za ispitivanje strukture integrisanog fenotipa i njene stabilnosti u različitim uslovima sredine (Shaar-Moshe i sar., 2019). Budući da integrisani fenotipovi mogu imati ekološke i evolucione posledice (Sheehy i Laskowski, 2023), promene korelacione strukture mogu pokazati da li se i na koji način odnosi među osobinama reorganizuju u odgovoru na promenjene uslove sredine. U *in situ* eksperimentu, ukupan broj značajnih korelacija bio je nešto manji kod rameta razvijanih na povišenoj temperaturi, prvenstveno zbog manjeg broja veza između različitih grupa funkcionalno povezanih osobina. Međutim, sam broj statistički značajnih korelacija nije dovoljan pokazatelj ukupnog stepena fenotipske integracije, jer zavisi i od veličine uzorka, varijabilnosti osobina i statističke snage. Broj značajnih korelacija unutar pojedinačnih grupa nije pokazivao konzistentan smer promene između alternativnih temperaturnih tretmana, već je zavisio od grupe osobina, sezone i godine. Ovakav obrazac ne ukazuje na opšte jačanje ili slabljenje veza među osobinama pri zagrevanju, već na selektivnu i vremenski zavisnu reorganizaciju pojedinih odnosa. Ovaj rezultat je u skladu sa nalazima da promene sredine mogu reorganizovati obrasce kovarijacije među osobinama, pri čemu smer i obim tih promena mogu zavisiti od vrste, uslova sredine i načina na koji pojedinačne osobine plastično odgovaraju na njih (Matesanz i sar., 2021; He i sar., 2024). Pojedine grupe funkcionalno povezanih osobina razlikovale su se prema obrascu međusobne povezanosti osobina koje ih čine. Posmatrano tokom celog eksperimentalnog perioda, većina značajnih korelacija među anatomsko-morfološkim osobinama bila je negativna, dok je jedina pozitivna korelacija utvrđena između LT i SLWC. Negativna korelacija između SLA i LT i pozitivna korelacija između SLWC i LT bile su jedine značajne veze prisutne u oba temperaturna tretmana u sve četiri vremenske tačke. Suprotni smerovi ovih korelacija pokazuju da se LT menjala istosmerno sa SLWC, a suprotno od SLA. Takav obrazac saglasan je sa strukturnom povezanošću ovih osobina, ali sam po sebi ne dokazuje postojanje funkcionalnog kompromisa ili uzajamnih ograničenja. Visoke vrednosti Mantelovog koeficijenta korelacije u svim vremenskim tačkama ukazivale su na veliku sličnost korelacionih matrica anatomsko-morfoloških osobina između temperaturnih tretmana. Međutim, ta sličnost bila je statistički značajna samo tokom leta prve i proleća druge godine, zbog čega je opravdanije govoriti o relativno konzistentnoj nego o potpuno stabilnoj korelacionoj strukturi. Za razliku od anatomsko-morfoloških osobina, sve značajne korelacije između relativnih količina Hsp bile su pozitivne. U oba temperaturna tretmana broj značajnih korelacija između Hsp smanjivao se od proleća ka letu, tokom obe eksperimentalne godine. Podudarnost korelacionih matrica Hsp između temperaturnih tretmana zavisila je od sezone i godine. Matrice nisu bile podudarne tokom leta prve i proleća druge godine, dok je statistički značajna sličnost potvrđena samo tokom leta druge godine. Ovakav obrazac pokazuje da je uticaj zagrevanja na odnose između Hsp zavisio od vremenskog konteksta. Kod antioksidativnih enzima nijedna značajna korelacija nije bila prisutna u oba temperaturna tretmana kroz sve vremenske tačke. Iako su se pojedinačne korelacije između antioksidativnih enzima menjale kroz vreme, Mantelov test je pokazao značajnu sličnost korelacionih matrica između temperaturnih tretmana u tri od četiri vremenske tačke. Nepodudarnost matrica utvrđena je samo tokom proleća prve godine. Ovaj rezultat pokazuje da sličnost opšte korelacione strukture ne zahteva očuvanje svake pojedinačne veze između enzima. Sveukupno,

sličnost korelacionih matrica između temperaturnih tretmana zavisila je od grupe osobina, sezone i godine. Anatomsko-morfološke osobine imale su konzistentno visoke vrednosti Mantelovog koeficijenta korelacije, dok su matrice Hsp i antioksidativnih enzima pokazivale izraženije vremensko variranje. U oba temperaturna tretmana veći broj značajnih korelacija povezivao je osobine koje pripadaju različitim grupama nego osobine unutar iste grupe, a među tim međugrupnim vezama preovladavale su pozitivne korelacije. Ovakav obrazac ukazuje da su veze unutar pojedinačnih funkcionalnih grupa bile relativno stabilnije, dok su odnosi između grupa bili fleksibilniji i osetljiviji na temperaturni i vremenski kontekst. To može značiti da je blago povećanje temperature pre menjalo međusobno usklađivanje različitih funkcionalnih modula nego njihovu unutrašnju organizaciju. Ipak, pojedine međugrupne veze, uključujući pozitivne korelacije MnSOD sa Hsp70 i Hsp101, uočene su u oba temperaturna tretmana i u više vremenskih tačaka. Ovaj nalaz ukazuje da su pojedine veze između različitih funkcionalnih grupa bile relativno postojane, iako se šira korelaciona struktura menjala između temperaturnih tretmana i vremenskih tačaka. Ponovljeno javljanje ovih korelacija može ukazivati na postojaniju povezanost između sistema Hsp i antioksidativne zaštite u odnosu na druge korelacije između različitih grupa osobina. Posmatrani zajedno, ovi rezultati ukazuju da je blago povećanje temperature bilo praćeno vremenski zavisnim promenama odnosa između funkcionalnih grupa, uz očuvanje pojedinih međugrupnih veza. Takav obrazac može se tumačiti kao delimična reorganizacija integrisanog fenotipa u promenjenim uslovima sredine, ali ne pruža dokaz da je ona bila adaptivna (Matesanz i sar., 2021; He i sar., 2024).

Kontrolisani *ex situ* eksperiment pokazao je jednu važnu sličnost sa *in situ* eksperimentom, a to je da je snažna pozitivna korelacija između SLWC i LT bila prisutna u oba temperaturna tretmana. Očuvanost ove veze može odražavati blisku povezanost hidratacionih i strukturnih svojstava lista. U oba temperaturna tretmana viši procenjeni sadržaj hlorofila bio je povezan sa višim vrednostima LDMC i LT i nižim vrednostima SLA, što ukazuje na stabilnu povezanost sadržaja hlorofila sa građom lista. Negativna korelacija između SLA i LDMC, osobina koje se često povezuju sa suprotnim krajevima ose bržeg sticanja i očuvanja resursa, utvrđena je samo na ambijentalnoj temperaturi (Wilson i sar., 1999a). U *in situ* eksperimentu, ista korelacija utvrđena je samo tokom proleća druge godine kod rameta razvijenih izvan OTC-a, na ambijentalnoj temperaturi. Posmatrani zajedno, ovi rezultati ukazuju da je negativna povezanost SLA i LDMC zavisila od sredinskog konteksta i da se jasnije ispoljavala pri ambijentalnoj nego pri povišenoj temperaturi. Ovakva zavisnost od sredinskog konteksta u skladu je sa nalazima da na variranje SLA i LDMC, zajednički utiču klimatski uslovi i svojstva zemljišta, pri čemu se njihov relativni značaj razlikuje među životnim formama biljaka (Z. Wang i sar., 2022). Iako su pojedine korelacije bile specifične za jedan temperaturni tretman, visoka i statistički značajna sličnost korelacionih matrica pokazala je da je opšta struktura odnosa među osobinama ostala uglavnom očuvana između tretmana. Negativna povezanost funkcionalnih i mehaničkih osobina, posmatranih kao celine, u oba temperaturna tretmana, ukazuje na postojan obrazac suprotan obrascima njihovog zajedničkog variranja. Takav obrazac može biti povezan sa različitim strategijama ulaganja u rastenje i strukturu lista, ali se ne može tumačiti kao neposredan dokaz kompromisa u raspodeli resursa. Sveukupno, rezultati *ex situ* eksperimenta, slično nalazima *in situ* eksperimenta, ukazuju na pretežno očuvanu opštu korelacionu strukturu, uz ograničene promene pojedinačnih veza povezane sa temperaturnim tretmanom.

Analiza korelacija između indeksa fenotipske plastičnosti (PI_T) pokazala je da su gotovo sve značajne korelacije utvrđene između osobina koje pripadaju istoj funkcionalnoj grupi. Takav obrazac ukazuje da su veličine plastičnih odgovora funkcionalno povezanih osobina češće bile međusobno povezane. Ovakav nalaz govori u prilog tome da funkcionalno povezane osobine mogu ispoljavati sličnije obrasce plastičnosti, što je u skladu sa rezultatima He i saradnika (2024), prema kojima je sličnost plastičnih odgovora bila povezana sa očuvanjem korelacija

među osobinama (He i sar., 2024). Zajednička funkcionalna ili razvojna osnova osobina može doprineti takvoj povezanosti njihovih plastičnih odgovora, ali se njen osnovni mehanizam ne može utvrditi samo na osnovu korelacija između PI_T (Parsons i sar., 2020). Nasuprot tome, između osobina iz različitih funkcionalnih grupa utvrđena je samo jedna značajna korelacija, između PI_T za Hsp70 i MnSOD, što ukazuje na znatno slabiju povezanost njihovih plastičnih odgovora u odnosu na osobine unutar grupa.

Na multivarijatnom nivou, PCA je izdvojila nekoliko prepoznatljivih obrazaca zajedničkog variranja osobina: Hsp su obrazovali najkompaktniju grupu, SLWC i LT imali su sličan smer opterećenja, dok je LDMC bio usmeren suprotno njima, a među antioksidativnim enzimima pojedine izoforme Cu/ZnSOD zauzimale su izdvojen položaj. Dok su se pojedinačni korelacioni odnosi menjali između temperaturnih tretmana i vremenskih tačaka, stepen fenotipske integracije unutar grupa funkcionalno povezanih osobina, procenjen relativnom varijansom sopstvenih vrednosti (r*VE*), nije se statistički značajno razlikovao između tretmana. Iako su prosečne vrednosti r*VE* za sve tri grupe funkcionalno povezanih osobina bile nešto više kod rameta razvijenih na povišenoj temperaturi, razlike između tretmana nisu bile statistički značajne. Kod sve tri grupe procenjene razlike u r*VE* bile su pozitivne u prvoj sezoni prve godine, a negativne u drugoj sezoni druge godine, ali ni u jednoj vremenskoj tački nisu bile statistički značajne. Ovi rezultati ukazuju da je dugotrajno blago povećanje temperature bilo praćeno promenama pojedinačnih korelacionih odnosa, dok statistički značajna promena ukupnog stepena fenotipske integracije unutar funkcionalnih grupa nije utvrđena. Takav obrazac u skladu je sa shvatanjem da promene sredine ne moraju nužno dovesti do promene ukupnog stepena fenotipske integracije, već mogu biti praćene reorganizacijom pojedinačnih obrazaca kovarijacije među osobinama (Matesanz i sar., 2021; He i sar., 2024).

Odnos između fenotipske integracije i plastičnosti dugo je razmatran u okviru hipoteze da snažnija integracija ograničava nezavisno variranje osobina, a time i raspon njihovih plastičnih odgovora (Schlichting, 1989; Gianoli i Palacio-López, 2009). Međutim, dosadašnja istraživanja nisu jednoznačno potvrdila opšti negativan odnos, već su utvrdila i odsustvo povezanosti i pozitivne odnose između integracije i plastičnosti, što pokazuje da priroda njihovog odnosa zavisi od vrste, tipa osobina i sredinskog konteksta (Zimmermann i sar., 2016; Matesanz i sar., 2021; Oyanoghafo i sar., 2023; He i sar., 2024; Stotz i sar., 2025). He i saradnici (2024) utvrdili su da su kod ariša i breze, ali ne i kod jele, osobine sa izraženijom plastičnošću pri zagrevanju bile povezane sa većim brojem drugih osobina, što su protumačili kao mogući pokazatelj funkcionalne povezanosti integracije i plastičnosti kod listopadnih, ali ne i kod zimzelenih vrsta. U našem istraživanju, Hsp su imali najvišu prosečnu vrednost PI_T, a njeno sezonsko smanjenje od proleća ka letu bilo je praćeno smanjenjem broja značajnih korelacija i vrednosti *rVE* unutar ove grupe. Vremensko podudaranje ovih promena ukazuje da su periodi izraženije plastičnosti Hsp ujedno bili periodi njihove veće međusobne povezanosti, ali samo po sebi ne dokazuje neposrednu zavisnost između ova dva svojstva. Nasuprot tome, anatomsko-morfološke osobine imale su niske i vremenski relativno stabilne vrednosti PI_T, ali relativno visok *rVE*, dok su antioksidativni enzimi imali srednje vrednosti PI_T plastičnosti i najniži *rVE*. Posmatrani zajedno, ovi obrasci ukazuju da se odnos između plastičnosti i integracije kod *I. pumila* razlikovao među funkcionalnim grupama osobina. Razlike utvrđene među grupama osobina u skladu su sa nalazima Godoy i saradnika (2012), prema kojima je fenotipska integracija bila pozitivno povezana sa plastičnošću jedne fiziološke, a negativno sa plastičnošću jedne morfološke osobine, što pokazuje da se smer ovog odnosa može razlikovati među tipovima osobina. Druga hipoteza, koju su razmatrali Parsons i saradnici (2020), a empirijski ispitivali He i saradnici (2024), jeste da se slabije povezane osobine mogu nezavisnije menjati i stoga ispoljavati različitije plastične odgovore. Iz ove pretpostavke proizilazi očekivanje da će osobine čija se korelacija održava u različitim sredinama pokazivati sličniji intenzitet plastičnog odgovora. He i saradnici (2024) utvrdili su da su parovi osobina čija je korelacija bila prisutna

i u kontrolnim uslovima i pri zagrevanju imali tendenciju da pokazuju sličnije plastične odgovore, ali je ova povezanost bila statistički značajna samo kod jedne od tri analizirane biljne vrste. Meta-analiza Stotz i saradnika (2025) pružila je sličan zaključak: veća fenotipska integracija nije bila povezana sa nižim prosečnim nivoom plastičnosti, već sa manjim variranjem plastičnih odgovora među osobinama, odnosno većom usklađenošću tih odgovora. U našem istraživanju, negativna korelacija između SLA i LT i pozitivna korelacija između SLWC i LT bile su prisutne u oba temperaturna tretmana u sve četiri vremenske tačke, a osobine unutar svakog para imale su slične vrednosti PI_T. Slično tome, obe izoforme Hsp17.6 imale su slične vrednosti PI_T i ostale međusobno povezane u većini vremenskih tačaka u oba temperaturna tretmana. Nasuprot tome, uglavnom očuvana povezanost Hsp101 i Hsp70, uprkos znatnoj razlici u njihovim vrednostima PI_T, predstavlja primer da se korelacija može održati i između osobina koje se razlikuju po intenzitetu plastičnog odgovora.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji izvedeni su sledeći zaključci:

- Blago *in situ* povećanje temperature nije izazvalo uniforman odgovor osobina lista *I. pumila*, već je on zavisio od osobine i grupe funkcionalno povezanih osobina. Kod anatomsko-morfoloških osobina, povećanje SLA uz smanjenje LDMC, SLWC i LT ukazuje na pomeranje ka fenotipu povezanom sa manjim relativnim ulaganjem u strukturne komponente lista, dok osobine stominog aparata nisu pokazale konzistentan odgovor na povećanje temperature, već izraženu sezonsku dinamiku. Veće relativne količine svih analiziranih proteina toplotnog stresa pri povišenoj temperaturi ukazuju na značajnu ulogu ovog sistema u odgovoru na blago zagrevanje, dok opšte povećanje relativne količine antioksidativnih enzima nije utvrđeno.
- Fenotipska ekspresija osobina lista *I. pumila* pokazala je izraženo sezonsko i međugodišnje variranje, pri čemu je obrazac sezonskih promena kod većine osobina zavisio od godine istraživanja. Vremenska dinamika većine osobina bila je slična između temperaturnih tretmana, dok su razlike u obrascu promena utvrđene za SD, obe izoforme Hsp17.6 i APXb.
- Prirodne populacije *I. pumila* razlikovale su se u nivou fenotipske ekspresije pojedinih osobina, ali se njihov prosečan odgovor na blago povećanje temperature nije razlikovao. Obim razlika između populacija zavisio je od grupe funkcionalno povezanih osobina, pri čemu su među anatomsko-morfološkim osobinama razlike utvrđene za SLWC i LT, dok su među biohemijskim osobinama obuhvatale sve analizirane proteine toplotnog stresa i većinu antioksidativnih enzima.
- Prirodno variranje mikroklimatskih uslova bilo je povezano sa fenotipskom ekspresijom anatomsko-morfoloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila*, pri čemu su smer i prisustvo ovih veza zavisili od osobine. Različita povezanost pojedinačnih Hsp i antioksidativnih enzima sa mikroklimatskim parametrima ukazuje da odgovor pojedinačnih komponenti istog funkcionalnog sistema na variranje uslova sredine nije bio uniforman.
- Podudarnost pravca promena SLA, LDMC, SLWC i LT između *in situ* i *ex situ* eksperimenata ukazuje na konzistentan smer njihovog odgovora na blago povećanje temperature u različitim eksperimentalnim uslovima. Nasuprot tome, različit obrazac odgovora SD između ekperimenata ukazuje na veću zavisnost ove osobine od sredinskog konteksta.
- Početak cvetanja bio je raniji pri povišenoj temperaturi, dok se trajanje centralnog perioda i ukupna dinamika cvetanja nisu statistički značajno razlikovali između temperaturnih tretmana. Efekat povećanja temperature na prosečan dan cvetanja razlikovao se između populacija.
- Odgovor različitih faza polne reprodukcije na blago povećanje temperature nije bio jedinstven. Pre formiranja čaura utvrđen je trend smanjenja broja cvetova i manji udeo oprašenih cvetova, pri čemu se efekat povećanja temperature na oprašivanje nije mogao razdvojiti od mogućeg uticaja konstrukcija korišćenih za eksperimentalno zagrevanje, koje su mogle predstavljati fizičku barijeru za oprašivače. Nakon formiranja čaure, broj semena po čauri nije se statistički značajno razlikovao između temperaturnih tretmana, dok je ukupna masa semena po čauri pokazala trend povećanja pri povišenoj temperaturi.
- Blago povećanje temperature nije dovelo do statistički značajne promene apsolutne adaptivne vrednosti klonalnih genotipova *I. pumila*. Obrasci fenotipske selekcije razlikovali

su se u zavisnosti od analizirane biohemijske osobine i populacije. Pri povišenoj temperaturi utvrđeni su negativni selekcioni gradijenti za ukupni APX i ukupni SOD u Populaciji 1 i pozitivan selekcioni gradijent za CAT u Populaciji 2, kao i negativan selekcioni diferencijal za ukupnu vrednost antioksidativnih enzima u Populaciji 1. Formalni testovi, međutim, nisu pokazali statistički značajne razlike u selekcionim gradijentima između populacija i temperaturnih tretmana.

- Kvantitativna procena fenotipske plastičnosti u odgovoru na povišenu temperaturu pokazala je jasnu hijerarhiju među grupama funkcionalno povezanih osobina. U *in situ* eksperimentu, proteini toplotnog stresa su ispoljili najveći nivo plastičnosti, antioksidativni enzimi intermedijarni, a anatomsko-morfološke osobine lista najmanji. U *ex situ* eksperimentu najveću plastičnost pokazali su I_1 i SD, dok su SLA, LDMC, SLWC i LT ispoljili relativno nizak nivo plastičnosti, sličan onome utvrđenom *in situ*.

- Sezonska plastičnost pokazala je sličnu hijerarhiju među grupama osobina kao i plastičnost prema temperaturnom tretmanu, što ukazuje da je opšti redosled nivoa plastičnosti bio u velikoj meri očuvan bez obzira na to da li je plastičnost procenjivana između temperaturnih tretmana ili između sezona. Nivo sezonske plastičnosti većine osobina razlikovao se između godina. Pri povišenoj temperaturi, uočen je trend povećanja sezonske plastičnosti pojedinih osobina, ali nije utvrđeno njeno opšte povećanje.

- Posmatrano tokom celokupnog eksperimentalnog perioda, stepen fenotipske integracije bio je najveći kod anatomsko-morfoloških osobina, nešto niži kod proteina toplotnog stresa, a najmanji kod antioksidativnih enzima. Blago povećanje temperature nije dovelo do statistički značajne promene stepena fenotipske integracije ni u jednoj grupi funkcionalno povezanih osobina, ali je bilo praćeno promenama pojedinačnih korelacionih odnosa. Obrazac ovih promena razlikovao se između grupa osobina, sezona i godina.

7. LITERATURA

Abouzari, A., & Fakheri, B. A. (2015). Reactive oxygen species: Generation, Oxidative Damage, and Signal Transduction. *International Journal of Life Sciences*, *9*(5), 3–17. https://doi.org/10.3126/ijls.v9i5.12699.

Adamson, C. P., & Iler, A. (2021). Open-top warming chambers reduce animal pollination of two subalpine herbs. *Journal of Pollination Ecology*, *29*, 231–239. https://doi.org/10.26786/1920-7603(2021)638.

Agusti, S., Enriquez, S., Frost-Christensen, H., Sand-Jensen, K., & Duarte, C. M. (1994). Light Harvesting Among Photosynthetic Organisms. *Functional Ecology*, *8*(2), 273. https://doi.org/10.2307/2389911.

Ahmad, P., & Prasad, M. N. V. (2012). *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* (1st ed.). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4.

Ahuja, I., De Vos, R. C. H., Bones, A. M., & Hall, R. D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, *15*(12), 664–674. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.002.

Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, *19*(6), 716–723. https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705.

Akram, M. A., Zhang, Y., Wang, X., Shrestha, N., Malik, K., Khan, I., Ma, W., Sun, Y., Li, F., Ran, J., & Deng, J. (2022). Phylogenetic independence in the variations in leaf functional traits among different plant life forms in an arid environment. *Journal of Plant Physiology*, *272*, 153671. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153671.

Al Haj Khaled, R., Duru, M., Theau, J. P., Plantureux, S., & Cruz, P. (2005). Variation in leaf traits through seasons and N-availability levels and its consequences for ranking grassland species. *Journal of Vegetation Science*, *16*(4), 391–398. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2005.tb02378.x.

Alatalo, J. M., & Totland, Ø. (1997). Response to simulated climatic change in an alpine and subarctic pollen-risk strategist, *Silene acaulis*. *Global Change Biology*, *3*(S1), 74–79. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.1997.gcb133.x.

Aldridge, G., Inouye, D. W., Forrest, J. R. K., Barr, W. A., & Miller-Rushing, A. J. (2011). Emergence of a mid-season period of low floral resources in a montane meadow ecosystem associated with climate change: Seasonal low in montane flowering. *Journal of Ecology*, *99*(4), 905–913. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01826.x.

Almeselmani, M., Deshmukh, P., & Sairam, R. (2009). High temperature stress tolerance in wheat genotypes: Role of antioxidant defence enzymes. *Acta Agronomica Hungarica*, *57*(1), 1–14. https://doi.org/10.1556/AAgr.57.2009.1.1.

Almoguera, C., Coca, M. A., & Jordano, J. (1993). Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *The Plant Journal*, *4*(6), 947–958. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04060947.x.

Alscher, R. G. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, *53*(372), 1331–1341. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331.

Al-Whaibi, M. H. (2011). Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University - Science*, *23*(2), 139–150. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022.

Amasino, R. (2004). Vernalization, Competence, and the Epigenetic Memory of Winter. *The Plant Cell*, *16*(10), 2553–2559. https://doi.org/10.1105/tpc.104.161070.

An, Y., Shen, Y., & Zhang, Z. (2009). Effects of mechanical damage and herbivore wounding on H2O2 metabolism and antioxidant enzyme activities in hybrid poplar leaves. *Journal of Forestry Research*, *20*(2), 156–160. https://doi.org/10.1007/s11676-009-0027-x.

Anderson, J. T. (2016). Plant fitness in a rapidly changing world. *New Phytologist*, *210*(1), 81–87. https://doi.org/10.1111/nph.13693.

Anderson-Teixeira, K. J., Delong, J. P., Fox, A. M., Brese, D. A., & Litvak, M. E. (2011). Differential responses of production and respiration to temperature and moisture drive the carbon balance across a climatic gradient in New Mexico: CARBON BALANCE ACROSS NM ELEVATIONAL GRADIENT. *Global Change Biology*, *17*(1), 410–424. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02269.x.

Andrási, N., Pettkó-Szandtner, A., & Szabados, L. (2021). Diversity of plant heat shock factors: Regulation, interactions, and functions. *Journal of Experimental Botany*, *72*(5), 1558–1575. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa576.

Arft, A. M., Walker, M. D., Gurevitch, J., Alatalo, J. M., Bret-Harte, M. S., Dale, M., Diemer, M., Gugerli, F., Henry, G. H. R., Jones, M. H., Hollister, R. D., Jónsdóttir, I. S., Laine, K., Lévesque, E., Marion, G. M., Molau, U., Mølgaard, P., Nordenhäll, U., Raszhivin, V., … Wookey, P. A. (1999). RESPONSES OF TUNDRA PLANTS TO EXPERIMENTAL WARMING:META-ANALYSIS OF THE INTERNATIONAL TUNDRA EXPERIMENT. *Ecological Monographs*, *69*(4), 491–511. https://doi.org/10.1890/0012-9615(1999)069%5B0491:ROTPTE%5D2.0.CO;2.

Armbruster, W. S., Pélabon, C., Bolstad, G. H., & Hansen, T. F. (2014). Integrated phenotypes: Understanding trait covariation in plants and animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1649), 20130245. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0245.

Arnold, P. A., Kruuk, L. E. B., & Nicotra, A. B. (2019). How to analyse plant phenotypic plasticity in response to a changing climate. *New Phytologist*, *222*(3), 1235–1241. https://doi.org/10.1111/nph.15656.

Atkin, O. K., Scheurwater, I., & Pons, T. L. (2006). High thermal acclimation potential of both photosynthesis and respiration in two lowland *Plantago* species in contrast to an alpine congeneric. *Global Change Biology*, *12*(3), 500–515. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01114.x.

Aubin-Horth, N., & Renn, S. C. P. (2009). Genomic reaction norms: Using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Molecular Ecology*, *18*(18), 3763–3780. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04313.x.

Auge, G., Hankofer, V., Groth, M., Antoniou-Kourounioti, R., Ratikainen, I., & Lampei, C. (2023). Plant environmental memory: Implications, mechanisms and opportunities for plant scientists and beyond. *AoB PLANTS*, *15*(4), plad032. https://doi.org/10.1093/aobpla/plad032.

Augustine, S. M., Narayan, J. A., Syamaladevi, D. P., Appunu, C., Chakravarthi, M., Ravichandran, V., & Subramonian, N. (2015). Erianthus arundinaceus HSP70 (EaHSP70) overexpression increases drought and salinity tolerance in sugarcane (Saccharum spp. Hybrid). *Plant Science*, *232*, 23–34. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.012.

Avramov, S., Pemac, D., & Tucić, B. (2007). Phenotypic plasticity in response to an irradiance gradient in Iris pumila: Adaptive value and evolutionary constraints. *Plant Ecology*, *190*(2), 275–290. https://doi.org/10.1007/s11258-006-9207-3.

Avramov, S., & Tucić, B. (2006). Plasticity to an irradiance gradient in foliage attributes of a perennial monocot Iris pumila (L.): Comparison of populations from habitats of contrasting light conditions. *Polish Journal of Ecology*, *54*(3), 403–416.

Awasthi, R., Bhandari, K., & Nayyar, H. (2015). Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Frontiers in Environmental Science*, *3*. https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00011.

Bai, W.-P., Wang, T.-Q., Liu, Q., Li, H.-J., Wei, L., & Wang, S.-M. (2026). Genome-wide analysis of HSP70 family in Zygophyllum xanthoxylum and its heat stress response in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, *45*(5), 121. https://doi.org/10.1007/s00299-026-03809-6.

Baker, A., Lin, C.-C., Lett, C., Karpinska, B., Wright, M. H., & Foyer, C. H. (2023). Catalase: A critical node in the regulation of cell fate. *Free Radical Biology and Medicine*, *199*, 56–66. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.02.009.

Baker, L. A., & Habershon, S. (2017). Photosynthetic pigment-protein complexes as highly connected networks: Implications for robust energy transport. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *473*(2201), 20170112. https://doi.org/10.1098/rspa.2017.0112.

Bakery, A., Vraggalas, S., Shalha, B., Chauhan, H., Benhamed, M., & Fragkostefanakis, S. (2024). Heat stress transcription factors as the central molecular rheostat to optimize plant survival and recovery from heat stress. *New Phytologist*, *244*(1), 51–64. https://doi.org/10.1111/nph.20017.

Balfagón, D., Terán, F., De Oliveira, T. D. R., Santa-Catarina, C., & Gómez-Cadenas, A. (2022). Citrus rootstocks modify scion antioxidant system under drought and heat stress combination. *Plant Cell Reports*, *41*(3), 593–602. https://doi.org/10.1007/s00299-021-02744-y.

Balfagón, D., Zandalinas, S. I., Baliño, P., Muriach, M., & Gómez-Cadenas, A. (2018). Involvement of ascorbate peroxidase and heat shock proteins on citrus tolerance to combined conditions of drought and high temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry*, *127*, 194–199. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.029.

Banta, J. A., Dole, J., Cruzan, M. B., & Pigliucci, M. (2007). Evidence of local adaptation to coarse-grained environmental variation in arabidopsis thaliana. *Evolution*, *61*(10), 2419–2432. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00189.x.

Baribault, T. W., Kobe, R. K., & Rothstein, D. E. (2010). Soil calcium, nitrogen, and water are correlated with aboveground net primary production in northern hardwood forests. *Forest Ecology and Management*, *260*(5), 723–733. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.05.029.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67*(1). https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01.

Bäurle, I. (2016). Plant Heat Adaptation: Priming in response to heat stress. *F1000Research*, *5*, 694. https://doi.org/10.12688/f1000research.7526.1.

Baythavong, B. S. (2011). Linking the Spatial Scale of Environmental Variation and the Evolution of Phenotypic Plasticity: Selection Favors Adaptive Plasticity in Fine-Grained Environments. *The American Naturalist*, *178*(1), 75–87. https://doi.org/10.1086/660281.

Baythavong, B. S., & Stanton, M. L. (2010). Characterizing selection on phenotypic plasticity in response to natural environmental heterogeneity. *Evolution*, no-no. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01057.x.

Berni, R., Thiry, M., Hausman, J.-F., Lutts, S., & Guerriero, G. (2024). Eustress and Plants: A Synthesis with Prospects for Cannabis sativa Cultivation. *Horticulturae*, *10*(2), 127. https://doi.org/10.3390/horticulturae10020127.

Bertolino, L. T., Caine, R. S., & Gray, J. E. (2019). Impact of Stomatal Density and Morphology on Water-Use Efficiency in a Changing World. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 225. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00225.

Bhaduri, A. M., & Fulekar, M. H. (2012). Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *11*(1), 55–69. https://doi.org/10.1007/s11157-011-9251-x.

Bigot, S., Buges, J., Gilly, L., Jacques, C., Le Boulch, P., Berger, M., Delcros, P., Domergue, J., Koehl, A., Ley-Ngardigal, B., Tran Van Canh, L., & Couée, I. (2018). Pivotal roles of environmental sensing and signaling mechanisms in plant responses to climate change. *Global Change Biology*, *24*(12), 5573–5589. https://doi.org/10.1111/gcb.14433.

Bijlsma, Bundgaard, & Boerema. (2000). Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: Predictions from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, *13*(3), 502–514. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00177.x.

Bijlsma, R., & Loeschcke, V. (2005). Environmental stress, adaptation and evolution: An overview. *Journal of Evolutionary Biology*, *18*(4), 744–749. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00962.x.

Bita, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, *4*. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273.

Bita, C. E., Zenoni, S., Vriezen, W. H., Mariani, C., Pezzotti, M., & Gerats, T. (2011). Temperature stress differentially modulates transcription in meiotic anthers of heat-tolerant and heat-sensitive tomato plants. *BMC Genomics*, *12*(1), 384. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-384.

Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., & White, J.-S. S. (2009). Generalized linear mixed models: A practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, *24*(3), 127–135. https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.008.

Bonamour, S., Chevin, L.-M., Charmantier, A., & Teplitsky, C. (2019). Phenotypic plasticity in response to climate change: The importance of cue variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *374*(1768), 20180178. https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0178.

Boston, R. S., Viitanen, P. V., & Vierling, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, *32*(1–2), 191–222. https://doi.org/10.1007/BF00039383.

Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants. In *Advances in Genetics* (Vol. 13, pp. 115–155). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60048-6.

Bramley, H., Ranawana, S. R. W. M. C. J. K., Palta, J. A., Stefanova, K., & Siddique, K. H. M. (2022). Transpirational Leaf Cooling Effect Did Not Contribute Equally to Biomass Retention in Wheat

Genotypes under High Temperature. *Plants*, *11*(16), 2174. https://doi.org/10.3390/plants11162174.

Brodribb, T. J., McAdam, S. A. M., Jordan, G. J., & Feild, T. S. (2009). Evolution of stomatal responsiveness to CO_2 and optimization of water-use efficiency among land plants. *New Phytologist*, *183*(3), 839–847. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02844.x.

Brooks, M., E., Kristensen, K., Benthem, K., J. ,van, Magnusson, A., Berg, C., W., Nielsen, A., Skaug, H., J., Mächler, M., & Bolker, B., M. (2017). glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal*, *9*(2), 378. https://doi.org/10.32614/RJ-2017-066.

Bulut, O., & Desjardins, C. D. (2020). *Profile Analysis of Multivariate Data: A Brief Introduction to the profileR Package*. PsyArXiv. https://doi.org/10.31234/osf.io/sgy8m.

Bussotti, F. (2008). Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: A critical overview. *Global Change Biology*, *14*(11), 2727–2739. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01677.x.

Bychkov, I. A., Andreeva, A. A., Kudryakova, N. V., Pojidaeva, E. S., & Kusnetsov, V. V. (2022). The role of PAP4/FSD3 and PAP9/FSD2 in heat stress responses of chloroplast genes. *Plant Science*, *322*, 111359. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111359.

Cadotte, M. W., Arnillas, C. A., Livingstone, S. W., & Yasui, S.-L. E. (2015). Predicting communities from functional traits. *Trends in Ecology & Evolution*, *30*(9), 510–511. https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.07.001.

Cahill, A. E., Aiello-Lammens, M. E., Fisher-Reid, M. C., Hua, X., Karanewsky, C. J., Yeong Ryu, H., Sbeglia, G. C., Spagnolo, F., Waldron, J. B., Warsi, O., & Wiens, J. J. (2013). How does climate change cause extinction? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*(1750), 20121890. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1890.

Calinger, K. M., Queenborough, S., & Curtis, P. S. (2013). Herbarium specimens reveal the footprint of climate change on flowering trends across north-central North America. *Ecology Letters*, *16*(8), 1037–1044. https://doi.org/10.1111/ele.12135.

Calixto, C. P. G. (2025). Molecular aspects of heat stress sensing in land plants. *The Plant Journal*, *121*(6), e70069. https://doi.org/10.1111/tpj.70069.

Calvin, K., Dasgupta, D., Krinner, G., Mukherji, A., Thorne, P. W., Trisos, C., Romero, J., Aldunce, P., Barrett, K., Blanco, G., Cheung, W. W. L., Connors, S., Denton, F., Diongue-Niang, A., Dodman, D., Garschagen, M., Geden, O., Hayward, B., Jones, C., … Péan, C. (with Lee, H.). (2023). *IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.* (First). IPCC. https://doi.org/10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.

Camejo, D., Martí, M. D. C., Nicolás, E., Alarcón, J. J., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2007). Response of superoxide dismutase isoenzymes in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) during thermo-acclimation of the photosynthetic apparatus. *Physiologia Plantarum*, *131*(3), 367–377. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00953.x.

Cao, Y., Xiao, Y., Huang, H., Xu, J., Hu, W., & Wang, N. (2016). Simulated warming shifts the flowering phenology and sexual reproduction of Cardamine hirsuta under different Planting densities. *Scientific Reports*, *6*(1), 27835. https://doi.org/10.1038/srep27835.

Carvalho, C., Davis, R., Connallon, T., Gleadow, R. M., Moore, J. L., & Uesugi, A. (2022). Multivariate selection mediated by aridity predicts divergence of drought-resistant traits along natural aridity gradients of an invasive weed. *New Phytologist*, *234*(3), 1088–1100. https://doi.org/10.1111/nph.18018.

Casal, J. J., & Balasubramanian, S. (2019). Thermomorphogenesis. *Annual Review of Plant Biology*, *70*(1), 321–346. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095919.

Casson, S. A., & Hetherington, A. M. (2010). Environmental regulation of stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(1), 90–95. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.08.005.

Catullo, R. A., Llewelyn, J., Phillips, B. L., & Moritz, C. C. (2019). The Potential for Rapid Evolution under Anthropogenic Climate Change. *Current Biology*, *29*(19), R996–R1007. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.028.

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, *35*(4 suppl 1), 1011–1019. https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600016.

Chaitanya, K. V., Sundar, D., Masilamani, S., & Ramachandra Reddy, A. (2002). Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation*, *36*(2), 175–180. https://doi.org/10.1023/A:1015092628374.

Chen, J., Yan, Y., Chen, S., & Ahammed, G. J. (2025). Photorespiration and plant immunity: Interactions and implications under a changing climate. *Plant Physiology and Biochemistry*, *229*, 110569. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.110569.

Chen, X., Li, D., Guo, J., Wang, Q., Zhang, K., Wang, X., Shao, L., Luo, C., Xia, Y., & Zhang, J. (2024). Identification and Analysis of the Superoxide Dismutase (SOD) Gene Family and Potential Roles in High-Temperature Stress Response of Herbaceous Peony (Paeonia lactiflora Pall.). *Antioxidants*, *13*(9), 1128. https://doi.org/10.3390/antiox13091128.

Cheptou, P., & Donohue, K. (2011). Environment-dependent inbreeding depression: Its ecological and evolutionary significance. *New Phytologist*, *189*(2), 395–407. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03541.x.

Chevin, L., Collins, S., & Lefèvre, F. (2013). Phenotypic plasticity and evolutionary demographic responses to climate change: Taking theory out to the field. *Functional Ecology*, *27*(4), 967–979. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02043.x.

Chopra, P., Sapia, N., Karami, O., Kumar, P., Honys, D., Colombo, L., Mendes, M., Benhamed, M., Fotopoulos, V., Lieberman-Lazarovich, M., Mueller-Roeber, B., Kaiserli, E., Hafidh, S., & Fragkostefanakis, S. (2025). Priming thermotolerance: Unlocking heat resilience for climate-smart crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *380*(1927), 20240234. https://doi.org/10.1098/rstb.2024.0234.

Chown, S., Hoffmann, A., Kristensen, T., Angilletta, M., Stenseth, N., & Pertoldi, C. (2010). Adapting to climate change: A perspective from evolutionary physiology. *Climate Research*, *43*(1), 3–15. https://doi.org/10.3354/cr00879.

Clarke, A. (2014). The thermal limits to life on Earth. *International Journal of Astrobiology*, *13*(2), 141–154. https://doi.org/10.1017/S1473550413000438.

Collins, C. G., Elmendorf, S. C., Hollister, R. D., Henry, G. H. R., Clark, K., Bjorkman, A. D., Myers-Smith, I. H., Prevéy, J. S., Ashton, I. W., Assmann, J. J., Alatalo, J. M., Carbognani, M., Chisholm, C.,

Cooper, E. J., Forrester, C., Jónsdóttir, I. S., Klanderud, K., Kopp, C. W., Livensperger, C., … Suding, K. N. (2021). Experimental warming differentially affects vegetative and reproductive phenology of tundra plants. *Nature Communications*, *12*(1), 3442. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23841-2.

Colombo, S. J., & Timmer, V. R. (1992). Limits of tolerance to high temperatures causing direct and indirect damage to black spruce. *Tree Physiology*, *11*(1), 95–104. https://doi.org/10.1093/treephys/11.1.95.

Coneva, V., & Chitwood, D. H. (2018). Genetic and Developmental Basis for Increased Leaf Thickness in the Arabidopsis Cvi Ecotype. *Frontiers in Plant Science*, *9*. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00322.

Cooper, H., Best, R., Andrews, L., Corbin, J., Garthwaite, I., Grady, K., Gehring, C., Hultine, K., Whitham, T., & Allan, G. (2022). *Evidence of climate-driven selection on both tree traits and trait plasticity across the climatic range of a riparian foundation species*. Preprints. https://doi.org/10.22541/au.165640635.54701806/v1.

Corpas, F. J., Fernández-Ocaña, A., Carreras, A., Valderrama, R., Luque, F., Esteban, F. J., Rodríguez-Serrano, M., Chaki, M., Pedrajas, J. R., Sandalio, L. M., Del Río, L. A., & Barroso, J. B. (2006). The Expression of Different Superoxide Dismutase Forms is Cell-type Dependent in Olive (Olea europaea L.) Leaves. *Plant and Cell Physiology*, *47*(7), 984–994. https://doi.org/10.1093/pcp/pcj071.

Cotto, J. J., Kline, M., & Morimoto, R. I. (1996). Activation of Heat Shock Factor 1 DNA Binding Precedes Stress-induced Serine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(7), 3355–3358. https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3355.

Črepinšek, Z., Štampar, F., Kajfež-Bogataj, L., & Solar, A. (2012). The response of Corylus avellana L. phenology to rising temperature in north-eastern Slovenia. *International Journal of Biometeorology*, *56*(4), 681–694. https://doi.org/10.1007/s00484-011-0469-7.

Croft, H., Chen, J. M., Luo, X., Bartlett, P., Chen, B., & Staebler, R. M. (2017). Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Global Change Biology*, *23*(9), 3513–3524. https://doi.org/10.1111/gcb.13599.

Ćuk, M. (2019). *Status i vremenska dinamika flore i vegetacije Deliblatske peščare* [Doktorska disertacija]. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.

Ćuk, M., Ponjarac, R., Igić, D., Ilić, M., Oldja, M., Vukov, D., & Čarni, A. (2023). Povijesni pregled pošumljavanja Deliblatske pješčare. *Šumarski List*, *147*(7–8), 383–392. https://doi.org/10.31298/sl.147.7-8.7.

Cutolo, E. A., Guardini, Z., Dall'Osto, L., & Bassi, R. (2023). A paler shade of green: Engineering cellular chlorophyll content to enhance photosynthesis in crowded environments. *New Phytologist*, *239*(5), 1567–1583. https://doi.org/10.1111/nph.19064.

Damián, X., Ochoa-López, S., Gaxiola, A., Fornoni, J., Domínguez, C. A., & Boege, K. (2020). Natural selection acting on integrated phenotypes: Covariance among functional leaf traits increases plant fitness. *New Phytologist*, *225*(1), 546–557. https://doi.org/10.1111/nph.16116.

Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, *2*. https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053.

Dash, S., & Mohanty, N. (2002). Response of seedlings to heat-stress in cultivars of wheat: Growth temperature-dependent differential modulation of photosystem 1 and 2 activity, and foliar antioxidant defense capacity. *Journal of Plant Physiology*, *159*(1), 49–59. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00594.

Davies, M., Ecroyd, H., Robinson, S. A., & French, K. (2018). Stress in native grasses under ecologically relevant heat waves. *PLOS ONE*, *13*(10), e0204906. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204906.

Davis, C. C., Willis, C. G., Connolly, B., Kelly, C., & Ellison, A. M. (2015). Herbarium records are reliable sources of phenological change driven by climate and provide novel insights into species' phenological cueing mechanisms. *American Journal of Botany*, *102*(10), 1599–1609. https://doi.org/10.3732/ajb.1500237.

Dawson, S. K., Carmona, C. P., González-Suárez, M., Jönsson, M., Chichorro, F., Mallen-Cooper, M., Melero, Y., Moor, H., Simaika, J. P., & Duthie, A. B. (2021). The traits of "trait ecologists": An analysis of the use of trait and functional trait terminology. *Ecology and Evolution*, *11*(23), 16434–16445. https://doi.org/10.1002/ece3.8321.

De Boeck, H. J., Dreesen, F. E., Janssens, I. A., & Nijs, I. (2010). Climatic characteristics of heat waves and their simulation in plant experiments. *Global Change Biology*, *16*(7), 1992–2000. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02049.x.

De Boeck, H., & Nijs, I. (2017). Climate Warming Experiments: Selecting the Appropriate Technique. In A. Chabbi & H. W. Loescher (Eds.), *Terrestrial Ecosystem Research Infrastructures* (1st ed., pp. 165–192). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781315368252-10.

De Jong, G. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: Patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytologist*, *166*(1), 101–118. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01322.x.

De Jong, W. W., Caspers, G.-J., & Leunissen, J. A. M. (1998). Genealogy of the α-crystallin—Small heat-shock protein superfamily. *International Journal of Biological Macromolecules*, *22*(3–4), 151–162. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00013-0.

De Kroon, H., Huber, H., Stuefer, J. F., & Van Groenendael, J. M. (2005). A modular concept of phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist*, *166*(1), 73–82. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01310.x.

De Maio, A., Santoro, M. G., Tanguay, R. M., & Hightower, L. E. (2012). Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: A new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress and Chaperones*, *17*(2), 139–143. https://doi.org/10.1007/s12192-012-0320-z.

De Villemereuil, P., Mouterde, M., Gaggiotti, O. E., & Till-Bottraud, I. (2018). Patterns of phenotypic plasticity and local adaptation in the wide elevation range of the alpine plant *Arabis alpina*. *Journal of Ecology*, *106*(5), 1952–1971. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12955.

Del Río, L. A., Corpas, F. J., López-Huertas, E., & Palma, J. M. (2018). Plant Superoxide Dismutases: Function Under Abiotic Stress Conditions. In D. K. Gupta, J. M. Palma, & F. J. Corpas (Eds.), *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants* (pp. 1–26). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_1.

Devireddy, A. R., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Muchero, W., & Chen, J.-G. (2021). Role of Reactive Oxygen Species and Hormones in Plant Responses to Temperature Changes.

International Journal of Molecular Sciences, *22*(16), 8843. https://doi.org/10.3390/ijms22168843.

DeWitt, T. J., Sih, A., & Wilson, D. S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, *13*(2), 77–81. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01274-3.

Diaz, S., Hodgson, J. G., Thompson, K., Cabido, M., Cornelissen, J. H. C., Jalili, A., Montserrat-Martí, G., Grime, J. P., Zarrinkamar, F., Asri, Y., Band, S. R., Basconcelo, S., Castro-Díez, P., Funes, G., Hamzehee, B., Khoshnevi, M., Pérez-Harguindeguy, N., Pérez-Rontomé, M. C., Shirvany, F. A., … Zak, M. R. (2004). The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science*, *15*(3), 295–304. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2004.tb02266.x.

Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J. H. C., Wright, I. J., Lavorel, S., Dray, S., Reu, B., Kleyer, M., Wirth, C., Colin Prentice, I., Garnier, E., Bönisch, G., Westoby, M., Poorter, H., Reich, P. B., Moles, A. T., Dickie, J., Gillison, A. N., Zanne, A. E., … Gorné, L. D. (2016). The global spectrum of plant form and function. *Nature*, *529*(7585), 167–171. https://doi.org/10.1038/nature16489.

Dickinson, P. J., Kumar, M., Martinho, C., Yoo, S. J., Lan, H., Artavanis, G., Charoensawan, V., Schöttler, M. A., Bock, R., Jaeger, K. E., & Wigge, P. A. (2018). Chloroplast Signaling Gates Thermotolerance in Arabidopsis. *Cell Reports*, *22*(7), 1657–1665. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.054.

Dietz, K.-J. (2021). Synergism and antagonism in plant acclimation to abiotic stress combinations. *Turkish journal of botany*, *45*(SI-1), 587–600. https://doi.org/10.3906/bot-2108-45.

Ding, Y., Shi, Y., & Yang, S. (2020). Molecular Regulation of Plant Responses to Environmental Temperatures. *Molecular Plant*, *13*(4), 544–564. https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.004.

Djanaguiraman, M., Boyle, D. L., Welti, R., Jagadish, S. V. K., & Prasad, P. V. V. (2018). Decreased photosynthetic rate under high temperature in wheat is due to lipid desaturation, oxidation, acylation, and damage of organelles. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 55. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1263-z.

Dorji, T., Hopping, K. A., Meng, F., Wang, S., Jiang, L., & Klein, J. A. (2020). Impacts of climate change on flowering phenology and production in alpine plants: The importance of end of flowering. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *291*, 106795. https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106795.

Du, B., Haensch, R., Alfarraj, S., & Rennenberg, H. (2024). Strategies of plants to overcome abiotic and biotic stresses. *Biological Reviews*, *99*(4), 1524–1536. https://doi.org/10.1111/brv.13079.

Ducić, V., & Milovanović, B. (2004). Termičke specifičnosti Deliblatske (Banatske) peščare. *Zbornik Radova Geografskog Fakulteta*, *52*, 1–12.

Ducić, V., & Radovanović, M. (2005). *Klima Srbije* (1. izd). Zavod za udžbenike i nastvna sredstva.

Dunne, J. A., Harte, J., & Taylor, K. J. (2003). Subalpine meadow flowering phenology responses to climate change: integrating experimental and gradient methods. *Ecological Monographs*, *73*(1), 69–86. https://doi.org/10.1890/0012-9615(2003)073%5B0069:SMFPRT%5D2.0.CO;2.

Duru, M., Al Haj Khaled, R., Ducourtieux, C., Theau, J. P., De Quadros, F. L. F., & Cruz, P. (2008). Do plant functional types based on leaf dry matter content allow characterizing native grass species and grasslands for herbage growth pattern? In A. G. Van Der Valk (Ed.), *Herbaceous*

Plant Ecology (pp. 57–69). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2798-6_5.

Dvořák, P., Krasylenko, Y., Zeiner, A., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021). Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 618835. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618835.

Dwyer, J. M., Hobbs, R. J., & Mayfield, M. M. (2014). Specific leaf area responses to environmental gradients through space and time. *Ecology*, *95*(2), 399–410. https://doi.org/10.1890/13-0412.1.

Efron, B., & Tibshirani, R. J. (1993). *An Introduction to the Bootstrap*. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-4541-9.

Ehrenreich, I. M., & Pfennig, D. W. (2016). Genetic assimilation: A review of its potential proximate causes and evolutionary consequences. *Annals of Botany*, *117*(5), 769–779. https://doi.org/10.1093/aob/mcv130.

Ellis, R. J. (1998). Steric chaperones. *Trends in Biochemical Sciences*, *23*(2), 43–45. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01175-X.

Elmendorf, S. C., & Hollister, R. D. (2023). Limits on phenological response to high temperature in the Arctic. *Scientific Reports*, *13*(1), 208. https://doi.org/10.1038/s41598-022-26955-9.

Enríquez, S., & Sand-Jensen, K. (2003). Variation in Light Absorption Properties of *Mentha aquatica* L. as a Function of Leaf Form: Implications for Plant Growth. *International Journal of Plant Sciences*, *164*(1), 125–136. https://doi.org/10.1086/344759.

Ergin, S., Gülen, H., KesiCi, M., Turhan, E., İPek, A., & Köksal, N. (2016). Effects of high temperature stress on enzymatic and nonenzymaticantioxidants and proteins in strawberry plants. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *40*, 908–917. https://doi.org/10.3906/tar-1606-144.

Exposito-Alonso, M., Bossdorf, O., Nielsen, R., & Weigel, D. (2019). Natural selection on the Arabidopsis thaliana genome in present and future climates. *Nature*, *573*(7772), 126–129. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1520-9.

Falconer, D. S. (1990). Selection in different environments: Effects on environmental sensitivity (reaction norm) and on mean performance. *Genetical Research*, *56*(1), 57–70. https://doi.org/10.1017/S0016672300028883.

Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, *61*(1), 243–282. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243.

Fernández-Crespo, E., Liu-Xu, L., Albert-Sidro, C., Scalschi, L., Llorens, E., González-Hernández, A. I., Crespo, O., Gonzalez-Bosch, C., Camañes, G., García-Agustín, P., & Vicedo, B. (2022). Exploiting Tomato Genotypes to Understand Heat Stress Tolerance. *Plants*, *11*(22), 3170. https://doi.org/10.3390/plants11223170.

Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Carreras, A., Valderrama, R., Begara-Morales, J. C., Hernández, L. E., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2011). Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *Journal of Plant Physiology*, *168*(11), 1303–1308. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.020.

Ferris, R., Sabatti, M., Miglietta, F., Mills, R. F., & Taylor, G. (2001). Leaf area is stimulated in *Populus* by free air CO_2 enrichment (POPFACE), through increased cell expansion and production. *Plant, Cell & Environment*, *24*(3), 305–315. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00684.x.

Finka, A., Mattoo, R. U. H., & Goloubinoff, P. (2011). Meta-analysis of heat- and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. *Cell Stress and Chaperones*, *16*(1), 15–31. https://doi.org/10.1007/s12192-010-0216-8.

Fitter, A. H., & Hay, R. K. M. (2002). *Environmental physiology of plants* (3rd ed). Academic Press.

Forreiter, C., & Nover, L. (1998). Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperones. *Journal of Biosciences*, *23*(4), 287–302. https://doi.org/10.1007/BF02936122.

Forsman, A. (2014). Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity*, *115*(4), 276–284. https://doi.org/10.1038/hdy.2014.92.

Fortunato, S., Lasorella, C., Dipierro, N., Vita, F., & De Pinto, M. C. (2023). Redox Signaling in Plant Heat Stress Response. *Antioxidants*, *12*(3), 605. https://doi.org/10.3390/antiox12030605.

Fortunel, C., Garnier, E., Joffre, R., Kazakou, E., Quested, H., Grigulis, K., Lavorel, S., Ansquer, P., Castro, H., Cruz, P., DoleŽal, J., Eriksson, O., Freitas, H., Golodets, C., Jouany, C., Kigel, J., Kleyer, M., Lehsten, V., Lepš, J., … Zarovali, M. (2009). Leaf traits capture the effects of land use changes and climate on litter decomposability of grasslands across Europe. *Ecology*, *90*(3), 598–611. https://doi.org/10.1890/08-0418.1.

Fourie, A. M., Sambrook, J. F., & Gething, M. J. (1994). Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(48), 30470–30478. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43837-9.

Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiology*, *155*(1), 93–100. https://doi.org/10.1104/pp.110.166181.

Franks, P. J., & Beerling, D. J. (2009). Maximum leaf conductance driven by CO_2 effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(25), 10343–10347. https://doi.org/10.1073/pnas.0904209106.

Franks, P. J., Berry, J. A., Lombardozzi, D. L., & Bonan, G. B. (2017). Stomatal Function across Temporal and Spatial Scales: Deep-Time Trends, Land-Atmosphere Coupling and Global Models. *Plant Physiology*, *174*(2), 583–602. https://doi.org/10.1104/pp.17.00287.

Franks, S. J., Weber, J. J., & Aitken, S. N. (2014). Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. *Evolutionary Applications*, *7*(1), 123–139. https://doi.org/10.1111/eva.12112.

Freschet, G. T., Cornelissen, J. H. C., Van Logtestijn, R. S. P., & Aerts, R. (2010). Evidence of the 'plant economics spectrum' in a subarctic flora. *Journal of Ecology*, *98*(2), 362–373. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01615.x.

Gallusci, P., Dai, Z., Génard, M., Gauffretau, A., Leblanc-Fournier, N., Richard-Molard, C., Vile, D., & Brunel-Muguet, S. (2017). Epigenetics for Plant Improvement: Current Knowledge and Modeling Avenues. *Trends in Plant Science*, *22*(7), 610–623. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.009.

Garg, N., & Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, *143*(1), 81–96. https://doi.org/10.1080/11263500802633626.

Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Debussche, M., Laurent, G., Blanchard, A., Aubry, D., Bellmann, A., Neill, C., & Toussaint, J.-P. (2004). Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology*, *85*(9), 2630–2637. https://doi.org/10.1890/03-0799.

Garnier, E., & Laurent, G. (1994). Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytologist*, *128*(4), 725–736. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04036.x.

Garnier, E., & Navas, M.-L. (2012). A trait-based approach to comparative functional plant ecology: Concepts, methods and applications for agroecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *32*(2), 365–399. https://doi.org/10.1007/s13593-011-0036-y.

Garnier, E., Salager, J. -L., Laurent, G., & Sonié, L. (1999). Relationships between photosynthesis, nitrogen and leaf structure in 14 grass species and their dependence on the basis of expression. *New Phytologist*, *143*(1), 119–129. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00426.x.

Garnier, E., Shipley, B., Roumet, C., & Laurent, G. (2001). A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Functional Ecology*, *15*(5), 688–695. https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00563.x.

Geange, S. R., Arnold, P. A., Catling, A. A., Coast, O., Cook, A. M., Gowland, K. M., Leigh, A., Notarnicola, R. F., Posch, B. C., Venn, S. E., Zhu, L., & Nicotra, A. B. (2021). The thermal tolerance of photosynthetic tissues: A global systematic review and agenda for future research. *New Phytologist*, *229*(5), 2497–2513. https://doi.org/10.1111/nph.17052.

Geissler, C., Davidson, A., & Niesenbaum, R. A. (2023). The influence of climate warming on flowering phenology in relation to historical annual and seasonal temperatures and plant functional traits. *PeerJ*, *11*, e15188. https://doi.org/10.7717/peerj.15188.

Georgieva, M., & Vassileva, V. (2023). Stress Management in Plants: Examining Provisional and Unique Dose-Dependent Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5105. https://doi.org/10.3390/ijms24065105.

Ghalambor, C. K., McKAY, J. K., Carroll, S. P., & Reznick, D. N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, *21*(3), 394–407. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x.

Gianoli, E., & Palacio-López, K. (2009). Phenotypic integration may constrain phenotypic plasticity in plants. *Oikos*, *118*(12), 1924–1928. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17884.x.

Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishra, P., Sabat, S. C., & Tuteja, N. (2015). Superoxide dismutase—Mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(14), 10375–10394. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4532-5.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909–930. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

Glaubitz, U., Li, X., Schaedel, S., Erban, A., Sulpice, R., Kopka, J., Hincha, D. K., & Zuther, E. (2017). Integrated analysis of rice transcriptomic and metabolomic responses to elevated night temperatures identifies sensitivity- and tolerance-related profiles. *Plant, Cell & Environment*, *40*(1), 121–137. https://doi.org/10.1111/pce.12850.

Godoy, O., Valladares, F., & Castro-Díez, P. (2012). The relative importance for plant invasiveness of trait means, and their plasticity and integration in a multivariate framework. *New Phytologist*, *195*(4), 912–922. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04205.x.

Goldstein, I., & Ehrenreich, I. M. (2021). Genetic variation in phenotypic plasticity. In *Phenotypic Plasticity and Evolution* (Vol. 91).

Gómez, J. M., Perfectti, F., González-Megías, A., & Armas, C. (2025). Quantifying phenotypic plasticity: A call for consistency. *Functional Ecology*, *39*(11), 2974–2984. https://doi.org/10.1111/1365-2435.70004.

Gong, H., & Gao, J. (2019). Soil and climatic drivers of plant SLA (specific leaf area). *Global Ecology and Conservation*, *20*, e00696. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00696.

Gratani, L., Varone, L., Crescente, M. F., Catoni, R., Ricotta, C., & Puglielli, G. (2018). Leaf thickness and density drive the responsiveness of photosynthesis to air temperature in Mediterranean species according to their leaf habitus. *Journal of Arid Environments*, *150*, 9–14. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2017.12.007.

Grigorova, B., Vaseva, I., Demirevska, K., & Feller, U. (2011a). Combined drought and heat stress in wheat: Changes in some heat shock proteins. *Biologia Plantarum*, *55*(1), 105–111. https://doi.org/10.1007/s10535-011-0014-x.

Grigorova, B., Vaseva, I. I., Demirevska, K., & Feller, U. (2011b). Expression of selected heat shock proteins after individually applied and combined drought and heat stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, *33*(5), 2041–2049. https://doi.org/10.1007/s11738-011-0733-9.

Grossman, J. J. (2023). Phenological physiology: Seasonal patterns of plant stress tolerance in a changing climate. *New Phytologist*, *237*(5), 1508–1524. https://doi.org/10.1111/nph.18617.

Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y., & Zhu, J. (2013). Heat stress induction of *mi R 398* triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in A rabidopsis. *The Plant Journal*, *74*(5), 840–851. https://doi.org/10.1111/tpj.12169.

Guerra, D., Crosatti, C., Khoshro, H. H., Mastrangelo, A. M., Mica, E., & Mazzucotelli, E. (2015). Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: A spiderâ€™s web of mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, *6*. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00057.

Guo, M., Zhai, Y.-F., Lu, J.-P., Chai, L., Chai, W.-G., Gong, Z.-H., & Lu, M.-H. (2014). Characterization of CaHsp70-1, a Pepper Heat-Shock Protein Gene in Response to Heat Stress and Some Regulation Exogenous Substances in Capsicum annuum L. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(11), 19741–19759. https://doi.org/10.3390/ijms151119741.

Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sciences*, *86*(11–12), 377–384. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.12.015.

Gurley, W. B. (2000). HSP101: A Key Component for the Acquisition of Thermotolerance in Plants. *The Plant Cell*, *12*(4), 457–460. https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.457.

Hamann, E., Kesselring, H., Armbruster, G. F. J., Scheepens, J. F., & Stöcklin, J. (2016). Evidence of local adaptation to fine- and coarse-grained environmental variability in *Poa alpina* in the Swiss Alps. *Journal of Ecology*, *104*(6), 1627–1637. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12628.

Hamann, E., Scheepens, J. F., Kesselring, H., Armbruster, G. F. J., & Stöcklin, J. (2017). High intraspecific phenotypic variation, but little evidence for local adaptation in Geum reptans populations in the Central Swiss Alps. *Alpine Botany*, *127*(2), 121–132. https://doi.org/10.1007/s00035-017-0185-y.

Hans Selye. (1973). The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *American Scientist*, *61*(6), 692–699.

Hart, R., Salick, J., Ranjitkar, S., & Xu, J. (2014). Herbarium specimens show contrasting phenological responses to Himalayan climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(29), 10615–10619. https://doi.org/10.1073/pnas.1403376111.

Harville, D. A. (1977). Maximum Likelihood Approaches to Variance Component Estimation and to Related Problems. *Journal of the American Statistical Association*, *72*(358), 320–338. https://doi.org/10.1080/01621459.1977.10480998.

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S., Mahmud, J., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, *9*(8), 681. https://doi.org/10.3390/antiox9080681.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, Md., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2013). Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(5), 9643–9684. https://doi.org/10.3390/ijms14059643.

He, R., Shi, H., Hu, M., Zhou, Q., Dang, H., & Zhang, Q. (2024). Differential phenotypic plasticity of subalpine trees predicts trait integration under climate warming. *New Phytologist*, *244*(3), 1074–1085. https://doi.org/10.1111/nph.20067.

Hendrick, J. P., & Hartl, F.-U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry*, *62*(1), 349–384. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.002025.

Henn, J. J., Buzzard, V., Enquist, B. J., Halbritter, A. H., Klanderud, K., Maitner, B. S., Michaletz, S. T., Pötsch, C., Seltzer, L., Telford, R. J., Yang, Y., Zhang, L., & Vandvik, V. (2018). Intraspecific Trait Variation and Phenotypic Plasticity Mediate Alpine Plant Species Response to Climate Change. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1548. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01548.

Herben, T., Šerá, B., & Klimešová, J. (2015). Clonal growth and sexual reproduction: Tradeoffs and environmental constraints. *Oikos*, *124*(4), 469–476. https://doi.org/10.1111/oik.01692.

Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Bäurle, I., Geiselhardt, S., Hincha, D. K., Kunze, R., Mueller-Roeber, B., Rillig, M. C., Rolff, J., Romeis, T., Schmülling, T., Steppuhn, A., Van Dongen, J., Whitcomb, S. J., Wurst, S., Zuther, E., & Kopka, J. (2016). Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews*, *91*(4), 1118–1133. https://doi.org/10.1111/brv.12215.

Hilu, K. W., & Randall, J. L. (1984). Convenient Method for Studying Grass Leaf Epidermis. *Taxon*, *33*(3), 413. https://doi.org/10.2307/1220980.

Hočevar, K., Vuleta, A., & Manitašević Jovanović, S. (2022). Phenotypic plasticity of *Iris pumila* leaf functional traits in response to experimental warming. *18th Congress of the European Society for Evolutionary Biology (ESEB22)*, August 14–19, 2022, Prague, Czech Republic. *Book of Abstracts*, 576.

Hočevar, K., Vuleta, A., & Manitašević Jovanović, S. (2023). Plastic response of *Iris pumila* small heat shock protein Hsp17.6 to experimental warming *in situ*. *2nd Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS2)*, October 6–8, 2023, Belgrade, Serbia.

Hočevar, K., Vuleta, A., & Manitašević Jovanović, S. (2025). Plastic Responses of Iris pumila Functional and Mechanistic Leaf Traits to Experimental Warming. *Plants*, *14*(6), 960. https://doi.org/10.3390/plants14060960.

Hoffmann, A. A., & Parsons, P. A. (1991). *Evolutionary genetics and environmental stress* (first). Oxford Univ. Press.

Hoffmann, A. A., & Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, *470*(7335), 479–485. https://doi.org/10.1038/nature09670.

Hollister, R. D., Elphinstone, C., Henry, G. H. R., Bjorkman, A. D., Klanderud, K., Björk, R. G., Björkman, M. P., Bokhorst, S., Carbognani, M., Cooper, E. J., Dorrepaal, E., Elmendorf, S. C., Fetcher, N., Gallois, E. C., Guðmundsson, J., Healey, N. C., Jónsdóttir, I. S., Klarenberg, I. J., Oberbauer, S. F., … Wookey, P. A. (2023). A review of open top chamber (OTC) performance across the ITEX Network. *Arctic Science*, *9*(2), 331–344. https://doi.org/10.1139/as-2022-0030.

Hollister, R. D., & Webber, P. J. (2000). Biotic validation of small open-top chambers in a tundra ecosystem. *Global Change Biology*, *6*(7), 835–842. https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2000.00363.x.

Hong, S., & Vierling, E. (2001). Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *The Plant Journal*, *27*(1), 25–35. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01066.x.

Hothorn, T., Zeileis, A., Farebrother, R. W., & Cummins, C. (2022). lmtest: Testing Linear Regression Models (Version 0.9-40) [R package]. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.lmtest.

Hovenden, M. J., Wills, K. E., Vander Schoor, J. K., Williams, A. L., & Newton, P. C. D. (2008). Flowering phenology in a species-rich temperate grassland is sensitive to warming but not elevated CO_2. *New Phytologist*, *178*(4), 815–822. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02419.x.

Hu, X., Gu, T., Khan, I., Zada, A., & Jia, T. (2021). Research Progress in the Interconversion, Turnover and Degradation of Chlorophyll. *Cells*, *10*(11), 3134. https://doi.org/10.3390/cells10113134.

Huang, H., Ran, J., Ji, M., Wang, Z., Dong, L., Hu, W., Deng, Y., Hou, C., Niklas, K. J., & Deng, J. (2020). Water content quantitatively affects metabolic rates over the course of plant ontogeny. *New Phytologist*, *228*(5), 1524–1534. https://doi.org/10.1111/nph.16808.

Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 800. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800.

Huang, W., Gielis, J., & Shi, P. (2024). Editorial: The adaptation, plasticity and extinction of forest plants to climate change: mechanisms behind the morphological, physiological, phenological and ecological traits. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *12*, 1488465. https://doi.org/10.3389/fevo.2024.1488465.

Impa, S. M., Raju, B., Hein, N. T., Sandhu, J., Prasad, P. V. V., Walia, H., & Jagadish, S. V. K. (2021). High night temperature effects on wheat and rice: Current status and way forward. *Plant, Cell & Environment*, *44*(7), 2049–2065. https://doi.org/10.1111/pce.14028.

IPCC. (2021). *Climate Change 2021 – The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (1st ed.). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/9781009157896.

Ivanova, L. A., Chanchikova, A. G., Ronzhina, D. A., Zolotareva, N. V., Kosulnikov, V. V., Kadushnikov, R. M., & Ivanov, L. A. (2016). Leaf acclimation to experimental climate warming in meadow plants of different functional types. *Russian Journal of Plant Physiology*, *63*(6), 849–860. https://doi.org/10.1134/S102144371605006X.

Iwamoto, M., Higo, H., & Higo, K. (2000). Differential diurnal expression of rice catalase genes: The 5′-flanking region of CatA is not sufficient for circadian control. *Plant Science*, *151*(1), 39–46. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00194-6.

Jacobs, B. S., & Latimer, A. M. (2012). Analyzing reaction norm variation in the field vs. greenhouse: Comparing studies of plasticity and its adaptive value in two species of Erodium. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *14*(5), 325–334. https://doi.org/10.1016/j.ppees.2012.04.002.

Jacques, M., Lapointe, L., Rice, K., Montgomery, R. A., Stefanski, A., & Reich, P. B. (2015). Responses of two understory herbs, *Maianthemum canadense* and *Eurybia macrophylla* , to experimental forest warming: Early emergence is the key to enhanced reproductive output. *American Journal of Botany*, *102*(10), 1610–1624. https://doi.org/10.3732/ajb.1500046.

Jagadish, S. V. K., Way, D. A., & Sharkey, T. D. (2021). Plant heat stress: Concepts directing future research. *Plant, Cell & Environment*, *44*(7), 1992–2005. https://doi.org/10.1111/pce.14050.

Jentsch, A., Kreyling, J., & Beierkuhnlein, C. (2007). A new generation of climate-change experiments: Events, not trends. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *5*(7), 365–374. https://doi.org/10.1890/1540-9295(2007)5%5B365:ANGOCE%5D2.0.CO;2.

Jiang, R., Liu, W., & Pennings, S. C. (2025). Global warming disrupts the relative allocation between sexual and clonal reproduction in a common salt marsh plant. *Ecology*, *106*(5), e70101. https://doi.org/10.1002/ecy.70101.

Jiang, Y., & Huang, B. (2001). Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. *Crop Science*, *41*(2), 436–442. https://doi.org/10.2135/cropsci2001.412436x.

Jinks, J. L., & Connolly, V. (1973). Selection for specific and general response to environmental differences. *Heredity*, *30*(1), 33–40. https://doi.org/10.1038/hdy.1973.4.

Jinks, J. L., & Connolly, V. (1975). Determination of the environmental sensitivity of selection lines by the selection environment. *Heredity*, *34*(3), 401–406. https://doi.org/10.1038/hdy.1975.49.

Jump, A. S., & Peñuelas, J. (2005). Running to stand still: Adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters*, *8*(9), 1010–1020. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00796.x.

Jung, J.-H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A. K., Box, M. S., Charoensawan, V., Cortijo, S., Kumar, M., Grant, A., Locke, J. C. W., Schäfer, E., Jaeger, K. E., & Wigge, P. A. (2016). Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science*, *354*(6314), 886–889. https://doi.org/10.1126/science.aaf6005.

Kadović, R., Bohajar, Y. A. M., Perović, V., Simić, S. B., Todosijević, M., Tošić, S., Anđelić, M., Mlađan, D., & Dovezenski, U. (2016). Land Sensitivity Analysis of Degradation using MEDALUS model: Case Study of Deliblato Sands, Serbia. *Archives of Environmental Protection*, *42*(4), 114–124. https://doi.org/10.1515/aep-2016-0045.

Kadović, R., Spasov, P., Bohajar, Y., Belanović-Simić, S., & Kosanin, O. (2014). Analysis of aridity indicators in the Deliblato Sands. *Glasnik Sumarskog Fakulteta*, (109), 97–112. https://doi.org/10.2298/GSF1409097K.

Kaiser, E., Morales, A., Harbinson, J., Kromdijk, J., Heuvelink, E., & Marcelis, L. F. M. (2015). Dynamic photosynthesis in different environmental conditions. *Journal of Experimental Botany*, *66*(9), 2415–2426. https://doi.org/10.1093/jxb/eru406.

Kan, Y., Mu, X.-R., Gao, J., Lin, H.-X., & Lin, Y. (2023). The molecular basis of heat stress responses in plants. *Molecular Plant*, *16*(10), 1612–1634. https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.09.013.

Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., & Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science, 5*(6), 709–725. https://doi.org/10.3316/informit.282079847301776.

Kassambara, A. (2023). rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests (Version 0.7.2) [R package]. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.rstatix.

Kassout, J., Terral, J.-F., Hodgson, J. G., & Ater, M. (2019). Trait-based plant ecology a flawed tool in climate studies? The leaf traits of wild olive that pattern with climate are not those routinely measured. *PLOS ONE*, *14*(7), e0219908. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219908.

Kaur, S., Prakash, P., Bak, D.-H., Hong, S. H., Cho, C., Chung, M.-S., Kim, J.-H., Lee, S., Bai, H.-W., Lee, S. Y., Chung, B. Y., & Lee, S. S. (2021). Regulation of Dual Activity of Ascorbate Peroxidase 1 From Arabidopsis thaliana by Conformational Changes and Posttranslational Modifications. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 678111. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.678111.

Kausar, R., Hossain, Z., Makino, T., & Komatsu, S. (2012). Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. *Molecular Biology Reports*, *39*(12), 10573–10579. https://doi.org/10.1007/s11033-012-1945-9.

Kaushal, N., Gupta, K., Bhandhari, K., Kumar, S., Thakur, P., & Nayyar, H. (2011). Proline induces heat tolerance in chickpea (Cicer arietinum L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *17*(3), 203–213. https://doi.org/10.1007/s12298-011-0078-2.

Keller, L. F., Grant, P. R., Grant, B. R., & Petren, K. (2002). Environmental conditions affect the magnitude of inbreeding depression in survival of Darwin's finches. *Evolution*, *56*(6), 1229–1239. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01434.x.

Kelly, M. (2019). Adaptation to climate change through genetic accommodation and assimilation of plastic phenotypes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *374*(1768), 20180176. https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0176.

Kerbler, S. M., & Wigge, P. A. (2023). Temperature Sensing in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *74*(1), 341–366. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-102235.

Khan, S., Guhey, A., & Kuruwanshi, V. B. (2017). Impact of High Temperature on Antioxidant Enzymes during Reproductive Phase in Rice Cultivars. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(11), 1099–1102. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.129.

Khorsand, R. S., Ginn, Z. R., & Sancier-Barbosa, F. (2025). Spatio-temporal patterns in floral resources and plant-pollinator network structure in the Alaskan Arctic. *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1552422. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1552422.

Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, *82*(1), 323–355. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442.

Kleine, T., Nägele, T., Neuhaus, H. E., Schmitz-Linneweber, C., Fernie, A. R., Geigenberger, P., Grimm, B., Kaufmann, K., Klipp, E., Meurer, J., Möhlmann, T., Mühlhaus, T., Naranjo, B., Nickelsen, J., Richter, A., Ruwe, H., Schroda, M., Schwenkert, S., Trentmann, O., … Leister, D. (2021). Acclimation in plants – the Green Hub consortium. *The Plant Journal*, *106*(1), 23–40. https://doi.org/10.1111/tpj.15144.

Klingenberg, C. P. (2008). Morphological Integration and Developmental Modularity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *39*(1), 115–132. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110054.

Klingenberg, C. P. (2014). Studying morphological integration and modularity at multiple levels: Concepts and analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1649), 20130249. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0249.

Knapp, S., Dinsmore, L., Fissore, C., Hobbie, S. E., Jakobsdottir, I., Kattge, J., King, J. Y., Klotz, S., McFadden, J. P., & Cavender-Bares, J. (2012). Phylogenetic and functional characteristics of household yard floras and their changes along an urbanization gradient. *Ecology*, *93*(sp8). https://doi.org/10.1890/11-0392.1.

Knight, C. A., & Ackerly, D. D. (2003). Evolution and plasticity of photosynthetic thermal tolerance, specific leaf area and leaf size: Congeneric species from desert and coastal environments. *New Phytologist*, *160*(2), 337–347. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00880.x.

Kolyva, F., Adamakis, I.-D. S., Gkikas, D., Meletiou-Christou, M.-S., & Rhizopoulou, S. (2025). Effects of Elevated Temperature and Water Deficiency on Functional Traits of Vitis vinifera L. cv. Assyrtiko Leaves. *Plants*, *14*(16), 2463. https://doi.org/10.3390/plants14162463.

Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., Von Koskull-Döring, P., Vierling, E., & Scharf, K.-D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(3), 310–316. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.011.

Kotilainen, A., Mattila, A. L. K., Møller, C., Koivusaari, S., Hyvärinen, M., & Hällfors, M. H. (2024). Higher thermal plasticity in flowering phenology increases flowering output. *Ecology and Evolution*, *14*(7), e11657. https://doi.org/10.1002/ece3.11657.

Kotliar, N. B., & Wiens, J. A. (1990). Multiple Scales of Patchiness and Patch Structure: A Hierarchical Framework for the Study of Heterogeneity. *Oikos*, *59*(2), 253. https://doi.org/10.2307/3545542.

Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortes, D., Shulaev, V., & Mittler, R. (2008). Ascorbate Peroxidase 1 Plays a Key Role in the Response of Arabidopsis thaliana to Stress Combination. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(49), 34197–34203. https://doi.org/10.1074/jbc.M806337200.

Kristensen, T. N., Ketola, T., & Kronholm, I. (2020). Adaptation to environmental stress at different timescales. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1476*(1), 5–22. https://doi.org/10.1111/nyas.13974.

Kühn, N., Tovar, C., Carretero, J., Vandvik, V., Enquist, B. J., & Willis, K. J. (2021). Globally important plant functional traits for coping with climate change. *Frontiers of Biogeography*, *13*(4). https://doi.org/10.21425/F5FBG53774.

Kumar, A., Sharma, S., Chunduri, V., Kaur, A., Kaur, S., Malhotra, N., Kumar, A., Kapoor, P., Kumari, A., Kaur, J., Sonah, H., & Garg, M. (2020). Genome-wide Identification and Characterization of Heat Shock Protein Family Reveals Role in Development and Stress Conditions in Triticum aestivum L. *Scientific Reports*, *10*(1), 7858. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64746-2.

Kumar, D., & Mukhopadhyay, R. (2025). Climate change and plant pathogens: Understanding dynamics, risks and mitigation strategies. *Plant Pathology*, *74*(1), 59–68. https://doi.org/10.1111/ppa.14033.

Kumazaki, A., & Suzuki, N. (2019). Enhanced tolerance to a combination of heat stress and drought in Arabidopsis plants deficient in ICS1 is associated with modulation of photosynthetic reaction center proteins. *Physiologia Plantarum*, *165*(2), 232–246. https://doi.org/10.1111/ppl.12809.

Lachowiec, J., Queitsch, C., & Kliebenstein, D. J. (2016). Molecular mechanisms governing differential robustness of development and environmental responses in plants. *Annals of Botany*, *117*(5), 795–809. https://doi.org/10.1093/aob/mcv151.

Lai, C.-H., & He, J. (2016). Physiological Performances of Temperate Vegetables with Response to Chronic and Acute Heat Stress. *American Journal of Plant Sciences*, *07*(14), 2055–2071. https://doi.org/10.4236/ajps.2016.714185.

Laitinen, R. A. E. (2024). Importance of phenotypic plasticity in crop resilience. *Journal of Experimental Botany*, *75*(3), 670–673. https://doi.org/10.1093/jxb/erad465.

Lambers, H., & Oliveira, R. S. (2019). *Plant Physiological Ecology*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29639-1.

Lande, R. (2009). Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *Journal of Evolutionary Biology*, *22*(7), 1435–1446. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01754.x.

Lande, R., & Arnold, S. J. (1983). The Measurement of Selection on Correlated Characters. *Evolution*, *37*(6), 1210. https://doi.org/10.2307/2408842.

Larcher, W. (2003). *Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups* (4th ed). Springer.

Larigauderie, A., Hilbert, D. W., & Oechel, W. C. (1988). Effect of CO2 enrichment and nitrogen availability on resource acquisition and resource allocation in a grass, Bromus mollis. *Oecologia*, *77*(4), 544–549. https://doi.org/10.1007/BF00377272.

Larkindale, J., & Vierling, E. (2008). Core Genome Responses Involved in Acclimation to High Temperature. *Plant Physiology*, *146*(2), 323–324. https://doi.org/10.1104/pp.107.112060.

Lasorella, C., Fortunato, S., Dipierro, N., Jeran, N., Tadini, L., Vita, F., Pesaresi, P., & De Pinto, M. C. (2022). Chloroplast-localized GUN1 contributes to the acquisition of basal thermotolerance in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1058831. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1058831.

Laughlin, D. C., & Messier, J. (2015). Fitness of multidimensional phenotypes in dynamic adaptive landscapes. *Trends in Ecology & Evolution*, *30*(8), 487–496. https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.06.003.

Lavoie, C., & Lachance, D. (2006). A new herbarium-based method for reconstructing the phenology of plant species across large areas. *American Journal of Botany*, *93*(4), 512–516. https://doi.org/10.3732/ajb.93.4.512.

Lawson, T., & Blatt, M. R. (2014). Stomatal Size, Speed, and Responsiveness Impact on Photosynthesis and Water Use Efficiency. *Plant Physiology*, *164*(4), 1556–1570. https://doi.org/10.1104/pp.114.237107.

Lee, J. H., & Schöffl, F. (1996). AnHsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic Arabidopsis thaliana. *Molecular and General Genetics MGG*, *252*(1–2), 11–19. https://doi.org/10.1007/BF02173200.

Lee, U., Rioflorido, I., Hong, S., Larkindale, J., Waters, E. R., & Vierling, E. (2006). The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: Chaperones for stress and chloroplast development. *The Plant Journal*, *49*(1), 115–127. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02940.x.

Leigh, A., Sevanto, S., Ball, M. C., Close, J. D., Ellsworth, D. S., Knight, C. A., Nicotra, A. B., & Vogel, S. (2012). Do thick leaves avoid thermal damage in critically low wind speeds? *New Phytologist*, *194*(2), 477–487. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04058.x.

Leigh, A., Sevanto, S., Close, J. D., & Nicotra, A. B. (2017). The influence of leaf size and shape on leaf thermal dynamics: Does theory hold up under natural conditions? *Plant, Cell & Environment*, *40*(2), 237–248. https://doi.org/10.1111/pce.12857.

Levitt, J. (1980). *Responses of plants to environmental stresses* (2nd ed). Academic press.

Li, F., Zhan, D., Xu, L., Han, L., & Zhang, X. (2014). Antioxidant and Hormone Responses to Heat Stress in Two Kentucky Bluegrass Cultivars Contrasting in Heat Tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *139*(5), 587–596. https://doi.org/10.21273/JASHS.139.5.587.

Li, J., & Prentice, I. C. (2024). Global patterns of plant functional traits and their relationships to climate. *Communications Biology*, *7*(1), 1136. https://doi.org/10.1038/s42003-024-06777-3.

Li, S. (2023). Novel insight into functions of ascorbate peroxidase in higher plants: More than a simple antioxidant enzyme. *Redox Biology*, *64*, 102789. https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102789.

Li, Y., He, N., Hou, J., Xu, L., Liu, C., Zhang, J., Wang, Q., Zhang, X., & Wu, X. (2018). Factors Influencing Leaf Chlorophyll Content in Natural Forests at the Biome Scale. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *6*, 64. https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00064.

Li, Y., Johnson, D. A., Su, Y., Cui, J., & Zhang, T. (2005). Specific leaf area and leaf dry matter content of plants growing in sand dunes. *Botanical Bulletin of Academia Sinica, 46*(2), 127–134. https://doi.org/10.7016/BBAS.200504.0127.

Liancourt, P., Boldgiv, B., Song, D. S., Spence, L. A., Helliker, B. R., Petraitis, P. S., & Casper, B. B. (2015). Leaf-trait plasticity and species vulnerability to climate change in a Mongolian steppe. *Global Change Biology*, *21*(9), 3489–3498. https://doi.org/10.1111/gcb.12934.

Lichtenthaler, H. K. (1988). In Vivo Chlorophyll Fluorescence as a Tool for Stress Detection in Plants. In H. K. Lichtenthaler (Ed.), *Applications of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis Research, Stress Physiology, Hydrobiology and Remote Sensing* (pp. 129–142). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2823-7_16.

Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation Stress: An Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of Plant Physiology*, *148*(1–2), 4–14. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80287-2.

Lichtenthaler, H. K. (1998). The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *851*(1 STRESS OF LIF), 187–198. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x.

Lin, X., & Zhang, D. (1999). Inference in Generalized Additive Mixed Models by Using Smoothing Splines. *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology*, *61*(2), 381–400. https://doi.org/10.1111/1467-9868.00183.

Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry, 55*(1), 1151–1191. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443.

Lippmann, R., Babben, S., Menger, A., Delker, C., & Quint, M. (2019). Development of Wild and Cultivated Plants under Global Warming Conditions. *Current Biology*, *29*(24), R1326–R1338. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.016.

Liu, H., Yin, D., He, P., Cadotte, M. W., & Ye, Q. (2024). Linking plant functional traits to biodiversity under environmental change. *Biological Diversity*, *1*(1), 22–28. https://doi.org/10.1002/bod2.12004.

Liu, P. R., & Raftery, A. E. (2021). Country-based rate of emissions reductions should increase by 80% beyond nationally determined contributions to meet the 2 °C target. *Communications Earth & Environment*, *2*(1), 29. https://doi.org/10.1038/s43247-021-00097-8.

Liu, Y., Mu, J., Niklas, K. J., Li, G., & Sun, S. (2012). Global warming reduces plant reproductive output for temperate multi-inflorescence species on the Tibetan plateau. *New Phytologist*, *195*(2), 427–436. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04178.x.

Liu, Z., Zhao, M., Tennakoon, K., & Liu, C. (2024). Climate factors determine large-scale spatial patterns of stomatal index in Chinese herbaceous and woody dicotyledonous plants. *Science of The Total Environment*, *949*, 175112. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175112.

Liu, Z., Zhao, M., Zhang, H., Ren, T., Liu, C., & He, N. (2023). Divergent response and adaptation of specific leaf area to environmental change at different spatio-temporal scales jointly improve plant survival. *Global Change Biology*, *29*(4), 1144–1159. https://doi.org/10.1111/gcb.16518.

Lorer, E., Verheyen, K., Blondeel, H., De Pauw, K., Sanczuk, P., De Frenne, P., & Landuyt, D. (2024). Forest understorey flowering phenology responses to experimental warming and illumination. *New Phytologist*, *241*(4), 1476–1491. https://doi.org/10.1111/nph.19425.

Ludwig, W., Hayes, S., Trenner, J., Delker, C., & Quint, M. (2021). On the evolution of plant thermomorphogenesis. *Journal of Experimental Botany*, erab310. https://doi.org/10.1093/jxb/erab310.

Luomala, E., Laitinen, K., Sutinen, S., Kellomäki, S., & Vapaavuori, E. (2005). Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO_2 and temperature. *Plant, Cell & Environment*, *28*(6), 733–749. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01319.x.

Lyon, C., Saupe, E. E., Smith, C. J., Hill, D. J., Beckerman, A. P., Stringer, L. C., Marchant, R., McKay, J., Burke, A., O'Higgins, P., Dunhill, A. M., Allen, B. J., Riel-Salvatore, J., & Aze, T. (2021). Climate change research and action must look beyond 2100. *Global Change Biology*, *28*(2), 349–361. https://doi.org/10.1111/gcb.15871.

Madani, N., Kimball, J. S., Ballantyne, A. P., Affleck, D. L. R., Van Bodegom, P. M., Reich, P. B., Kattge, J., Sala, A., Nazeri, M., Jones, M. O., Zhao, M., & Running, S. W. (2018). Future global productivity will be affected by plant trait response to climate. *Scientific Reports*, *8*(1), 2870. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21172-9.

Manitašević Jovanović, S., Hočevar, K., Vuleta, A., & Tucić, B. (2023). Predicting the responses of functional leaf traits to global warming: An *in situ* temperature manipulation design using *Iris pumila* L. *Plants*, *12*(17), 3114. https://doi.org/10.3390/plants12173114.

Manitašević Jovanović, S., Tucić, B., & Matić, G. (2011). Differential expression of heat-shock proteins Hsp70 and Hsp90 in vegetative and reproductive tissues of Iris pumila. *Acta Physiologiae Plantarum*, *33*(1), 233–240. https://doi.org/10.1007/s11738-010-0530-x.

Manitašević, S., Dunđerski, J., Matić, G., & Tucić, B. (2007). Seasonal variation in heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 expression in an exposed and a shaded habitat of *Iris pumila*. *Plant, Cell & Environment*, *30*(1), 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01596.x.

Manitašević Jovanović, S., Vuleta, A., & Tucić, B. (2014). Does physiological integration among intraclonal ramets of *Iris pumila* enhance stress tolerance in heterogeneous environments? *Archives of Biological Sciences*, *66*(2), 713–720. https://doi.org/10.2298/ABS1402713J.

Marion, G. M., Henry, G. H. R., Freckman, D. W., Johnstone, J., Jones, G., Jones, M. H., Lévesque, E., Molau, U., Mølgaard, P., Parsons, A. N., J. Svoboda, & Virginia, R. A. (1997). Open-top designs for manipulating field temperature in high-latitude ecosystems. *Global Change Biology*, *3*(S1), 20–32. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.1997.gcb136.x.

Matesanz, S., Blanco-Sánchez, M., Ramos-Muñoz, M., De La Cruz, M., Benavides, R., & Escudero, A. (2021). Phenotypic integration does not constrain phenotypic plasticity: Differential plasticity of traits is associated to their integration across environments. *New Phytologist*, *231*(6), 2359–2370. https://doi.org/10.1111/nph.17536.

Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*(6), 670. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6.

McClung, C. R., & Davis, S. J. (2010). Ambient Thermometers in Plants: From Physiological Outputs towards Mechanisms of Thermal Sensing. *Current Biology*, *20*(24), R1086–R1092. https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.035.

McEwan, R. W., Brecha, R. J., Geiger, D. R., & John, G. P. (2011). Flowering phenology change and climate warming in southwestern Ohio. *Plant Ecology*, *212*(1), 55–61. https://doi.org/10.1007/s11258-010-9801-2.

McLoughlin, F., Basha, E., Fowler, M. E., Kim, M., Bordowitz, J., Katiyar-Agarwal, S., & Vierling, E. (2016). Class I and II small heat-shock proteins protect protein translation factors during heat stress. *Plant Physiology*, pp.00536.2016. https://doi.org/10.1104/pp.16.00536.

Medina, E., Kim, S.-H., Yun, M., & Choi, W.-G. (2021). Recapitulation of the Function and Role of ROS Generated in Response to Heat Stress in Plants. *Plants*, *10*(2), 371. https://doi.org/10.3390/plants10020371.

Merilä, J., & Hendry, A. P. (2014). Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: The problem and the evidence. *Evolutionary Applications*, *7*(1), 1–14. https://doi.org/10.1111/eva.12137.

Meziane, D. (2001). Direct and Indirect Relationships Between Specific Leaf Area, Leaf Nitrogen and Leaf Gas Exchange. Effects of Irradiance and Nutrient Supply. *Annals of Botany*, *88*(5), 915–927. https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1536.

Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, *61*(15), 4197–4220. https://doi.org/10.1093/jxb/erq282.

Michaletz, S. T., Weiser, M. D., Zhou, J., Kaspari, M., Helliker, B. R., & Enquist, B. J. (2015). Plant Thermoregulation: Energetics, Trait–Environment Interactions, and Carbon Economics. *Trends in Ecology & Evolution*, *30*(12), 714–724. https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.09.006.

Milenković, M., Munćan, S., & Babić, V. (2018). Dva veka pošumljavanja Deliblatske peščare: Problem šumskih požara. *Šumarstvo*, (3–4), 1–24.

Miller-Rushing, A. J., Katsuki, T., Primack, R. B., Ishii, Y., Lee, S. D., & Higuchi, H. (2007). Impact of global warming on a group of related species and their hybrids: Cherry tree (Rosaceae) flowering at Mt. Takao, Japan. *American Journal of Botany*, *94*(9), 1470–1478. https://doi.org/10.3732/ajb.94.9.1470.

Min, K., Sulaiman, S., Lee, J., Bravo, L. A., Sáez, P. L., & Lee, H. (2025). Transcriptomic responses of Antarctic plants to *in situ* warming: Uncovering molecular mechanisms behind physiological adjustments. *Annals of Botany*, *136*(3), 529–542. https://doi.org/10.1093/aob/mcaf108.

Mishra, R. C., & Grover, A. (2016). ClpB/Hsp100 proteins and heat stress tolerance in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, *36*(5), 862–874. https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1051942.

Mishra, R. C., & Grover, A. (2019). Voyaging around ClpB/Hsp100 proteins and plant heat tolerance. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. https://doi.org/10.16943/ptinsa/2019/49592.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, *7*(9), 405–410. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, *11*(1), 15–19. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002.

Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, *22*(1), 11–19. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002.

Mittler, R., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences*, *37*(3), 118–125. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.007.

Mittler, R., Lam, E., Shulaev, V., & Cohen, M. (1999). Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Molecular Biology*, *39*(5), 1025–1035. https://doi.org/10.1023/A:1006110223774.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science*, *16*(6), 300–309. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007.

Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(10), 663–679. https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2.

Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., & Guy, M. (2003). Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell & Environment*, *26*(6), 845–856. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01016.x.

Mogk, A., Bukau, B., & Kampinga, H. H. (2018). Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Molecular Cell*, *69*(2), 214–226. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.004.

Mogk, A., Ruger-Herreros, C., & Bukau, B. (2019). Cellular Functions and Mechanisms of Action of Small Heat Shock Proteins. *Annual Review of Microbiology*, *73*(1), 89–110. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115515.

Molau, U., & Mølgaard, P. (Eds.). (1996). ITEX manual (2nd ed.). Danish Polar Center.

Moles, A. T. (2018). Being John Harper: Using evolutionary ideas to improve understanding of global patterns in plant traits. *Journal of Ecology*, *106*(1), 1–18. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12887.

Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *58*(1), 459–481. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946.

Monteiro, M. V., Blanuša, T., Verhoef, A., Hadley, P., & Cameron, R. W. F. (2016). Relative importance of transpiration rate and leaf morphological traits for the regulation of leaf temperature. *Australian Journal of Botany*, *64*(1), 32–44. https://doi.org/10.1071/BT15198.

Montgomery, R. A., Rice, K. E., Stefanski, A., Rich, R. L., & Reich, P. B. (2020). Phenological responses of temperate and boreal trees to warming depend on ambient spring temperatures, leaf habit, and geographic range. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(19), 10397–10405. https://doi.org/10.1073/pnas.1917508117.

Morgan, M. J., Lehmann, M., Schwarzländer, M., Baxter, C. J., Sienkiewicz-Porzucek, A., Williams, T. C. R., Schauer, N., Fernie, A. R., Fricker, M. D., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., & Finkemeier, I. (2008). Decrease in Manganese Superoxide Dismutase Leads to Reduced Root Growth and Affects Tricarboxylic Acid Cycle Flux and Mitochondrial Redox Homeostasis. *Plant Physiology*, *147*(1), 101–114. https://doi.org/10.1104/pp.107.113613.

Morrissey, M. B., & Liefting, M. (2016). Variation in reaction norms: Statistical considerations and biological interpretation: ANALYSIS OF REACTION NORMS. *Evolution*, *70*(9), 1944–1959. https://doi.org/10.1111/evo.13003.

Moustakas, M. (2021). Plant Photochemistry, Reactive Oxygen Species, and Photoprotection. *Photochem*, *2*(1), 5–8. https://doi.org/10.3390/photochem2010002.

Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, *64*(13), 3983–3998. https://doi.org/10.1093/jxb/ert208.

Murren, C. J. (2002). Phenotypic integration in plants. *Plant Species Biology*, *17*(2–3), 89–99. https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.2002.00079.x.

Murren, C. J. (2012). The Integrated Phenotype. *Integrative and Comparative Biology*, *52*(1), 64–76. https://doi.org/10.1093/icb/ics043.

Myouga, F., Hosoda, C., Umezawa, T., Iizumi, H., Kuromori, T., Motohashi, R., Shono, Y., Nagata, N., Ikeuchi, M., & Shinozaki, K. (2008). A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *20*(11), 3148–3162. https://doi.org/10.1105/tpc.108.061341.

NASA. (2024). *Whats-the-difference-between-climate-change-and-global-warming* [Online post]. https://science.nasa.gov/climate-change/faq/whats-the-difference-between-climate-change-and-global-warming/.

Nawaz, M., Sun, J., Shabbir, S.,Khattak, W. A., Ren, G., Nie, X., Bo, Y., Javed, Q., Du, D., & Sonne, C. (2023). A review of plants strategies to resist biotic and abiotic environmental stressors. *Science of The Total Environment*, *900*, 165832. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165832.

Nicotra, A. B., Atkin, O. K., Bonser, S. P., Davidson, A. M., Finnegan, E. J., Mathesius, U., Poot, P., Purugganan, M. D., Richards, C. L., Valladares, F., & Van Kleunen, M. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*, *15*(12), 684–692. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.09.008.

Nielsen, M. E., & Papaj, D. R. (2022). Why study plasticity in multiple traits? New hypotheses for how phenotypically plastic traits interact during development and selection. *Evolution*, *76*(5), 858–869. https://doi.org/10.1111/evo.14464.

Nielsen, S. L., Enriquez, S., Duarte, C. M., & Sand-Jensen, K. (1996). Scaling Maximum Growth Rates Across Photosynthetic Organisms. *Functional Ecology*, *10*(2), 167. https://doi.org/10.2307/2389840.

Niemann, G. J., Pureveen, J. B. M., Eijkel, G. B., Poorter, H., & Boon, J. J. (1992). Differences in relative growth rate in 11 grasses correlate with differences in chemical composition as determined by pyrolysis mass spectrometry. *Oecologia*, *89*(4), 567–573. https://doi.org/10.1007/BF00317165.

Nieto-Sotelo, J., Martínez, L. M., Ponce, G., Cassab, G. I., Alagón, A., Meeley, R. B., Ribaut, J.-M., & Yang, R. (2002). Maize HSP101 Plays Important Roles in Both Induced and Basal Thermotolerance and Primary Root Growth. *The Plant Cell*, *14*(7), 1621–1633. https://doi.org/10.1105/tpc.010487.

Nievola, C. C., Carvalho, C. P., Carvalho, V., & Rodrigues, E. (2017). Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature*, *4*(4), 371–405. https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1377812.

Niinemets, Ü. (2001). Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density, and thickness in trees and shrubs. *Ecology*, *82*(2), 453–469. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082%5B0453:GSCCOL%5D2.0.CO;2.

Nijhout, H. F. (2003). Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evolution & Development*, *5*(1), 9–18. https://doi.org/10.1046/j.1525-142X.2003.03003.x.

Niklas, K. J., Shi, P., Gielis, J., Schrader, J., & Niinemets, Ü. (2023). Editorial: Leaf functional traits: Ecological and evolutionary implications. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1169558. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1169558.

Nuttall, J. G., Barlow, K. M., Delahunty, A. J., Christy, B. P., & O'Leary, G. J. (2018). Acute High Temperature Response in Wheat. *Agronomy Journal*, *110*(4), 1296–1308. https://doi.org/10.2134/agronj2017.07.0392.

O'Brien, R. G., & Kaiser, M. K. (1985). MANOVA method for analyzing repeated measures designs: An extensive primer. *Psychological Bulletin*, *97*(2), 316–333. https://doi.org/10.1037/0033-2909.97.2.316.

Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. *Trends in Plant Science*, *22*(1), 53–65. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.015.

Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., et al. (2022). vegan: Community Ecology Package (Version 2.6-4) [R package]. https://CRAN.R-project.org/package=vegan.

Olsson, K., & Ågren, J. (2002). Latitudinal population differentiation in phenology, life history and flower morphology in the perennial herb *Lythrum salicaria*. *Journal of Evolutionary Biology*, *15*(6), 983–996. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00457.x.

O'sullivan, O. S., Heskel, M. A., Reich, P. B., Tjoelker, M. G., Weerasinghe, L. K., Penillard, A., Zhu, L., Egerton, J. J. G., Bloomfield, K. J., Creek, D., Bahar, N. H. A., Griffin, K. L., Hurry, V., Meir, P., Turnbull, M. H., & Atkin, O. K. (2017). Thermal limits of leaf metabolism across biomes. *Global Change Biology*, *23*(1), 209–223. https://doi.org/10.1111/gcb.13477.

Oyanoghafo, O. O., Miller, A. D., Toomey, M., Ahrens, C. W., Tissue, D. T., & Rymer, P. D. (2023). Contributions of phenotypic integration, plasticity and genetic adaptation to adaptive capacity relating to drought in Banksia marginata (Proteaceae). *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1150116. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1150116.

Pahadi, P., Chen, Y.-Y., Annis, S., Calderwood, L., Drummond, F., Wason, J., & Zhang, Y.-J. (2025). Warming enhances productivity despite exacerbated water and nutrient deficits in wild blueberry, a traditionally managed temperate crop. *Agricultural and Forest Meteorology*, *375*, 110820. https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2025.110820.

Pan, C.-C., Feng, Q., Zhao, H.-L., Liu, L.-D., Li, Y.-L., Li, Y.-Q., Zhang, T.-H., & Yu, X.-Y. (2017). Earlier flowering did not alter pollen limitation in an early flowering shrub under short-term experimental warming. *Scientific Reports*, *7*(1), 2795. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03037-9.

Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y. K., Arora, S., & Reddy, M. K. (2017). Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 581. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00581.

Park, C.-J., & Seo, Y.-S. (2015). Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *The Plant Pathology Journal*, *31*(4), 323–333. https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150.

Park, I. W., & Schwartz, M. D. (2015). Long-term herbarium records reveal temperature-dependent changes in flowering phenology in the southeastern USA. *International Journal of Biometeorology*, *59*(3), 347–355. https://doi.org/10.1007/s00484-014-0846-0.

Parmesan, C. (2006). Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *37*(1), 637–669. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110100.

Parsons, K. J., McWhinnie, K., Pilakouta, N., & Walker, L. (2020). Does phenotypic plasticity initiate developmental bias? *Evolution & Development*, *22*(1–2), 56–70. https://doi.org/10.1111/ede.12304.

Pavanetto, N., Carmona, C. P., Laanisto, L., Niinemets, Ü., & Puglielli, G. (2024). Trait dimensions of abiotic stress tolerance in woody plants of the Northern Hemisphere. *Global Ecology and Biogeography*, *33*(2), 272–285. https://doi.org/10.1111/geb.13788.

Pavlicev, M., Cheverud, J. M., & Wagner, G. P. (2009). Measuring Morphological Integration Using Eigenvalue Variance. *Evolutionary Biology*, *36*(1), 157–170. https://doi.org/10.1007/s11692-008-9042-7.

Pavlović, P., Kostić, N., Karadžić, B., & Mitrović, M. (2017). *The Soils of Serbia*. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8660-7.

Pecl, G. T., Araújo, M. B., Bell, J. D., Blanchard, J., Bonebrake, T. C., Chen, I.-C., Clark, T. D., Colwell, R. K., Danielsen, F., Evengård, B., Falconi, L., Ferrier, S., Frusher, S., Garcia, R. A., Griffis, R. B., Hobday, A. J., Janion-Scheepers, C., Jarzyna, M. A., Jennings, S., … Williams, S. E. (2017). Biodiversity redistribution under climate change: Impacts on ecosystems and human well-being. *Science*, *355*(6332), eaai9214. https://doi.org/10.1126/science.aai9214.

Pedersen, E. J., Miller, D. L., Simpson, G. L., & Ross, N. (2019). Hierarchical generalized additive models in ecology: An introduction with mgcv. *PeerJ*, *7*, e6876. https://doi.org/10.7717/peerj.6876.

Pelham, H. R. B. (1982). A regulatory upstream promoter element in the Drosophila Hsp 70 heat-shock gene. *Cell*, *30*(2), 517–528. https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90249-5.

Penfield, S. (2008). Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytologist*, *179*(3), 615–628. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02478.x.

Penuelas, J., Filella, I., Llusia, J., Siscart, D., & Pinol, J. (1998). Comparative field study of spring and summer leaf gas exchange and photobiology of the mediterranean trees Quercus ilex and Phillyrea latifolia. *Journal of Experimental Botany*, *49*(319), 229–238. https://doi.org/10.1093/jxb/49.319.229.

Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M. S., Cornwell, W. K., Craine, J. M., Gurvich, D. E., Urcelay, C., Veneklaas, E. J., Reich, P. B., Poorter, L., Wright, I. J., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J. G., De Vos, A. C., … Cornelissen, J. H. C. (2016). *Corrigendum to*: New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, *64*(8), 715–716. https://doi.org/10.1071/BT12225_CO.

Piao, S., Liu, Q., Chen, A., Janssens, I. A., Fu, Y., Dai, J., Liu, L., Lian, X., Shen, M., & Zhu, X. (2019). Plant phenology and global climate change: Current progresses and challenges. *Global Change Biology*, *25*(6), 1922–1940. https://doi.org/10.1111/gcb.14619.

Pietsch, K. A., Ogle, K., Cornelissen, J. H. C., Cornwell, W. K., Bönisch, G., Craine, J. M., Jackson, B. G., Kattge, J., Peltzer, D. A., Penuelas, J., Reich, P. B., Wardle, D. A., Weedon, J. T., Wright, I. J., Zanne, A. E., & Wirth, C. (2014). Global relationship of wood and leaf litter decomposability: The role of functional traits within and across plant organs. *Global Ecology and Biogeography*, *23*(9), 1046–1057. https://doi.org/10.1111/geb.12172.

Pigliucci, M. (2001). *Phenotypic Plasticity*. Johns Hopkins University Press. https://doi.org/10.56021/9780801867880.

Pigliucci, M. (2003). Phenotypic integration: Studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology Letters*, *6*(3), 265–272. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00428.x.

Pigliucci, M., & Preston, K. (Eds.). (2004). *Phenotypic Integration: Studying the Ecology and Evolution of Complex Phenotypes*. Oxford University PressNew York, NY. https://doi.org/10.1093/oso/9780195160437.001.0001.

Pineda, M., Barón, M., & Pérez-Bueno, M. L. (2024). Diverse projected climate change scenarios affect the physiology of broccoli plants to different extents. *Physiologia Plantarum*, *176*(2), e14269. https://doi.org/10.1111/ppl.14269.

Pinheiro, J., Bates, D., & R Core Team. (2026). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (Version 3.1-170) [R package]. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.nlme.

Poorter, H., & De Jong, R. (1999). A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytologist*, *143*(1), 163–176. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00428.x.

Poorter, H., Fiorani, F., Stitt, M., Schurr, U., Finck, A., Gibon, Y., Usadel, B., Munns, R., Atkin, O. K., Tardieu, F., & Pons, T. L. (2012). The art of growing plants for experimental purposes: A practical guide for the plant biologist. *Functional Plant Biology*, *39*(11), 821–838. https://doi.org/10.1071/FP12028.

Poorter, H., Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I. J., & Villar, R. (2009). Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist*, *182*(3), 565–588. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02830.x.

Poorter, H., Remkes, C., & Lambers, H. (1990). Carbon and Nitrogen Economy of 24 Wild Species Differing in Relative Growth Rate. *Plant Physiology*, *94*(2), 621–627. https://doi.org/10.1104/pp.94.2.621.

Potvin, C., Lechowicz, M. J., & Tardif, S. (1990). The Statistical Analysis of Ecophysiological Response Curves Obtained from Experiments Involving Repeated Measures. *Ecology*, *71*(4), 1389–1400. https://doi.org/10.2307/1938276.

Prasad, P. V. V., & Jagadish, S. V. K. (2015). Field Crops and the Fear of Heat Stress – Opportunities, Challenges and Future Directions. *Procedia Environmental Sciences*, *29*, 36–37. https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.144.

Preston, K. A., & Ackerly, D. D. (2004). The Evolution of Allometry in Modular Organisms. In M. Pigliucci & K. Preston (Eds.), *Phenotypic Integration* (pp. 80–106). Oxford University PressNew York, NY. https://doi.org/10.1093/oso/9780195160437.003.0004.

Qin, D., Wu, H., Peng, H., Yao, Y., Ni, Z., Li, Z., Zhou, C., & Sun, Q. (2008). Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (Triticum aestivum L.) by using Wheat Genome Array. *BMC Genomics*, *9*(1), 432. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-432.

Qin, F., Yu, B., & Li, W. (2021). Heat shock protein 101 (HSP101) promotes flowering under nonstress conditions. *Plant Physiology*, *186*(1), 407–419. https://doi.org/10.1093/plphys/kiab052.

Queitsch, C., Hong, S.-W., Vierling, E., & Lindquist, S. (2000). Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *12*(4), 479–492. https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.479.

R Core Team. (2025). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (Version 4.5.1) [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/.

Rajashekar, C. B., & Panda, M. (2014). Water stress is a component of cold acclimation process essential for inducing full freezing tolerance in strawberry. *Scientia Horticulturae*, *174*, 54–59. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.007.

Rammal, M., AL Hakeem, Y., Hijazi, B., Hijazi, A., EL Badan, D., Darwich, S., Abdel Baki, Z., & Rammal, J. (2025). Chemical Perspectives on Climate Change: Impacts on Plant Physiology and Agriculture. *Journal of Chemical Reviews*, (Online First). https://doi.org/10.48309/jcr.2025.514686.1434.

Rantanen, M., Karpechko, A. Yu., Lipponen, A., Nordling, K., Hyvärinen, O., Ruosteenoja, K., Vihma, T., & Laaksonen, A. (2022). The Arctic has warmed nearly four times faster than the globe since 1979. *Communications Earth & Environment*, *3*(1), 168. https://doi.org/10.1038/s43247-022-00498-3.

Rao, M. V., Paliyath, G., & Ormrod, D. P. (1996). Ultraviolet-B- and Ozone-Induced Biochemical Changes in Antioxidant Enzymes of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*, *110*(1), 125–136. https://doi.org/10.1104/pp.110.1.125.

Rawson, H., Gardner, P., & Long, M. (1987). Sources of Variation in Specific Leaf Area in Wheat Grown at High Temperature. *Australian Journal of Plant Physiology*, *14*(3), 287–298. https://doi.org/10.1071/PP9870287.

Raza, A., Razzaq, A., Mehmood, S. S., Zou, X., Zhang, X., Lv, Y., & Xu, J. (2019). Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants*, *8*(2), 34. https://doi.org/10.3390/plants8020034.

Reed, T. E., Waples, R. S., Schindler, D. E., Hard, J. J., & Kinnison, M. T. (2010). Phenotypic plasticity and population viability: The importance of environmental predictability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *277*(1699), 3391–3400. https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0771.

Reich, P. B. (2014). The world-wide 'fast–slow' plant economics spectrum: A traits manifesto. *Journal of Ecology*, *102*(2), 275–301. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12211.

Reich, P. B., Walters, M. B., & Ellsworth, D. S. (1997). From tropics to tundra: Global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(25), 13730–13734. https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13730.

RHMZ. (2025). *Meteorološki godišnjak – klimatološki podaci*. Republički Hidrometeorološki Zavod Srbije. https://www.hidmet.gov.rs/latin/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php.

Ripley, B., & Venables, B. (2023). *MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS* (Version 7.3-60) [R package]. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.MASS.

Ripple, W. J., Wolf, C., Gregg, J. W., Levin, K., Rockström, J., Newsome, T. M., Betts, M. G., Huq, S., Law, B. E., Kemp, L., Kalmus, P., & Lenton, T. M. (2022). World Scientists' Warning of a Climate Emergency 2022. *BioScience*, *72*(12), 1149–1155. https://doi.org/10.1093/biosci/biac083.

Ristić, Z., Gifford, D. J., & Cass, D. D. (1991). Heat Shock Proteins in Two Lines of *Zea mays* L. That Differ in Drought and Heat Resistance. *Plant Physiology*, *97*(4), 1430–1434. https://doi.org/10.1104/pp.97.4.1430.

Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, *18*(12), 571–573. https://doi.org/10.1007/BF02172188.

Rizhsky, L., Liang, H., & Mittler, R. (2002). The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology*, *130*(3), 1143–1151. https://doi.org/10.1104/pp.006858.

Roche, P., Díaz-Burlinson, N., & Gachet, S. (2004). Congruency analysis of species ranking based on leaf traits: Which traits are the more reliable? *Plant Ecology*, *174*(1), 37–48. https://doi.org/10.1023/B:VEGE.0000046056.94523.57.

Rodríguez, V. M., Soengas, P., Alonso-Villaverde, V., Sotelo, T., Cartea, M. E., & Velasco, P. (2015). Effect of temperature stress on the early vegetative development of Brassica oleracea L. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 145. https://doi.org/10.1186/s12870-015-0535-0.

Rosbakh, S., Römermann, C., & Poschlod, P. (2015). Specific leaf area correlates with temperature: New evidence of trait variation at the population, species and community levels. *Alpine Botany*, *125*(2), 79–86. https://doi.org/10.1007/s00035-015-0150-6.

Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(11), 665–680. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3.

Röth, S., Paul, P., & Fragkostefanakis, S. (2015). Plant Heat Stress Response and Thermotolerance. In P. K. Jaiwal, R. P. Singh, & O. P. Dhankher (Eds.), *Genetic Manipulation in Plants for Mitigation of Climate Change* (pp. 15–41). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2662-8_2.

Ryser, P. (1996). The Importance of Tissue Density for Growth and Life Span of Leaves and Roots: A Comparison of Five Ecologically Contrasting Grasses. *Functional Ecology*, *10*(6), 717. https://doi.org/10.2307/2390506.

Samat, A. T., Soltabayeva, A., Bekturova, A., Zhanassova, K., Auganova, D., Masalimov, Z., Srivastava, S., Satkanov, M., & Kurmanbayeva, A. (2025). Plant responses to heat stress and advances in mitigation strategies. *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1638213. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1638213.

Sánchez-Sastre, L. F., Alte Da Veiga, N. M. S., Ruiz-Potosme, N. M., Carrión-Prieto, P., Marcos-Robles, J. L., Navas-Gracia, L. M., & Martín-Ramos, P. (2020). Assessment of RGB Vegetation Indices to Estimate Chlorophyll Content in Sugar Beet Leaves in the Final Cultivation Stage. *AgriEngineering*, *2*(1), 128–149. https://doi.org/10.3390/agriengineering2010009.

Santhanagopalan, I., Basha, E., Ballard, K. N., Bopp, N. E., & Vierling, E. (2015). Model Chaperones: Small Heat Shock Proteins from Plants. In R. M. Tanguay & L. E. Hightower (Eds.),

The Big Book on Small Heat Shock Proteins (Vol. 8, pp. 119–153). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16077-1_5.

SAS Institute Inc. (2011). SAS/STAT 9.3 User's Guide. SAS Institute Inc.

Scharf, K.-D., Berberich, T., Ebersberger, I., & Nover, L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(2), 104–119. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.10.002.

Scharf, K.-D., Siddique, M., & Vierling, E. (2001). The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing α-crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress & Chaperones*, *6*(3), 225. https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006%3C0225:TEFOAT%3E2.0.CO;2.

Scheiner, S. M. (1993). Genetics and Evolution of Phenotypic Plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *24*(1), 35–68. https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.000343.

Scheiner, S. M., Barfield, M., & Holt, R. D. (2020). The genetics of phenotypic plasticity. XVII. Response to climate change. *Evolutionary Applications*, *13*(2), 388–399. https://doi.org/10.1111/eva.12876.

Schlichting, C. D. (1986). The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics, 17*, 667–693. https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.003315.

Schlichting, C. D. (1989). Phenotypic Integration and Environmental Change. *BioScience*, *39*(7), 460–464. https://doi.org/10.2307/1311138.

Schlichting, C. D., & Pigliucci, M. (1998). *Phenotypic evolution: A reaction norm perspective*. Sinauer.

Schneider, H. M. (2022). Characterization, costs, cues and future perspectives of phenotypic plasticity. *Annals of Botany*, *130*(2), 131–148. https://doi.org/10.1093/aob/mcac087.

Schollert, M., Kivimäenpää, M., Valolahti, H. M., & Rinnan, R. (2015). Climate change alters leaf anatomy, but has no effects on volatile emissions from arctic plants. *Plant, Cell & Environment*, *38*(10), 2048–2060. https://doi.org/10.1111/pce.12530.

Segrestin, J., Navas, M., & Garnier, E. (2020). Reproductive phenology as a dimension of the phenotypic space in 139 plant species from the Mediterranean. *New Phytologist*, *225*(2), 740–753. https://doi.org/10.1111/nph.16165.

Shaar-Moshe, L., Hayouka, R., Roessner, U., & Peleg, Z. (2019). Phenotypic and metabolic plasticity shapes life-history strategies under combinations of abiotic stresses. *Plant Direct*, *3*(1), e00113. https://doi.org/10.1002/pld3.113.

Shafi, A., Chauhan, R., Gill, T., Swarnkar, M. K., Sreenivasulu, Y., Kumar, S., Kumar, N., Shankar, R., Ahuja, P. S., & Singh, A. K. (2015). Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in Arabidopsis under salt stress. *Plant Molecular Biology*, *87*(6), 615–631. https://doi.org/10.1007/s11103-015-0301-6.

Sharma, I., & Ahmad, P. (2014). Catalase. In *Oxidative Damage to Plants* (pp. 131–148). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6.

Sheehy, K. A., & Laskowski, K. L. (2023). Correlated behavioural plasticities: Insights from plasticity evolution, the integrated phenotype and behavioural syndromes. *Animal Behaviour*, *200*, 263–271. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2023.04.007.

Sherrard, M. E., & Maherali, H. (2006). The adaptive significance of drought escape in Avena barbata, an annual grass. *Evolution*, *60*(12), 2478–2489. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01883.x.

Shi, P., Deng, L., Miao, Q., Chen, L., Yu, H., Zhu, F., & Niklas, K. J. (2024). Scaling relationships of lamina mass per unit area, mean thickness, and leaf bulk tissue density across nine diverse species. *American Journal of Botany*, *111*(12), e16442. https://doi.org/10.1002/ajb2.16442.

Shi, W. M., Muramoto, Y., Ueda, A., & Takabe, T. (2001). Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in Arabidopsis thaliana. *Gene*, *273*(1), 23–27. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00566-2.

Shigeoka, S. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, *53*(372), 1305–1319. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1305.

Shipley, B. (1995). Structured Interspecific Determinants of Specific Leaf Area in 34 Species of Herbaceous Angiosperms. *Functional Ecology*, *9*(2), 312. https://doi.org/10.2307/2390579.

Siefert, A., & Ritchie, M. E. (2016). Intraspecific trait variation drives functional responses of old-field plant communities to nutrient enrichment. *Oecologia*, *181*(1), 245–255. https://doi.org/10.1007/s00442-016-3563-z.

Siefert, A., Violle, C., Chalmandrier, L., Albert, C. H., Taudiere, A., Fajardo, A., Aarssen, L. W., Baraloto, C., Carlucci, M. B., Cianciaruso, M. V., De L. Dantas, V., De Bello, F., Duarte, L. D. S., Fonseca, C. R., Freschet, G. T., Gaucherand, S., Gross, N., Hikosaka, K., Jackson, B., … Wardle, D. A. (2015). A global meta-analysis of the relative extent of intraspecific trait variation in plant communities. *Ecology Letters*, *18*(12), 1406–1419. https://doi.org/10.1111/ele.12508.

Sierla, M., Waszczak, C., Vahisalu, T., & Kangasjärvi, J. (2016). Reactive Oxygen Species in the Regulation of Stomatal Movements. *Plant Physiology*, *171*(3), 1569–1580. https://doi.org/10.1104/pp.16.00328.

Signorelli, S., Corpas, F. J., Borsani, O., Barroso, J. B., & Monza, J. (2013). Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of Lotus japonicus. *Plant Science*, *201–202*, 137–146. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.12.004.

Sikorska, D., Papierowska, E., Szatyłowicz, J., Sikorski, P., Suprun, K., & Hopkins, R. J. (2017). Variation in Leaf Surface Hydrophobicity of Wetland Plants: The Role of Plant Traits in Water Retention. *Wetlands*, *37*(5), 997–1002. https://doi.org/10.1007/s13157-017-0924-2.

Silla, F., González-Gil, A., González-Molina, M. E., Mediavilla, S., & Escudero, A. (2010). Estimation of chlorophyll in Quercus leaves using a portable chlorophyll meter: Effects of species and leaf age. *Annals of Forest Science*, *67*(1), 108–108. https://doi.org/10.1051/forest/2009093.

Simons, A. M. (2011). Modes of response to environmental change and the elusive empirical evidence for bet hedging. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*(1712), 1601–1609. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0176.

Singh, A. K., Dhanapal, S., & Yadav, B. S. (2020). The dynamic responses of plant physiology and metabolism during environmental stress progression. *Molecular Biology Reports*, *47*(2), 1459–1470. https://doi.org/10.1007/s11033-019-05198-4.

Singh, G., Sarkar, N. K., & Grover, A. (2021). Hsp70, sHsps and ubiquitin proteins modulate HsfA6a -mediated Hsp101 transcript expression in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiologia Plantarum*, *173*(4), 2055–2067. https://doi.org/10.1111/ppl.13552.

Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Mishra, R. K., Tripathi, D. K., Singh, V. P., Chauhan, D. K., & Prasad, S. M. (2016). Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. *Frontiers in Plant Science*, *7*. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01299.

Smart, S. M., Glanville, H. C., Blanes, M. D. C., Mercado, L. M., Emmett, B. A., Jones, D. L., Cosby, B. J., Marrs, R. H., Butler, A., Marshall, M. R., Reinsch, S., Herrero-Jáuregui, C., & Hodgson, J. G. (2017). Leaf dry matter content is better at predicting above-ground net primary production than specific leaf area. *Functional Ecology*, *31*(6), 1336–1344. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12832.

Smith, MichaelW., & Doolittle, RussellF. (1992). A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Evolution*, *34*(2). https://doi.org/10.1007/BF00182394.

Smith, N. G., & Dukes, J. S. (2013). Plant respiration and photosynthesis in global-scale models: Incorporating acclimation to temperature and CO 2. *Global Change Biology*, *19*(1), 45–63. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02797.x.

Snider, J. L., Oosterhuis, D. M., Skulman, B. W., & Kawakami, E. M. (2009). Heat stress-induced limitations to reproductive success in *Gossypium hirsutum*. *Physiologia Plantarum*, *137*(2), 125–138. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01266.x.

Soengas, P., Rodríguez, V. M., Velasco, P., & Cartea, M. E. (2018). Effect of Temperature Stress on Antioxidant Defenses in *Brassica oleracea*. *ACS Omega*, *3*(5), 5237–5243. https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00242.

Spector, T. (1978). Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. *Analytical Biochemistry*, *86*(1), 142–146. https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90327-5.

Stearns, S. C. (1989). Trade-Offs in Life-History Evolution. *Functional Ecology*, *3*(3), 259. https://doi.org/10.2307/2389364.

Stevanović, V., Milenković, K., & Niketiić, M. (Eds.). (1999). *Iščezli i krajnje ugroženi taksoni: = Extinct and criticaslly endangered taxa*. Grafički centar Ediketa.

Stjepanović-Veselićić, L. (1953). *Vegetacija Deliblatske peščare* (Vol. 4). Srpska akademija nauka, Institut za ekologiju i biogeografiju.

Stojković, B., & Tucić, N. (2012). *Od molekula do organizma: Molekularna i fenotipska evolucija*. Službeni glasnik.

Stollewerk, A., Kratina, P., Sentis, A., Chaparro-Pedraza, C., Decaestecker, E., De Meester, L., Eyice, O., Govaert, L., Jones, J. I., Laforsch, C., Madeira, C., Narwani, A., Oostra, V., Raeymaekers, J. A. M., Rossberg, A. G., Schott, M., Stoks, R., Van Velzen, E., & Boukal, D. (2025). Plasticity in climate change responses. *Biological Reviews*, *100*(6), 2508–2527. https://doi.org/10.1111/brv.70056.

Stotz, G. C., Salgado-Luarte, C., Escobedo, V. M., & Gianoli, E. (2025). Phenotypic integration limits the variation in plant phenotypic plasticity among traits: A meta-analysis. *Functional Ecology*, *39*(11), 3021–3033. https://doi.org/10.1111/1365-2435.70096.

Stuefer, J. F. (1996). Potential and limitations of current concepts regarding the response of clonal plants to environmental heterogeneity. *Vegetatio*, *127*(1), 55–70. https://doi.org/10.1007/BF00054847.

Su, P.-H., & Li, H. (2008). Arabidopsis Stromal 70-kD Heat Shock Proteins Are Essential for Plant Development and Important for Thermotolerance of Germinating Seeds. *Plant Physiology*, *146*(3), 1231–1241. https://doi.org/10.1104/pp.107.114496.

Su, Y., Guo, J., Ling, H., Chen, S., Wang, S., Xu, L., Allan, A. C., & Que, Y. (2014). Isolation of a Novel Peroxisomal Catalase Gene from Sugarcane, Which Is Responsive to Biotic and Abiotic Stresses. *PLoS ONE*, *9*(1), e84426. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084426.

Suárez-Eiroa, B., Soto-Oñate, D., & Loureiro, M. (2024). The responsibility of the EU in climate change mitigation: Assessing the fairness of its recent targets. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, *29*(8), 93. https://doi.org/10.1007/s11027-024-10180-y.

Sultan, S. E. (1987). Evolutionary Implications of Phenotypic Plasticity in Plants. In M. K. Hecht, B. Wallace, & G. T. Prance (Eds.), *Evolutionary Biology* (pp. 127–178). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6986-2_7.

Sun, A.-Z., & Guo, F.-Q. (2016). Chloroplast Retrograde Regulation of Heat Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*, *7*. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00398.

Sun, C. X., Gao, X. X., Li, M. Q., Fu, J. Q., & Zhang, Y. L. (2016). Plastic responses in the metabolome and functional traits of maize plants to temperature variations. *Plant Biology*, *18*(2), 249–261. https://doi.org/10.1111/plb.12378.

Sun, K., He, N., Xia, Y., Li, Y., & Xu, Z. (2026). A Global Atlas of Specific Leaf Area Under Climate Change. *Global Ecology and Biogeography*, *35*(1), e70193. https://doi.org/10.1111/geb.70193.

Sun, W., Bernard, C., Van De Cotte, B., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (2001). *At-HSP17.6A* , encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis* , can enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal*, *27*(5), 407–415. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01107.x.

Sun, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1577*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00417-7.

Sung, D., Kaplan, F., & Guy, C. L. (2001). Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum*, *113*(4), 443–451. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130402.x.

Sung, D. Y., Vierling, E., & Guy, C. L. (2001). Comprehensive Expression Profile Analysis of the Arabidopsis Hsp70 Gene Family. *Plant Physiology*, *126*(2), 789–800. https://doi.org/10.1104/pp.126.2.789.

Sung, D.-Y., Kaplan, F., Lee, K.-J., & Guy, C. L. (2003). Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science*, *8*(4), 179–187. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00047-5.

Suter, M., & Edwards, P. J. (2013). Convergent succession of plant communities is linked to species' functional traits. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *15*(4), 217–225. https://doi.org/10.1016/j.ppees.2013.05.001.

Suzuki, N., & Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, *126*(1), 45–51. https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x.

Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, *203*(1), 32–43. https://doi.org/10.1111/nph.12797.

Syvertsen, J. P., & Levy, Y. (1982). Diurnal Changes in Citrus Leaf Thickness, Leaf Water Potential and Leaf to Air Temperature Difference. *Journal of Experimental Botany*, *33*(4), 783–789. https://doi.org/10.1093/jxb/33.4.783.

Syvertsen, J. P., Lloyd, J., McCONCHIE, C., Kriedemann, P. E., & Farquhar, G. D. (1995). On the relationship between leaf anatomy and CO_2 diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant, Cell & Environment*, *18*(2), 149–157. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00348.x.

Taber, E. M., & Mitchell, R. M. (2023). Rapid changes in functional trait expression and decomposition following high severity fire and experimental warming. *Forest Ecology and Management*, *541*, 121019. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2023.121019.

Tang, L., Kwon, S.-Y., Kim, S.-H., Kim, J.-S., Choi, J. S., Cho, K. Y., Sung, C. K., Kwak, S.-S., & Lee, H.-S. (2006). Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Reports*, *25*(12), 1380–1386. https://doi.org/10.1007/s00299-006-0199-1.

Tarasjev, A. (1997). Flowering phenology in natural populations of Iris pumila. *Ecography*, *20*(1), 48–54. https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1997.tb00346.x.

Tarasjev, A. (2005). Impact of genet size and flowering stage on fruit set in *Iris pumila* L. clones in wild. *Acta Oecologica*, *27*(2), 93–98. https://doi.org/10.1016/j.actao.2004.09.007.

Tarasjev, A., Avramov, S., & Miljković, D. (2012). Evolutionary biology studies on the Iris pumila clonal plant: Advantages of a good model system, main findings and directions for further research. *Archives of Biological Sciences*, *64*(1), 159–174. https://doi.org/10.2298/ABS1201159T.

Tardy, F., Créach, A., & Havaux, M. (1998). Photosynthetic pigment concentration, organization and interconversions in a pale green Syrian landrace of barley (*Hordeum vulgare* L., Tadmor) adapted to harsh climatic conditions. *Plant, Cell & Environment*, *21*(5), 479–489. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00293.x.

Teskey, R., Wertin, T., Bauweraerts, I., Ameye, M., Mcguire, M. A., & Steppe, K. (2015). Responses of tree species to heat waves and extreme heat events. *Plant, Cell & Environment*, *38*(9), 1699–1712. https://doi.org/10.1111/pce.12417.

Tissiéres, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, *84*(3), 389–398. https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90447-1.

Tonsor, S. J., Scott, C., Boumaza, I., Liss, T. R., Brodsky, J. L., & Vierling, E. (2008). Heat shock protein 101 effects in *A. thaliana*: Genetic variation, fitness and pleiotropy in controlled temperature conditions. *Molecular Ecology*, *17*(6), 1614–1626. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03690.x.

Totland, Ø. (1997). Effects of Flowering Time and Temperature on Growth and Reproduction in *Leontodon autumnalis* var. *Taraxaci* , a Late-flowering Alpine Plant. *Arctic and Alpine Research*, *29*(3), 285–290. https://doi.org/10.1080/00040851.1997.12003246.

Totland, Ø. (1999). Effects of temperature on performance and phenotypic selection on plant traits in alpine Ranunculus acris. *Oecologia*, *120*(2), 242–251. https://doi.org/10.1007/s004420050854.

Tredennick, A. T., Hooker, G., Ellner, S. P., & Adler, P. B. (2021). A practical guide to selecting models for exploration, inference, and prediction in ecology. *Ecology*, *102*(6), e03336. https://doi.org/10.1002/ecy.3336.

Tsang, E. W., Bowler, C., Hérouart, D., Van Camp, W., Villarroel, R., Genetello, C., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1991). Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell*, *3*(8), 783–792. https://doi.org/10.1105/tpc.3.8.783.

Tucić, B., & Avramov, S. (1996). Maternal effects on early juvenile traits inIris pumila (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution*, *201*(1–4), 179–197. https://doi.org/10.1007/BF00989060.

Tucić, B., & Miljković, D. (2010). Fluctuating asymmetry of floral organ traits in natural populations of *Iris pumila* from contrasting light habitats. *Plant Species Biology*, *25*(3), 173–184. https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2010.00284.x.

Tucić, B., Milojković, S., Tarasjev, A., & Vujčić, S. (1989). The influence of climatic factors on clonal diversity in a population of *Iris pumila*. *Oikos,* *56*(1), 115–120. https://doi.org/10.2307/3566094

Tucić, B., Milojković, S., Vujčić, S., & Tarasjev, A. (1988). *Clonal diversity and dispersion in Iris pumila.* https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19880390891.

Tucić, B., Rak-Šoltes, E., Stevanović, V., & Tucić, N. (1984). Genetic distance and organization of isoenzyme variation in several Iris species. *Biosistematika*, *10*(1), 13–23.

Tucić, B., Tarasjev, A., Vujčić, S., Milojković, S., & Tucić, N. (1990). Phenotypic plasticity and character differentiation in a subdivided population ofIris pumila (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution*, *170*(1–2), 1–9. https://doi.org/10.1007/BF00937845.

Tucić, B., Tomić, V., Avramov, S., & Pemac, D. (1998). Testing the adaptive plasticity of Iris pumila leaf traits to natural light conditions using phenotypic selection analysis. *Acta Oecologica*, *19*(6), 473–481. https://doi.org/10.1016/S1146-609X(99)80001-0.

Tucić, B., Vuleta, A., & Manitašević Jovanović, S. (2009). Protective function of foliar anthocyanins: *In situ* experiments on a sun-exposed population of *Iris pumila* L.(Iridaceae). *Pol J Ecol*, *57*(4), 779–783.

Ul Haq, S., Khan, A., Ali, M., Khattak, A. M., Gai, W.-X., Zhang, H.-X., Wei, A.-M., & Gong, Z.-H. (2019). Heat Shock Proteins: Dynamic Biomolecules to Counter Plant Biotic and Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(21), 5321. https://doi.org/10.3390/ijms20215321.

Urban, J., Ingwers, M., McGuire, M. A., & Teskey, R. O. (2017). Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signaling & Behavior*, *12*(8), e1356534. https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1356534.

Urban, M. C. (2015). Accelerating extinction risk from climate change. *Science*, *348*(6234), 571–573. https://doi.org/10.1126/science.aaa4984.

Usman, M. G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Malek, M. A., & Latif, M. A. (2015). Expression of Target Gene Hsp70 and Membrane Stability Determine Heat Tolerance in Chili Pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *140*(2), 144–150. https://doi.org/10.21273/JASHS.140.2.144.

Usman, M. G., Rafii, M. Y., Martini, M. Y., Yusuff, O. A., Ismail, M. R., & Miah, G. (2017). Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *33*(1), 26–39. https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1340546.

Vacca, R. A., De Pinto, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., & De Gara, L. (2004). Production of Reactive Oxygen Species, Alteration of Cytosolic Ascorbate Peroxidase, and Impairment of Mitochondrial Metabolism Are Early Events in Heat Shock-Induced Programmed Cell Death in Tobacco Bright-Yellow 2 Cells. *Plant Physiology*, *134*(3), 1100–1112. https://doi.org/10.1104/pp.103.035956.

Valdés, A., Marteinsdóttir, B., & Ehrlén, J. (2019). A natural heating experiment: Phenotypic and genotypic responses of plant phenology to geothermal soil warming. *Global Change Biology*, *25*(3), 954–962. https://doi.org/10.1111/gcb.14525.

Valladares, F., Gianoli, E., & Gómez, J. M. (2007). Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, *176*(4), 749–763. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02275.x.

Valladares, F., Sanchez-Gomez, D., & Zavala, M. A. (2006). Quantitative estimation of phenotypic plasticity: Bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology*, *94*(6), 1103–1116. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01176.x.

Van Kleunen, M., & Fischer, M. (2005). Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist*, *166*(1), 49–60. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01296.x.

Vendramini, F., Díaz, S., Gurvich, D. E., Wilson, P. J., Thompson, K., & Hodgson, J. G. (2002). Leaf traits as indicators of resource-use strategy in floras with succulent species. *New Phytologist*, *154*(1), 147–157. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00357.x.

Verma, D., Kaushal, N., Balhara, R., & Singh, K. (2023). Genome-wide analysis of Catalase gene family reveal insights into abiotic stress response mechanism in Brassica juncea and B. rapa. *Plant Science*, *330*, 111620. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111620.

Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* *42*(1), 579–620. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.003051

Vighi, I. L., Benitez, L. C., Do Amaral, M. N., Auler, P. A., Moraes, G. P., Rodrigues, G. S., Da Maia, L. C., Pinto, L. S., & Braga, E. J. B. (2016). Changes in gene expression and catalase activity in Oryza sativa L. under abiotic stress. *Genetics and Molecular Research*, *15*(4). https://doi.org/10.4238/gmr15048977.

Vile, D., Garnier, É., Shipley, B., Laurent, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Lavorel, S., Díaz, S., Hodgson, J. G., Lloret, F., Midgley, G. F., Poorter, H., Rutherford, M. C., Wilson, P. J., & Wright, I. J. (2005). Specific Leaf Area and Dry Matter Content Estimate Thickness in Laminar Leaves. *Annals of Botany*, *96*(6), 1129–1136. https://doi.org/10.1093/aob/mci264.

Violle, C., Navas, M., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos*, *116*(5), 882–892. https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x.

Vitasse, Y., Bresson, C. C., Kremer, A., Michalet, R., & Delzon, S. (2010). Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Functional Ecology*, *24*(6), 1211–1218. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01748.x.

Volaire, F. (2018). A unified framework of plant adaptive strategies to drought: Crossing scales and disciplines. *Global Change Biology*, *24*(7), 2929–2938. https://doi.org/10.1111/gcb.14062.

Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Mullineaux, P. M., & Schöffl, F. (2006). Heat stress-induced H2O2 is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, *61*(4–5), 733–746. https://doi.org/10.1007/s11103-006-0045-4.

Von Ende, C. N. (2001). Repeated-measures Analysis: Growth and Other Time-dependent Measures. In S. M. Scheiner & J. Gurevitch (Eds.), *Design and Analysis of Ecological Experiments* (Second Edition, pp. 134–157). Oxford University PressNew York, NY. https://doi.org/10.1093/oso/9780195131871.003.0008.

Vuleta, A., Hočevar, K., Manitašević Jovanović, S., Raičević, J., & Plećaš, M. (2022). Assessment of Iris pumila L. pollinator and florivore diversity in a common garden: A pan-trap experiment. *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Biology and 23rd SPPS Meeting*, 142.

Vuleta, A., Manitašević Jovanović, S., & Tucić, B. (2014). How do plants cope with oxidative stress in nature? A study on the dwarf bearded iris (Iris pumila). *Acta Physiologiae Plantarum*, *37*(1), 1711. https://doi.org/10.1007/s11738-014-1711-9.

Vuleta, A., Manitašević Jovanović, S., & Tucić, B. (2016). Adaptive flexibility of enzymatic antioxidants SOD, APX and CAT to high light stress: The clonal perennial monocot Iris pumila as a study case. *Plant Physiology and Biochemistry*, *100*, 166–173. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.01.011.

Vuleta, A., Manitašević-Jovanović, S., & Tucić, B. (2011). Light intensity influences variations in the structural and physiological traits in the leaves of Iris pumila L. *Archives of Biological Sciences*, *63*(4), 1099–1110. https://doi.org/10.2298/ABS1104099V.

Vuleta, A., & Tucić, B. (2009). Thermal dependence of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in foliage of Iris pumila L. *Archives of Biological Sciences*, *61*(3), 441–446. https://doi.org/10.2298/ABS0903441V.

Waadt, R., Seller, C. A., Hsu, P.-K., Takahashi, Y., Munemasa, S., & Schroeder, J. I. (2022). Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(10), 680–694. https://doi.org/10.1038/s41580-022-00479-6.

Wagner, G. P. (Ed.). (2001). *The character concept in evolutionary biology*. Academic Press.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, *61*(3), 199–223. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011.

Wang, H., Gao, Z., Chen, X., Li, E., Li, Y., Zhang, C., & Hou, X. (2023). BcWRKY22 Activates BcCAT2 to Enhance Catalase (CAT) Activity and Reduce Hydrogen Peroxide (H2O2) Accumulation, Promoting Thermotolerance in Non-Heading Chinese Cabbage (Brassica campestris ssp. Chinensis). *Antioxidants*, *12*(9), 1710. https://doi.org/10.3390/antiox12091710.

Wang, L., Ma, K.-B., Lu, Z.-G., Ren, S.-X., Jiang, H.-R., Cui, J.-W., Chen, G., Teng, N.-J., Lam, H.-M., & Jin, B. (2020). Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of Arabidopsis leaves under prolonged warming and heat shock. *BMC Plant Biology*, *20*(1), 86. https://doi.org/10.1186/s12870-020-2292-y.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, *9*(5), 244–252. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006.

Wang, W., Xia, M. X., Chen, J., Yuan, R., Deng, F. N., & Shen, F. F. (2016). Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress. *Biochemistry (Moscow)*, *81*(5), 465–480. https://doi.org/10.1134/S0006297916050047.

Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R., & Fuchigami, L. (2005). Overexpression of Cytosolic Ascorbate Peroxidase in Tomato Confers Tolerance to Chilling and Salt Stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *130*(2), 167–173. https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.167.

Wang, Z., Huang, H., Wang, H., Peñuelas, J., Sardans, J., Niinemets, Ü., Niklas, K. J., Li, Y., Xie, J., & Wright, I. J. (2022). Leaf water content contributes to global leaf trait relationships. *Nature Communications*, *13*(1), 5525. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32784-1.

Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, *4*(3), 162–176. https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010.

Warren, R., Price, J., Graham, E., Forstenhaeusler, N., & VanDerWal, J. (2018). The projected effect on insects, vertebrates, and plants of limiting global warming to 1.5°C rather than 2°C. *Science*, *360*(6390), 791–795. https://doi.org/10.1126/science.aar3646.

Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, *69*(1), 209–236. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322.

Waters, E. R. (2013). The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *Journal of Experimental Botany*, *64*(2), 391–403. https://doi.org/10.1093/jxb/ers355.

Waters, E. R., & Vierling, E. (2020). Plant small heat shock proteins – evolutionary and functional diversity. *New Phytologist*, *227*(1), 24–37. https://doi.org/10.1111/nph.16536.

Wei, T., & Simko, V. (2021). *corrplot: Visualization of a Correlation Matrix* (Version 0.92) [R package]. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.corrplot.

Weiher, E., Van Der Werf, A., Thompson, K., Roderick, M., Garnier, E., & Eriksson, O. (1999). Challenging Theophrastus: A common core list of plant traits for functional ecology. *Journal of Vegetation Science*, *10*(5), 609–620. https://doi.org/10.2307/3237076.

Welch, W. J. (1992). Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*, *72*(4), 1063–1081. https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.4.1063.

Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, *144*(3), 307–313. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2.

Wellstein, C., Chelli, S., Campetella, G., Bartha, S., Galiè, M., Spada, F., & Canullo, R. (2013). Intraspecific phenotypic variability of plant functional traits in contrasting mountain grasslands habitats. *Biodiversity and Conservation*, *22*(10), 2353–2374. https://doi.org/10.1007/s10531-013-0484-6.

Wellstein, C., Poschlod, P., Gohlke, A., Chelli, S., Campetella, G., Rosbakh, S., Canullo, R., Kreyling, J., Jentsch, A., & Beierkuhnlein, C. (2017). Effects of extreme drought on specific leaf area of grassland species: A meta-analysis of experimental studies in temperate and sub-Mediterranean systems. *Global Change Biology*, *23*(6), 2473–2481. https://doi.org/10.1111/gcb.13662.

West-Eberhard, M. J. (1989). Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *20*(1), 249–278. https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.001341.

West-Eberhard, M. J. (2003). *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/oso/9780195122343.001.0001

Westoby, M. (1998). A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant and Soil*, *199*(2), 213–227. https://doi.org/10.1023/A:1004327224729.

Westoby, M., Falster, D. S., Moles, A. T., Vesk, P. A., & Wright, I. J. (2002). Plant Ecological Strategies: Some Leading Dimensions of Variation Between Species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *33*, 125–159. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150452.

White, J. W., & Montes-R, C. (2005). Variation in parameters related to leaf thickness in common bean (Phaseolus vulgaris L.). *Field Crops Research*, *91*(1), 7–21. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.05.001.

Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2023). dplyr: A Grammar of Data Manipulation (Version 1.1.4) [R package]. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.dplyr.

Wickham, H., & Henry, L. (2023). purrr: Functional Programming Tools (Version 1.0.2) [R package]. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.purrr.

Wiens, J. A. (1976). Population responses to patchy environments. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7, 81–120. https://doi.org/10.1146/annurev.es.07.110176.000501.

Willekens, H. (1997). Catalase is a sink for H2O2 and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal*, *16*(16), 4806–4816. https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4806.

Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M., & Van Camp, W. (1995). Catalases in plants. *Molecular Breeding*, *1*(3), 207–228. https://doi.org/10.1007/BF02277422.

Willner, W., Kuzemko, A., Dengler, J., Chytrý, M., Bauer, N., Becker, T., Biţă-Nicolae, C., Botta-Dukát, Z., Čarni, A., Csiky, J., Igić, R., Kącki, Z., Korotchenko, I., Kropf, M., Krstivojević-Ćuk, M., Krstonošić, D., Rédei, T., Ruprecht, E., Schratt-Ehrendorfer, L., … Janišová, M. (2017). A higher-level classification of the Pannonian and western Pontic steppe grasslands (Central and Eastern Europe). *Applied Vegetation Science*, *20*(1), 143–158. https://doi.org/10.1111/avsc.12265.

Wilson, P. J., Thompson, K., & Hodgson, J. G. (1999). Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytologist*, *143*(1), 155–162. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00427.x.

Witkowski, E. T. F., & Lamont, B. B. (1991). Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia*, *88*(4), 486–493. https://doi.org/10.1007/BF00317710.

Wood, S. N. (2017). *Generalized Additive Models: An Introduction with R* (2nd ed.). Chapman and Hall/CRC. https://doi.org/10.1201/9781315370279.

Wright, I. J., Dong, N., Maire, V., Prentice, I. C., Westoby, M., Díaz, S., Gallagher, R. V., Jacobs, B. F., Kooyman, R., Law, E. A., Leishman, M. R., Niinemets, Ü., Reich, P. B., Sack, L., Villar, R., Wang, H., & Wilf, P. (2017). Global climatic drivers of leaf size. *Science*, *357*(6354), 917–921. https://doi.org/10.1126/science.aal4760.

Wright, I. J., Reich, P. B., Westoby, M., Ackerly, D. D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J. H. C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P. K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B. B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., … Villar, R. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, *428*(6985), 821–827. https://doi.org/10.1038/nature02403.

Wu, C. (1984). Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature*, *311*(5981), 81–84. https://doi.org/10.1038/311081a0.

Wu, G., Liu, H., Hua, L., Luo, Q., Lin, Y., He, P., Feng, S., Liu, J., & Ye, Q. (2018). Differential Responses of Stomata and Photosynthesis to Elevated Temperature in Two Co-occurring Subtropical Forest Tree Species. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 467. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00467.

Wu, T., Tissue, D. T., Li, X., Liu, S., Chu, G., Zhou, G., Li, Y., Zheng, M., Meng, Z., & Liu, J. (2020). Long-term effects of 7-year warming experiment in the field on leaf hydraulic and economic traits of subtropical tree species. *Global Change Biology*, *26*(12), 7144–7157. https://doi.org/10.1111/gcb.15355

Wunder, J., Fulgione, A., Toräng, P., Wötzel, S., Herzog, M., Obeso, J. R., Kourmpetis, Y., Van Ham, R., Odong, T., Bink, M., Kemi, U., Ågren, J., & Coupland, G. (2023). Adaptation of perennial flowering phenology across the European range of *Arabis alpina*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *290*(2011), 20231401. https://doi.org/10.1098/rspb.2023.1401.

Xu, Z., & Zhou, G. (2008). Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany*, *59*(12), 3317–3325. https://doi.org/10.1093/jxb/ern185.

Yadav, A., Singh, J., Ranjan, K., Kumar, P., Khanna, S., Gupta, M., Kumar, V., Wani, S. H., & Sirohi, A. (2020). Heat Shock Proteins: Master Players for Heat-stress Tolerance in Plants during Climate Change. In S. H. Wani & V. Kumar (Eds.), *Heat Stress Tolerance in Plants* (1st ed., pp. 189–211). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781119432401.ch9.

Yamaguchi, N., Matsubara, S., Yoshimizu, K., Seki, M., Hamada, K., Kamitani, M., Kurita, Y., Nomura, Y., Nagashima, K., Inagaki, S., Suzuki, T., Gan, E.-S., To, T., Kakutani, T., Nagano, A. J., Satake, A., & Ito, T. (2021). H3K27me3 demethylases alter HSP22 and HSP17.6C expression in response to recurring heat in Arabidopsis. *Nature Communications*, *12*(1), 3480. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23766-w.

Yan, Y., Li, B., Dechant, B., Xu, M., Luo, X., Qu, S., Miao, G., Leng, J., Shang, R., Shu, L., Jiang, C., Wang, H., Jeong, S., Ryu, Y., & Chen, J. M. (2025). Plant traits shape global spatiotemporal variations in photosynthetic efficiency. *Nature Plants*, *11*(4), 924–934. https://doi.org/10.1038/s41477-025-01958-2.

Yang, J., Gao, Y., Zhao, C., & Chen, H. (2024). Leaf phenotypic plasticity and integration balance plant adaptation to water table decline: A mesocosm experiment. *Plant and Soil*, *497*(1–2), 611–627. https://doi.org/10.1007/s11104-023-06418-4.

Yang, Y. Y., & Kim, J. G. (2016). The optimal balance between sexual and asexual reproduction in variable environments: A systematic review. *Journal of Ecology and Environment*, *40*(1), 12. https://doi.org/10.1186/s41610-016-0013-0.

Yoo, C. Y., Pence, H. E., Hasegawa, P. M., & Mickelbart, M. V. (2009). Regulation of Transpiration to Improve Crop Water Use. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *28*(6), 410–431. https://doi.org/10.1080/07352680903173175.

Yoon, H., Kim, K. P., Park, S. M., & Hong, C. B. (2005). Functional mode of NtHSP17.6, a cytosolic small heat-shock protein from Nicotiana tabacum. *Journal of Plant Biology*, *48*(1), 120–127. https://doi.org/10.1007/BF03030571.

Young, T. E., Ling, J., Geisler-Lee, C. J., Tanguay, R. L., Caldwell, C., & Gallie, D. R. (2001). Developmental and Thermal Regulation of the Maize Heat Shock Protein, HSP101. *Plant Physiology*, *127*(3), 777–791. https://doi.org/10.1104/pp.010160.

Yurina, N. P. (2023). Heat Shock Proteins in Plant Protection from Oxidative Stress. *Molecular Biology*, *57*(6), 951–964. https://doi.org/10.1134/S0026893323060201.

Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2017). Modulation of Antioxidant Defense System Is Associated with Combined Drought and Heat Stress Tolerance in Citrus. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 953. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00953.

Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2022). Plant responses to multifactorial stress combination. *New Phytologist*, *234*(4), 1161–1167. https://doi.org/10.1111/nph.18087.

Zeileis, A., & Lumley, T. (2026). sandwich: Robust Covariance Matrix Estimators (Version 3.1-3) [R package]. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.sandwich.

Zhang, C., Ma, Z., Zhou, H., & Zhao, X. (2019). Long-term warming results in species-specific shifts in seed mass in alpine communities. *PeerJ*, *7*, e7416. https://doi.org/10.7717/peerj.7416.

Zhang, J., Huang, W., Pan, Q., & Liu, Y. (2005). Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (Vitis vinifera cv. Jingxiu) by heat pretreatment. *Postharvest Biology and Technology*, *38*(1), 80–90. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.05.008.

Zhang, J., Song, M., Zhang, L., Tian, W., Guo, B., Zhou, S., & Ma, C. (2026). Ecological Memory in Plants: Epigenetic Integration of Abiotic Stress and Climate Change. *Plants*, *15*(4), 534. https://doi.org/10.3390/plants15040534.

Zhang, J.-X., Wang, C., Yang, C.-Y., Wang, J.-Y., Chen, L., Bao, X.-M., Zhao, Y.-X., Zhang, H., & Liu, J. (2010). The role of arabidopsis AtFes1A in cytosolic Hsp70 stability and abiotic stress tolerance: The role of AtFes1A in thermotolerance. *The Plant Journal*, *62*(4), 539–548. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04173.x.

Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D. B., Huang, Y., Huang, M., Yao, Y., Bassu, S., Ciais, P., Durand, J.-L., Elliott, J., Ewert, F., Janssens, I. A., Li, T., Lin, E., Liu, Q., Martre, P., Müller, C.,… Asseng, S. (2017). Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(35), 9326–9331. https://doi.org/10.1073/pnas.1701762114.

Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., & Jin, B. (2020). Plant Responses to Heat Stress: Physiology, Transcription, Noncoding RNAs, and Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 117. https://doi.org/10.3390/ijms22010117.

Zheng, Y., Xu, M., Hou, R., Shen, R., Qiu, S., & Ouyang, Z. (2013). Effects of experimental warming on stomatal traits in leaves of maize (*Zea may* L .). *Ecology and Evolution*, *3*(9), 3095–3111. https://doi.org/10.1002/ece3.674.

Zhou, L., & Wang, S. (2023). The bright side of ecological stressors. *Trends in Ecology & Evolution*, *38*(6), 568–578. https://doi.org/10.1016/j.tree.2023.01.010.

Zhou, X.-H., & He, W.-M. (2020). Climate Warming Facilitates Seed Germination in Native but Not Invasive Solidago canadensis Populations. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *8*, 595214. https://doi.org/10.3389/fevo.2020.595214.

Zhou, Y., Deng, J., Tai, Z., Jiang, L., Han, J., Meng, G., & Li, M.-H. (2019). Leaf Anatomy, Morphology and Photosynthesis of Three Tundra Shrubs after 7-Year Experimental Warming on Changbai Mountain. *Plants*, *8*(8), 271. https://doi.org/10.3390/plants8080271.

Zi, H., Jing, X., Liu, A., Fan, X., Chen, S., Wang, H., & He, J. (2023). Simulated climate warming decreases fruit number but increases seed mass. *Global Change Biology*, *29*(3), 841–855. https://doi.org/10.1111/gcb.16498.

Zimmermann, T. G., Andrade, A. C. S., & Richardson, D. M. (2016). Experimental assessment of factors mediating the naturalization of a globally invasive tree on sandy coastal plains: A case study from Brazil. *AoB PLANTS*, *8*, plw042. https://doi.org/10.1093/aobpla/plw042.

Źróbek-Sokolnik, A. (2012). Temperature Stress and Responses of Plants. In P. Ahmad & M. N. V. Prasad (Eds.), *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* (pp. 113–134). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_5.

BIOGRAFIJA AUTORA

Katarina V. Hočevar rođena je 15. maja 1992. godine u Aranđelovcu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2011/2012, a završila 2016. godine sa prosečnom ocenom 8,46. Master studije, modul Molekularna biologija i biotehnologija biljaka, upisala je školske 2016/2017, a završila 2017. godine sa prosečnom ocenom 10,00 odbranivši master rad pod naslovom „Sadržaj proteina toplotnog stresa i pigmenata sa antioksidativnim svojstvima u genotipovima *Iris pumila* L. sa različitom bojom cveta". Doktorske studije, studijski program Biologija, modul Evoluciona biologija, upisala je 2017/2018. godine.

Od novembra 2017. zaposlena je u Odeljenju za evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković" – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu. Izabrana je u zvanje istraživača pripravnika 2018. godine, istraživača saradnika 2021. godine, a višeg stručnog saradnika 2025. godine.

Bila je angažovana u realizaciji projekta „TIM-ŠTIT" internog poziva IBISS-a „Dokaz koncepta", uz podršku projekta SAIGE. Uz istraživački rad veliki deo vremena posvećuje radu na popularizaciji nauke, od 2023. godine kao deo IBISS tima za organizaciju Noći istraživača i učesnik međunarodnih projekata ReFocuS Art (HORIZON-MSCA-2022-CITIZENS01, 101061356) i ReFocuS FLOW (HORIZON-MSCA-2023-CITIZENS-01, 101161922).

Katarina Hočevar je autor/koautor pet naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja i 11 kongresnih saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja. Članica je Evropskog društva za evolucionu biologiju, Društva za fiziologiju biljaka Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана: Катарина Хочевар

број индекса: Б3015/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Еволуционо-еколошки одговори природних популација *Iris pumila* L.

на експериментално повећање температуре *in situ*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

_____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Катарина Хочевар

Број индекса: Б3015/2017

Студијски програм: Биологија

Наслов рада: Еволуционо-еколошки одговори природних популација

Iris pumila L. на експериментално повећање температуре *in situ*

Ментори: др Сања Маниташевић Јовановић, проф. др Тијана Цветић Антић

Потписана: Катарина Хочевар

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

_____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Еволуционо-еколошки одговори природних популација *Iris pumila* L.

на експериментално повећање температуре *in situ*

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

_____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.