



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

Бојана П. Вељковић

**ЕТНОБОТАНИЧКА, МОРФОАНАТОМСКА, ФИТОХЕМИЈСКА И
ГЕНЕТИЧКА СТУДИЈА ПОПУЛАЦИЈА ДИВЉЕ МАЛИНЕ (*Rubus
idaeus* L.) НА ПОДРУЧЈУ СРБИЈЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2019. године

I. Аутор
Име и презиме: Бојана Вељковић
Датум и место рођења: 12.10.1986. године, Нови Пазар, Република Србија
Садашње запослење: асистент, Департман за Биомедицинске науке, Државни универзитет у Новом Пазару
II. Докторска дисертација
Наслов: Етноботаничка, морфоанатомска, фитохемијска и генетичка студија популација дивље малине (<i>Rubus idaeus</i> L.) на подручју Србије
Број страница: 160
Број слика: 14 слика, 31 табела, 14 графикона
Број библиографских података: 256
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Ботаника (58)
Ментор: Проф. др Зора Дајић-Стевановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, Београд
III. Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 04.04.2017. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-01-506/7 12.07.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: Др Зора Дајић-Стевановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, ужа научна област: Пољопривредна ботаника; Др Марина Топузовић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Морфологија, фитохемија и систематика биљака; Др Милан Станковић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Морфологија, систематика и филогенија биљака.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: Др Марина Топузовић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Морфологија, фитохемија и систематика биљака (председник комисије); Др Милан Станковић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине; Др Иван Шоштарић, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, ужа научна област: Пољопривредна ботаника.
Датум одбране докторске дисертације:

Овом приликом желим да се захвалим свима који су ми помогли у различитим фазама израде докторске дисертације.

Експериментални део је спроведен у Биолошкој лабораторији Државног универзитета у Новом Пазару, Лабораторији за Ботанику Института за биологију и екологију Универзитета у Крагујевцу, Лабораторији за молекуларна истраживања Катедре за агроботанику, Пољопривредног факултета у Београду, као и Свеучилишта у Загребу.

Својој менторки, проф. др Зори Дајић-Стевановић, се захваљујем на помоћи, поверењу, пренетом знању и искуству током свих фаза израде докторске дисертације. Проф. др Марини Топузовић, проф. др Александру Остојићу и доц. др Милану Станковићу се захваљујем на подршци и смерницама од уписа докторских студија до данашњег дана. Доц. др Ивану Шоштарићу и др Светлани Аћић се захваљујем на помоћи око експерименталног дела, као и писања дисертације. Проф. др Златку Шатовићу и проф. др Златку Либеру дугујем велику захвалност на помоћи при спровођењу молекуларних анализа.

Драгим колегама са студијског програма Биологија и Хемија неизмерно хвала на подршци.

Мојој породици, оцу и мајци, хвала на свему што су ми омогућили у току школовања. Хвала им на љубави и што су ми подршка и ослонац кад год ми је то потребно. Делом, ову дисертацију посвећујем њима. Мом супругу, хвала на подршци, љубави и стрпљењу у сваком тренутку. На крају, ову дисертацију посвећујем мојој деци, Ђурђи и Вуку, који су ми покретачка снага и смисао живота.

Бојана Вељковић

САДРЖАЈ

УВОД	1
1. Род <i>Rubus</i> : диверзитет, таксономски положај, ботаничке особине и значај.....	1
1.1. Род <i>Rubus</i> у Србији	3
2. <i>Rubus idaeus</i> – морфоанатомске особине, еколошке карактеристике и распрострањење.....	4
3. Генетичка варијабилност рода <i>Rubus</i> и врсте <i>R. idaeus</i>	8
4. Фитохемијске карактеристике врсте <i>Rubus idaeus</i>	9
5. Биолошка активност метаболита врста рода <i>Rubus</i> и <i>R. idaeus</i>	16
6. Дивља малина: традиционална употреба и значај	17
7. Гајена малина: порекло, особине и значај	19
 ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	 23
 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА	 25
1. Опис истраживаних локалитета	25
2. Климатске карактеристике истраживаних локалитета	27
3. Преглед распрострањења и ценобиотичке припадности дивље малине	29
4. Етноботаничка истраживања	29
4.1. Прикупљање, обрада и статистичка анализа етноботаничких података	32
5. Анализа морфолошких карактеристика	35
6. Анализа анатомских карактеристика	36
7. Фитохемијска испитивања	37
7.1. Узорковање биљног материјала	37
7.2. Припрема метанолних екстраката	38
7.3. Одређивање количине укупних фенолних једињења	38

7.4. Одређивање количине флавоноида	39
7.5. Одређивање количине укупних танина	40
7.6. Одређивање количине укупних антоцијанина	41
7.7. Испитивање укупне антиоксидативне активности DPPH методом	41
8. Статистичка обрада фитохемијских резултата	42
9. Испитивање квалитета плодова и традиционалних производа	42
9.1. Припрема етанолних екстраката	42
9.2. Одређивање садржаја укупних шећера	43
9.3. Одређивање садржаја укупних органских киселина	43
9.4. Количина витамина Ц	43
9.5. Испитивање укупне антиоксидативне активности плодова и традиционалних производа ABTS+ методом	44
10. Биолошка активност екстраката листова и плодова	45
10.1. Антимикробна активност	45
10.2. Антиканцерогена активност	46
11. Испитивање генетичке варијабилности природних популација дивље малине и неколико сорти питоме малине применом молекуларних маркера	47
11.1. Биљни материјал	47
11.2. Изолација ДНК и AFLP анализа	48
11.3. Статистичка анализа података	50

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА 53

1. Преглед распрострањења и ценобиотичке припадности дивље малине	53
2. Етноботаничка истраживања	60
3. Анализа морфолошких карактеристика	76
4. Анализа анатомских карактеристика	81
5. Фитохемијска испитивања	91
5.1. Количина укупних фенолних једињења у екстрактима листова и плодова ..	93
5.2. Количина флавоноида у екстрактима листова и плодова	94
5.3. Количина танина у екстрактима листова и плодова	94

5.4. Количина антоцијанина у екстрактима листова и плодова	95
5.5. Резултати испитивања антиоксидативне активности DPPH методом	95
5.6. Статистичка обрада фитохемијских резултата	97
6. Квалитет плодова и традиционалних производа	101
7. Испитивање биолошке активности екстракта листова и плодова	106
7.1. Антимикробна активност	106
7.2. Антикancerогена активност	108
8. Генетичка варијабилност природних популација дивље малине и неколико сорта гајене малине	114
ОПШТА ДИСКУСИЈА	128
ЗАКЉУЧЦИ	135
ЛИТЕРАТУРА	137
ПРИЛОЗИ	160

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

ABTS – 2,2' - азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

ANOVA – анализа варијансе

AOA – антиоксидативна активност

ATCC – American Type Culture Collection

BAPS – Бајесова анализа структуре популације

BHT – butylated hydroxytoluene

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – диметил сулфоксид

DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил

DTT – дитиотреитол

dw – сува маса

fw – свежа маса

GAE – еквивалент галне киселине

GPS – глобални позициони систем

IBD – изолација на бази удаљености

ITS – Internal Transcribed Spacer

MBC – минимална бактерицидна концентрација

MIC – минимална инхибиторна концентрација

ORAC – Oxygen radical absorbance capacity

PBS – фосфатни пуфер

PCA – анализа главних компоненти

PCR – Polymerase chain reaction

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

rpm – (*eng. rotations per minute*) ротације по минути

Ru – рутин

SPSS – статистички софтвер

SSR – Simple Sequence Repeat

t/ha – тона по хектару

TCA – трихлор сирћетна киселина

TTC – садржај укупних танина

UV – ултравиолетно зрачење

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

ЈЗС – Југозападна Србија

ЈИС – Југоисточна Србија

ЛИСТА СЛИКА

Слика 1.	<i>Rubus laciniatus</i> W. – а) хабитус б) млади листови	4
Слика 2.	<i>Rubus idaeus</i> L. – хабитус.....	6
Слика 3.	<i>Rubus idaeus</i> L. – лист.....	6
Слика 4.	Популација дивље малине (<i>Rubus idaeus</i> L.) на природном станишту	6
Слика 5.	Јединка дивље малине (<i>Rubus idaeus</i> L.) у фази сазревања плодова	7
Слика 6.	Структура флавоноидног молекула	10
Слика 7.	Структура елагитанина	11
Слика 8.	Структура малина кетона	12
Слика 9.	Мапа истраживаних локалитета (ЈЗС: 1 – Студена планина; 2 – Жељин; 3 –Гоч; 4 – Голија; 5 – Копаоник; ЈИС: 6 – Стара планина; 7- Озрен; 8 – Ртањ; 9 – Власинска висораван)	30
Слика 10.	Производња и сакупљање лековитог биља у Србији: црвено – гајење лековитог биља; жуто – сакупљање дивљих биљака; зелено – зоне које су богате лековитим биљем које се спорадично сакупља	64
Слика 11.	Попречни пресек листа дивље малине	86
Слика 12.	Neighbor joining дрво сорти малине подржано од стране јединки дивље малине.....	119
Слика 13.	Генетичка структура популација дивље малине и сорти добијена из Бајесове анализе у BAPS-у: (А) Кластероване јединки укључујући сорте, (Б) Кластероване јединки сорти, (В) Просторно кластероване јединки без сорти	120
Слика 14.	Изолатија на основу удаљености (IBD) и изолација на основу надморске висине (IBA) популација дивље малине са простора Србије. Парцеле једноставних и парцијалних Мантелових тестова који показују односе између (А) географске и генетичке удаљености, (Б) надморске висине и генетских удаљености, и (В) резидуалне надморске висине и генетских удаљености узимајући у обзир географске раздаљине међу седам популација дивље малине.....	123

ЛИСТА ТАБЕЛА

Табела 1.	Назив подродова и број врста у оквиру рода <i>Rubus</i>	2
Табела 2.	Врсте подрода <i>Idaeobatus</i> према Focke-у.	5
Табела 3.	Класе фенолних једињења у биљкама	10
Табела 4.	Географски положај истраживаних локалитета	26
Табела 5.	Климатски параметри истраживаних локалитета	28
Табела 6.	Географска позиција, број испитаника, број домаћинстава и тип станишта на истраживаним подручјима	31
Табела 7.	Демографске карактеристике испитаника, укупан узорак N = 93	34
Табела 8.	Географска позиција испитиваних локалитета	35
Табела 9.	Популације врсте <i>R. idaeus</i> укључене у AFLP анализу	48
Табела 10.	Употреба дивље малине на истраживаним локалитетима у народној медицини и у исхрани	61
Табела 11.	Веза између демографских карактеристика испитаника и испитиваних подручја (Fisher тест)	62
Табела 12.	Повезаност између употребе различитих делова биљке и изабраних променљивих на бази Fisher – овог теста	63
Табела 13.	Анализа података употребе листа дивље малине у народној медицини	65
Табела 14.	Веза између употребе листова дивље малине и подручја истраживања (Fisher тест) ...	69
Табела 15.	Анализа употребе плодова дивље малине у традиционалној производњи хране и пића	72
Табела 16.	Веза између употребе плодова дивље малине и локалитета или макролокалитета на бази Fisher – овог теста	74
Табела 17.	Вредности морфолошких параметара јединки из различитих популација (cm)	77
Табела 18.	Једнофакторијална анализа варијансе праћених морфолошких особина популација дивље малине	79
Табела 19.	Статистичка зависност морфолошких параметара од географског положаја и надморске висине	81
Табела 20.	Анализа анатомских параметара листа дивље малине из различитих популација (μm)..	83
Табела 21.	Анализа варијансе анатомских карактеристика врсте <i>Rubus idaeus</i>	87
Табела 22.	Статистичка зависност анатомских параметара од географског положаја и надморске висине	90
Табела 23.	Садржај укупних фенола (mg GA g^{-1} екстракта), концентрација флавоноида (mg Ru g^{-1} екстракта), танина (mg mL^{-1} екстракта), укупних антоцијанина ($\mu\text{g mL}^{-1}$ екстракта), и антиоксидативна активност изражена у IC_{50} вредностима ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	92
Табела 24.	R коефицијент корелације и R^2 коефицијент детерминације	97

Табела 25.	Статистичка зависност фитохемијских параметара од географског положаја и надморске висине	100
Табела 26.	Параметри квалитета плодова и антиоксидативна активност	101
Табела 27.	Анализа квалитета различитих врста традиционалних производа	105
Табела 28.	Антимикробна активност: минимална инхибиторна концентрација (MIC) и минимална бактерицидна концентрација (MBC) метанолних екстраката листова и плодова врсте <i>Rubus idaeus</i> (mg mL ⁻¹)	108
Табела 29.	Pearson-ов коефицијент корелације антиканцерогене активности и фитохемијских параметара метанолних екстраката листова и плодова	113
Табела 30.	Генетички диверзитет седам дивљих популација са простора Србије и групе сорти на бази AFLP маркера	115
Табела 31.	AMOVA анализа за поделу AFLP разноликости дивље малине	121

ЛИСТА ГРАФИКОНА

Графикон 1.	Калибрациона права за прерачунавање вредности укупне количине фенолних једињења	39
Графикон 2.	Калибрациона права за прерачунавање вредности количине флавоноида	40
Графикон 3.	Употреба сувих листова дивље малине у лековите сврхе на простору ЈЗС и ЈИС	67
Графикон 4.	Разлике у употреби листа дивље малине на истраживаним подручјима	68
Графикон 5.	Употреба плодова малине као хране и напитака	73
Графикон 6.	Разлике у употреби плодова дивље малине на подручју ЈЗС и ЈИС	74
Графикон 7.	Анализа главних компоненти морфолошких особина популација дивље малине	80
Графикон 8.	Анализа главних компоненти анатомских особина листа популација дивље малине...	88
Графикон 9	Утицај биоклиматских фактора на испитиване анатомске особине	89
Графикон 10.	Анализа главних компоненти анализираних секундарних метаболита екстарката листова популација дивље малине	98
Графикон 11.	Анализа главних компоненти секундарних метаболита екстарката плодова популација дивље малине	99
Графикон 12.	Антиканцерогена активност метанолних екстраката листова популација дивље малине (А) $IC_{50}/24\text{ h}$; (Б) $IC_{50}/48\text{ h}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	110
Графикон 13.	Антиканцерогена активност метанолних екстраката плодова популација дивље малине (А) $IC_{50}/24\text{ h}$; (Б) $IC_{50}/48\text{ h}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	111
Графикон 14.	PCoA на бази Dice-ове матрице удаљености међу јединкама које припадају дивљим популацијама и седам сорти (C1 – „Mekeer“, C2 – „Willamette“, C3 – „Polka“, C4 – „Polana“, C5 – „Loganberry“, C6 – „Tayberry“, C7 – „Black Jewel“)	117
Графикон 15.	Neighbor-net дијаграм на бази Нејове генетичке удаљености између седам популација дивље малине	118

ИЗВОД

У циљу увођења нових сорти малине, као водеће воћне врсте у погледу извоза, неопходно је детаљно упознавање са популацијама дивље малине, како би се потенцијално искористила као ресурс за процесе селекције и оплемењивања. Предмет спроведених истраживања јесу девет популација дивље малине (*Rubus idaeus*) са простора Србије. Истраживани локалитети припадају двама већим просторним групама (макролокалитетима – југозападна и југоисточна Србија) и двама висинским групама (планинске популације – локалитети испод 1000 m надморске висине и субалпијске популације – локалитети изнад 1000 m надморске висине). Спроведена истраживања имала су следеће циљеве: евидентирање и очување знања о традиционалној употреби дивље малине; евидентирање и анализа станишта дивље малине, испитивање варијабилности унутар и између истраживаних популација врсте поређењем морфолошких и анатомских особина; анализа фитохемијских података на нивоу главних примарних и секундарних метаболита у екстрактима листа и плода; испитивање биолошке активности (антимикробна и антиканцерогена) екстраката листа и плода; утврђивање степена генетичке варијабилности употребом ALFP маркера; утврђивање варијабилности између популација у зависности од географског положаја и надморске висине са етноботаничког, морфоанатомског, фитохемијског и генетичког аспекта. Дивља малина је распрострањена широм Србије, углавном у брдским и планинским пределима, где се среће у различитим биљним заједницама. Најмање је заступљена у зељастим заједницама (има је у 5 ливадских заједница), док је најприсутнија у буковим заједницама (у преко 150). Веома је честа на стаништима четинара (у стотинак заједница), и то у заједницама у којима су едификатори јела, смрча, борови и клека. Етноботаничко истраживање је подразумевало прикупљање података од локалног становништва путем упитника о употреби дивље малине. Укупно је интервјуисано 93 испитаника. Добијени резултати су показали да се малина користи широм Србије као лековита биљка и у исхрани. Забележени су нови подаци о употреби листова малине у медицинске сврхе, пре свега за лечење гинеколошких обољења, затим упале простате као и упале ока. Плодови малине се користе у исхрани, као и за припрему различитих традиционалних производа (сок, слатко, ликер, за припрему посластица). Јасна разлика у употреби листова и плодова је уочена у

зависности од макролокалитета. Морфолошка истраживања су делом спроведена на терену (висина и обим жбунова), а делом на хербарском материјалу (дужина и ширина листова). Анатомска истраживања листа су вршена на трајним микроскопским препаратима. Резултати су показали да постоји значајна разлика између истраживаних популација у морфологији и анатомији, да надморска висина више утиче на анатомске разлике него географски положај, као и да испољене морфолошке и анатомске разлике у великој мери зависе од климатских фактора. Испитивањем фитохемијског састава се показало да су екстракти листова и плодова дивље малине богат извор секундарних метаболита, па самим тим имају и релативно високу антиоксидативну активност. Виши садржај укупних фенолних једињења, флавоноида, танина и антоцијанина се налази у екстрактима. Надморска висина се показала као фактор који значајно утиче на садржај секундарних метаболита. Резултат испитивања биолошке активности је да су екстракти листова најделотворнији против бактерије *Escherichia coli*. Екстракти листова дивље малине са Студене планине су испољили благу антиканцерогену активност према канцеру дебелог црева. За разлику од листова, плодови нису показали антиканцерогену активност. Испитивање квалитета плодова и традиционалних производа је вршено кроз неколико параметара (садржај витамина Ц, садржај укупних шећера и органских киселина). Плодови дивље малине са простора Србије су изразито богати витамином Ц. Релативно висока количина витамина Ц остаје и у производима, с обзиром на технологију припреме и термолабилност аскорбинске киселине. Испитивањем генетичке варијабилности употребом ALFP маркера дошло се до података да је популација дивље малине са Озрена најстарија и најдуже изолована. Највећи молекуларни диверзитет се налази унутар дивљих популација, што указује на стабилност услова животне средине у којима се развијају. Укључивањем гајених сорти у ALFP анализу, дошло је до њиховог јасног раздвајања од дивљих популација услед смањења генетичке варијабилности и хомозиготизације гена код сорти. И код ових анализа, надморска висина се показала као фактор који значајно утиче на раздвајање популација (34,7% генетичког диверзитета се може приписати разликама у надморској висини). На основу свих добијених резултата произилази да дивља малина представља веома важан ресурс (са нутритивног, и фитофармаколошког становишта, али и као дивљи сродник гајене малине) и врста коју је потребно заштити и корисити у процесима селекције и оплемењивања у стварању нових сорти са унапређеним особинама.

SUMMARY

In order to create new varieties it is necessary to have a detailed introduction to wild raspberry populations in order to potentially be used as a resource for selection and breeding processes. The subject of the conducted research are nine populations of wild raspberry (*Rubus idaeus*) from the territory of Serbia. The research sites belong to two larger spatial groups (macrolocalities – southwestern and southeastern Serbia) and two altitude groups (mountain populations – sites below 1000 meters above sea level and subalpine populations - localities above 1000 meters above sea level). The research carried out had the following aims: recording and preservation of knowledge about the traditional use of wild raspberry; recording and analysis of wild raspberry habitats, testing of variability within and among investigated populations of species by comparing morphological and anatomical traits; analysis of phytochemistry data at the level of main primary and secondary metabolites in leaf and fetal extracts; testing of biological activity (antimicrobial and anticancerogenic) extracts of leaves and fruits; determining the degree of genetic variability using ALFP markers; determining the variability among the populations depending on the geographical position and altitude from the ethnobotanic, morphoatomic, phytochemical and genetic aspects. Wild raspberries are distributed throughout Serbia, mainly in the mountainous and mountainous regions, where they present in diverse plant communities. The least is represented in herbaceous (there are in 5 meadow communities), while the most present is in beech communities (in over 150). It is very common in the habitat of conifers (in a hundred communities), in communities where fir, spruces, pines and juniper are edifiers. Ethnobotanical research involved the collection of data from the local population through a questionnaire on the use of wild raspberry. A total of 93 people were interviewed. The obtained results showed that raspberries are used throughout Serbia as a medicinal plant and in nutrition. New data on the use of raspberry leaves for medical purposes were recorded, primarily for the treatment of gynecological diseases, then inflammation of the prostate and inflammation of the eye. Raspberry fruits are used in eating, as well as for preparing various traditional products (juice, sweet, liqueur, for the preparation of sweets). A clear difference in the use of leaves and fruits was observed depending on the macrolocation. Morphological investigations were partly carried out on the outfield (height and extent of the bushes), and partly on the herbaric material (length and width of the leaves). Anatomical leaf research was performed on permanent microscopic

preparations, light microscopy. The results showed that there is a significant difference between the investigated populations in the morphological and anatomical sense, that the altitude affects the anatomical differences more than the geographical position, and that the morphological and anatomical differences are highly dependent on climatic factors. The study of the phytochemical composition showed that the extracts of leaves and fruits of wild raspberry are a rich source of secondary metabolites (total phenols, flavonoids, tannins and anthocyanins), and therefore have relatively high antioxidant activity. The higher content of total phenols, flavonoids, tannins and anthocyanins is found in leaf extracts than fruits. Altitude proved to be a factor that significantly influences the content of secondary metabolites. The result of the biological activity test is that leaf extracts are the most effective against *Escherichia coli*. The extracts of wild raspberry leaves from Studena Mountain showed mild anticancer activity to the colon cancer. Unlike leaves, the fruits did not show anticancer activity. The testing of the quality of fruits and traditional products was done through several parameters (content of vitamin C, content of total sugars and organic acids). Fruits of wild raspberry from the territory of Serbia are rich in vitamin C. The relatively high concentration of vitamin C remains in products, given the preparation technology and the thermolability of ascorbic acid. By investigating genetic variability using ALFP markers, it has been found that the population of wild raspberry from Ozren is the oldest and longest isolated. The greatest molecular diversity lies within the wild populations, which indicates the stability of the environment in which they are developing. Incorporating cultivated varieties into ALFP analysis, there has been a clear separation of them from wild populations due to exhaustion of genetic variability and homozygosity of genes in varieties. Even with these analyzes, the altitude has proven to be a factor that significantly affects the separation of populations (34,7% of genetic diversity can be attributed to differences in altitude). Based on all the results obtained, wild raspberries represent a very important resource (from a nutritive, and a phytopharmacological point of view, but also as a wild relative of raspberries) and a species that needs to be protected and used in the selection and breeding processes in the creation of new varieties with improved properties.

УВОД

1. Род *Rubus*: диверзитет, таксономски положај, ботаничке особине и значај

Род *Rubus* припада фамилији Rosaceae у оквиру које су присутне различите животне форме и то: дрвенасте биљке, жбунови, шибље и зељасте вишегодишње, ређе једногодишње биљке (Славинић, 1972 и Flora Europea). Фамилија Rosaceae обухвата око 90 родова и 3000 врста (Potter и сар., 2007). Међу ауторима не постоји јединствен став о класификацији унутар фамилије. Најшире је прихваћена она коју је дао Schulze-Menz (1964), базирана на типу плодова, по којој је фамилија подељена на четири подфамилије (Rosoideae, Prunoideae, Spiraeoideae и Maloideae), а оне на трибусе и субтрибусе. Takhtajan (1997) укључује неке од првих молекуларних истраживања у класификацију и дели фамилију на 12 подфамилија. Класификацијом фамилије Rosaceae бавио се Kalkman, чија су истраживања објављена постхумно од стране Kubitzki (Kalkman, 2004). По Kalkman-у, фамилија Rosaceae је подељена само на трибусе.

Истраживања су показала да је број хромозома бољи показатељ за класификацију фамилије Rosaceae у односу на класификацију према типу плодова (Potter и сар., 2007). На основу тих истраживања, фамилија Rosaceae је подељена на три подфамилије и то Rosoideae (која укључује независне родове *Filipendula*, *Rubus* и *Rosa*, као и три трибуса – *Sanguisorbeae*, *Potentilleae* и *Colurieae*), *Dryadoideae* (садржи четири рода која улазе у актиноризу – *Dryas*, *Chamaebatia*, *Purshia* и *Cercocarpus*) и *Spiraeoideae* (садржи независтан род *Lyonothamnus* и седам трибуса – *Kerrieae*, *Osmaronieae*, *Amygdaleae*, *Sorbarieae*, *Spireae*, *Rugeae* и *Rutinae*). Дакле, по овој класификацији, сви родови који су раније били укључени у *Amygdaloideae* и *Maloideae* су сврстани у *Spiraeoideae*. Такође, Potter и сар. (2007) препознају један супертрибус у оквиру подфамилије Rosoideae (*Rosodae*) и два у оквиру подфамилије Spiraeoideae (*Kerriodae* и *Pyrodae*).

Род *Rubus* је међу најкомплекснијим таксономским групама што је углавном последица хибридизације, полиплоидије и апомиксиса (Howarth и сар., 1997). Сврстан је у

подфамилију Rosoideae (Potter и сар., 2007). То је један од најразноврснијих биљних родова, садржи 12 подродова (Jennings, 1988), са око 750 врста (Robertson, 1974; Lu, 1983; Gu и сар., 1993; Thompson, 1995), а према неким и неколико хиљада врста (Jennings, 1988). Највећи подродови су *Idaeobatus* (малине, 117 врста), *Malachobatus* (115, првенствено азијских врста) и *Rubus* (= *Eubatus*; купине – 132 врсте). Само три, од преосталих девет подродова, имају више од шест врста (Alice и Campbell, 1999). У Табели 1 дат је преглед подродова и броја врста у оквиру рода *Rubus* према класификацији коју је дао Focke (1910, 1914).

Табела 1. Назив подродова и број врста у оквиру рода *Rubus*

Редни број	Назив подрода	Број врста
1.	Anoplobatus (Focke) Focke	6
2.	Chamaebatus (Focke) Focke	5
3.	Chainaemorus (Hill.) Focke	1
4.	Comaropsis (Rich.) Focke	2
5.	Cylatis (Raf.) Focke	14
6.	Dalibarda (L.) Focke	5
7.	Dalibardastrum Focke	4
8.	Idaeobatus (Focke) Focke	117
9.	Lampobatus Focke	10
10.	Malachobatus (Focke) Focke	115
11.	Orobatus Focke	19
12.	Rubus L. (= Eubatus Focke)	132

Већина врста рода *Rubus* су вишегодишње биљке, са жбунастом усправном или полеглом животном формом. Углавном су листопадне врсте, са неколико зимзелених представника (Daubenу, 1996). Збирни плодови су изграђени од бројних коштуница сакупљених око појединачне, сушне цветне ложе. У центру се налази једно семе. Коштунице су причвршћене за цветну ложу, која може и не мора да остане када се плод убере (Moore и Skirvin, 1990).

Нативне врсте рода *Rubus* имају широку дистрибуцију, од тропских до субарктичких региона (Thompson, 1995). Распрострањене су на шест континената, и то на надморским висинама од нивоа мора до око 4500 m (Gu и сар., 1990). Скоро све су космополити и најчешће су заступљене у северној хемисфери, а у тропским областима се срећу у планинским регионима (Славнић, 1972). Азија је највећи центар распрострањења врста овог рода – само у Кини је заступљено преко 200 врста, углавном из подродова *Idaeobatus* и *Malachobatus* (Thompson и Zhao, 1993).

Подрод *Idaeobatus* обухвата нешто више од 100 врста које су према Focke-у сврстане у девет секција. Највећи број врста је заступљен на простору Азије, Аустралије и на острвима у Тихом океану. Неколико врста се јавља у Африци и на Мадагаскару, као и на острвима Тихог океана. На простору централне Америке присутно је неколико врста, док се у Европи јавља само једна, дивља малина (*Rubus idaeus*). У оквиру овог подрода се налазе врсте које карактерише највећа варијабилност од свих подродова рода *Rubus* (Naruhashi и сар., 2002). Већина представника су планинске врсте које се ретко срећу на надморским висинама испод 1000 m. Врсте овог подрода су углавном усправни жбунови. Листови су перасти, састављени од 3 до 5 режњева, ретко су прости. При основи лисне дршке налазе се залисци. Плодови су збирне коштунице, које када сазре, постају лабаве и лако се одвајају од цветне ложе (Tomlik-Wyremblewska и сар., 2004).

1.1. Под *Rubus* у Србији

На територији Србије род *Rubus* је заступљен са 11 врста – *Rubus saxatilis* L., *Rubus idaeus* L., *Rubus plicatus* L., *Rubus candicans* L., *Rubus discolor* L., *Rubus ulmifolius* L., *Rubus canescens* L., *Rubus hirtus* L., *Rubus caesius* L., *Rubus glandulosus* L. и *Rubus laciniatus* W. (Славнић, 1972; Krivošej и сар., 2018).

Највећи број представника рода *Rubus* у Србији спада у подрод *Rubus*. Имају углавном жбунасту животну форму. Листови су најчешће перасто или прстасто сложени. Састоје се од 3 до 7 листића. Плод је збирна коштуница. Распрострањени су по брдским и планинским пределима Србије, али се могу срести и на пропланцима, као и поред путева и њива. Посебно је интересантан налаз врсте *Rubus laciniatus* W. (Слика 1). Ово је нова врста на територији Србије и Балканског полуострва која је пронађена у току истраживања

серпентинских терена у долини Ибра (Krivošej и сар., 2018). На простору Европе среће се још у Белгији, Великој Британији, Чешкој, Данској, Финској, Француској, Немачкој, Ирској, Холандији, Норвешкој, Шведској, Пољској, Италији, Румунији, Шпанији, Швајцарској (Lauber и Wagner, 2007; Kurtto и Weber, 2009). На Балкану, врста *R. laciniatus* је први пут пронађена у околини села Рвати, 3 km од Рашке, на обронцима планине Копаоник, од стране Krivošej и сар., 20. јула 2014. године.



Слика 1. *Rubus laciniatus* W. – а) хабитус б) млади листови

2. *Rubus idaeus* – морфоанатомске особине, еколошке карактеристике и распрострањење

Подрод *Idaeobatus* обухвата врсте које су распрострањене у Северној хемисфери, углавном у Азији, Европи, Африци и Северној Америци (Ballington и сар., 1993). Од свих представника овог подрода, само 17 има јестиве плодове. Најзначајније за програме оплемењивања и оне које се најчешће гаје (Eu и сар., 2008) су следеће три врсте: црвена малина (*Rubus idaeus* L.) са подврстама европска црвена малина (*R. idaeus* subsp. *vulgatus* Arrhen.) и америчка црвена малина (*R. idaeus* subsp. *strigosus* Michx.), црна америчка малина (*R. occidentalis* L.) и пурпурна (љубичаста) малина (*R. neglectus* Pesk.). У Табели 2 дат је приказ најзначајнијих врста из подрода *Idaeobatus*, као и њихово порекло.

Табела 2. Врсте подрода *Idaeobatus* према Focke-у

Врста	Српски назив	Порекло
1. <i>Rubus idaeus</i> L.	Дивља малина	Источна Азија, Европа, Северна Америка
a) <i>R. idaeus</i> subsp. <i>vulgatus</i> Arrhen.	Европска црвена малина	Европа, Азија
b) <i>R. idaeus</i> subsp. <i>strigos</i> Michx.	Америчка црвена малина	Северна Америка, Азија
2. <i>R. articus</i>	Арктичка малина	Арктик
3. <i>R. occidentalis</i> L.	Црна малина	Северна Америка
4. <i>R. neglectus</i> Peck.	Пурпурна малина	Северна Америка
5. <i>R. leucodermis</i> Torr. Et. Gr.	Малина беле коре	Северна Америка
6. <i>R. odoratus</i> L.		Северна Америка
7. <i>R. spectabilis</i> Pursh.		Северна Америка
8. <i>R. phelicolasius</i> Maxim		Јапан, Кина
9. <i>R. ellipticus</i> Smith	Златна зимзелена малина	
10. <i>R. illecebrosus</i> Focke		Азија
11. <i>R. kuntzeanus</i> Hemsl	Кинеска малина	Кина
12. <i>R. niveus</i> Thumb		Централна и западна Кина
13. <i>R. coreanus</i> Miq	Корејска малина	Кореја, Кина
14. <i>R. parvifolius</i> Nutt.		Азија
15. <i>R. macraei</i> A. Gray akala	Акала	Хаваји
16. <i>R. haqaiensis</i> A. Gray		
17. <i>R. glaucus</i> Benth.		Јужна Америка

Стабло дивље малине (Слика 2) је високо 100-150 cm, усправно, ваљкасто, пепељасто, често снабдевано многобројним трњићима. Лишће је перасто сложено и састоји се од 5-7 листића или некад трочлано, одозго глатко, одоздо бело длакаво (Слика 3). Листови су дуги од 5-12 cm. Терминални листић је јајаст или дугуљасто јајаст, понекад плитко усечен, срцаст. Залисци су кончасти или длакави. Цветови су двополни, оборени наниже, петочлани, скупљени у цимозним цвастима. Чашични листићи су узани, обрнуто јајасте, бели, голи. Прашници су усправни, бели, голи. Плод је збирна коштуница (Слика 5), црвене или наранџасте боје (Славнић, 1972).



Слика 2. *Rubus idaeus* L. – хабитус



Слика 3. *Rubus idaeus* L. – лист



Слика 4. Популација дивље малине (*Rubus idaeus* L.) на природном станишту



Слика 5. Јединка дивље малине (*Rubus idaeus* L.) у фази сазревања плодова

У оквиру подрода *Idaeobatus* налази се и дивља малина која је распрострањена у умереном климатском подручју Европе и Азије (Zhang и сар., 2011). Природно је заступљена на влажним стаништима изнад 1000 m надморске висине (Sekic и Ozgen, 2010), обично поред путева, на ободима шума и шумским прогалама (Graham и сар., 2002). На територији Европе, самим тим и Србије, самоникло расте само једна врста и то дивља малина – *Rubus idaeus* L. Распрострањена је у четинарским, мешовитим и жбунастим биљним заједницама (Lakušić и сар., 2005) планинског и алпијског појаса (централна, западна, југо-западна, источна и југо-источна Србија). Расте по шумама, утринама или пропланцима (Булатовић, 1972). Јединке дивље малине се јављају у групама (Слика 4), на површини од око 10 m² и удаљене су од следеће групе стотинак метара, па до 10 km (Marshall и сар., 2001). Еколошки услови у којима се јављају биљне популације битно утичу на фенотипске особине, па тако и на фенотипске особине дивљих малина. Биљке са северних експозиција су нижег раста, са мањим обимом стабла и мање цветова, него што је то случај са јединкама које расту на јужним експозицијама (Marshall и сар., 2001).

3. Генетичка варијабилност рода *Rubus* и врсте *R. idaeus*

У ботаници, молекуларне методе се употребљавају за процену генетичке сродности или разноликости. Постоје две врсте молекуларних метода и то: биохемијски и молекуларни маркери. ДНК маркери се углавном заснивају или на употреби рестрикционих ензима који препознају и секу специфичне кратке секвенце ДНК или на ланчаној реакцији полимеразе (PCR). Технике базиране на PCR-у укључују Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Internal Transcribed Spacer (ITS) регион, Simple Sequence Repeats (SSR) или технику микросателита (Castillo, 2006), као и региони пластидне ДНК. Избор маркера зависи од циљева студије, техничке стручности и оперативних средстава. Први избор многих таксонома приликом одабира молекуларних маркера су AFLP маркери (Rahimmalek и сар., 2009; Moghaddam и сар., 2011). Први корак AFLP протокола подразумева фрагментацију ДНК са два рестрикциона ензима, ретким секачем као *EcoRI* и честим секачем попут *MseI*. Адаптери са двоструком везом (дс) су повезани са крајевима ДНК фрагмента како би се произвела матрица ДНК за двостепени процес амплификације. Прајмери су дизајнирани тако да садрже секвенце које су комплементарне онима од адаптера и места рестрикције, и заједно се са једним (у првом кораку) до три селективне базе (у другом кораку) додају на њиховом 3' крају. Употреба селективних база омогућава амплификацију само подскупа ограничених фрагмената. Полиморфизам се открива након раздвајања амплификованих фрагмената ДНК електрофорезом на секвенционом гелу и визуелизованим сребрним сјајем, радиоактивном или флуоресцентном детекцијом. Генерисан је велики број група које олакшавају откривање полиморфизама (Gupta и сар., 1999). AFLP открива висок ниво полиморфизма и има висок индекс маркера или индекс разноликости (Russell и сар., 1997). Употребом AFLP маркера за 51 узорак из рода *Rubus* утврђено је укупно 229 трака, са величином од 30 до 330 базних парова и 91,6% полиморфизма (Marulanda и сар., 2007).

Основни број хромозома у оквиру рода *Rubus* је седам (Castillo, 2006). Полиплоидија и хибридизација су најприсутније у оквиру овог рода, у односу на све остале родове фамилије Rosaceae (Alice и сар., 1999). Нивои полиплоидије се крећу од диплоидног ($2n = 2x = 14$) до ($2n = 14x = 98$) (Moore, 1984). Хибридизација у оквиру рода

Rubus се углавном јавља између блиско сродних врста (Kraft и сар., 1995) и на неким нивоима између подродова (Alice и сар., 1997). Већина малина су диплоидне, изузев неколико триплоидних и тетраплоидних, за разлику од купина чији се број хромозома креће од $2n = 2x = 14$ до $2n = 12x = 84$ (Daubeny, 1996). Хибриди као што су „Loganberry“, „Tayberry“, „Sunberry“, „Tummelberry“, „Fertodi Botermo“ и „Phenomenal“ су произведени од октаплоидних ($2n = 6x = 56$) и тетраплоидних ($2n = 4x = 28$) врста малина (Jennings, 1988). Код малина је описано око 60 главних особина које се могу искористити за стварање нових варијетета са побољшаним карактеристикама (Jennings, 1988; Graham и сар., 2003). Може се рећи да *R. idaeus* има потенцијал да се употребљава као модел врста за читаву фамилију Rosaceae с обзиром да је диплоидна ($2n=2x=14$) и има веома мали геном (275 Mb).

4. Фитохемијске карактеристике врсте *Rubus idaeus*

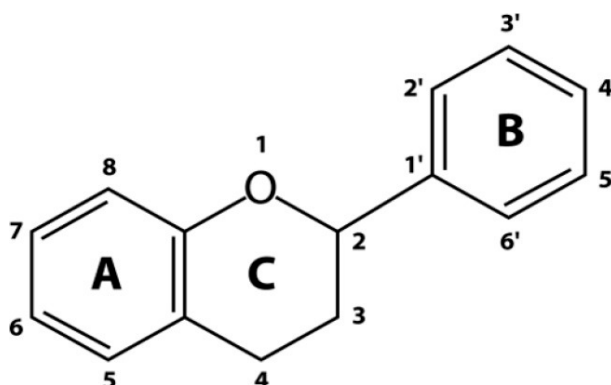
Природни антиоксиданси се као активне материје јављају у свим биљним деловима. Антиоксидативна једињења припадају различитим хемијским класама, као што су каротеноиди, витамини, фенолне киселине, флавоноиди, глутатиони и други секундарни метаболити (Larson, 1988). Антиоксидативни капацитет једињења из биљних ткива се приписује, пре свега, једињењима из групе фенола, као што су антоцијанини и различити флавоноиди (Сао и сар., 1997).

Фенолна једињења карактерише структура са ароматичним прстеном који садржи различит број хидроксилних група (Stanković и сар., 2012). Због постојања макар два кондензована фенолна прстена и велике хемијске разноврсности међу њима, једињења која припадају овој великој групи означавају се као „полифеноли“ (Balasundram и сар., 2006). Фенолна једињења се могу поделити у неколико класа као што је приказано у Табели 3. Имају јаку антиоксидативну активност захваљујући способности да „хватају“ слободне радикале или донирају водоникове атоме или електроне (Amarowicz и сар., 2004).

Табела 3. Класе фенолних једињења у биљкама

Класа фенолних једињења	Структура
Прости феноли	C_6
Фенолне киселине	C_6-C_1
Фенилсирћетне киселине	C_6-C_2
Фенилпропени, кумарини, хормони	C_6-C_3
Нафтохинони	C_6-C_4
Ксантони	$C_6-C_1-C_6$
Стилбени, антрахинони	$C_6-C_2-C_6$
Флавоноиди	$C_6-C_3-C_6$
Лигнани	$(C_6-C_3)_2$
Бифлавоноиди	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Лигнини	$(C_6-C_3)_n$
Кондезовани танини	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Највећа група биљних фенола су флавоноиди, који чине више од половине (преко 10000) фенолних једињења који се јављају код биљака (Harborne и сар., 1999). Њихова структуру (Слика 6) чине два ароматична фенил прстена, А и Б, и трећи хетероциклични прстен између њих (Ц) (Merken и Beecher, 2000).

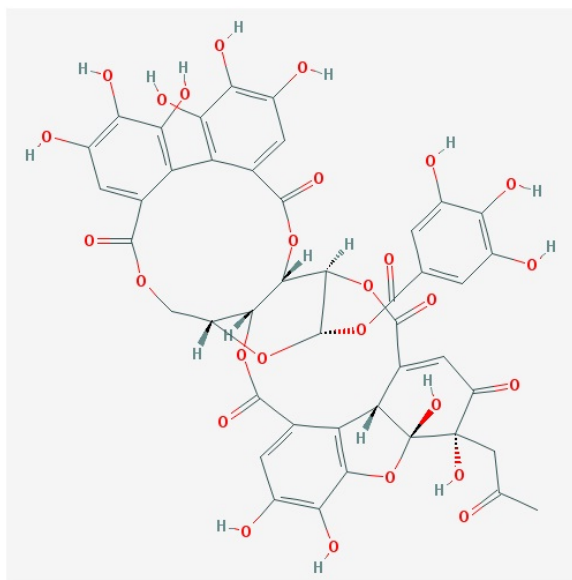


Слика 6. Структура флавоноидног молекула

Антоцијанини су најважнији пигменти васкуларних биљка, лако се растварају у поларним растварачима, дају интензивне боје цветовима и плодовима и имају битну улогу као носиоци антиоксидативне активности. Карактеришу се значајном практичном применом јер спречавају појаву многих кардиоваскуларних и нервних обољења, као и појаву дијабетеса и канцера (Konczak и Zhang, 2004).

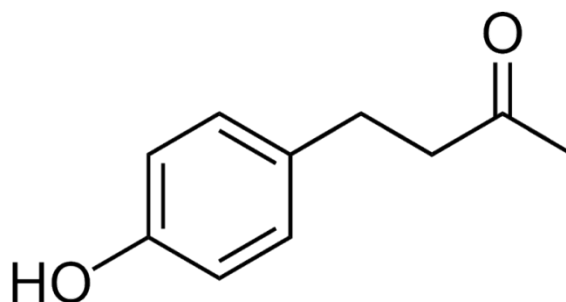
Танини су важна компонента бобичастог воћа. Постоје две форме: хидролизирајући и кондензовани. Играју битну улогу у давању сензорних особина воћу и производима од воћа. Одговорни су за укус и промену боје воћа и воћних сокова. Пошто су познати ензимски инхибитори, одговорни су за смањење нутритивне вредности хранљивих пеоизвода. У плодовима који су богати антоцијанинима, танини повезују антицијанине у форму коополимера и преводе их у стабилан облик. Танини се често срећу код плодова јагода, малина и купина (Szajdek и Borowska, 2008).

Елагитанини (Слика 7) су хидросолубилна врста полифенолних једињења велике молекулске масе. Имају способност таложења протеина и алкалоида (Santos-Buelga и Scalbert, 2000). То су естри хексахидроксидифеничне киселине и полиола (шећерних алкохола) (Haslam, 1989). Најзаступљенији су у црвеном воћу, као што су малине, купине и јагоде (Clifford и Scalbert, 2000).



Слика 7. Структура елагитанина

Главно ароматично једињење у плодовима малине је такозвани малина кетон (4-(4- hydroxyphenyl)-2-butanone) (Слика 8). Због пријатне ароме, малина кетон се користи у прехранбеној индустрији, пре свега као додатак у кондиторским производима и за ароматизовање различитих врста пића (Beekwilder и сар., 2007). Такође, користи се као додатк козметичким производима, због позитивног ефекта на еластичност коже, стимулације раста косе, а познат је и његов утицај на губитак телесне масе (Ulbricht и сар., 2013).



Слика 8. Структура малина кетона

Воће садржи много различитих антиоксидативних компоненти (Сао и сар., 1996). Антиоксиданси из воћа играју битну улогу у смањењу ризика од дегенеративних, кардиоваскуларних, онколошких и неуролошких обољења, као и различитих метаболичких поремећаја (Kalt и сар., 1999). У неким ранијим истраживањима (пре 2000 године) бобичастог воћа, највише података је дато за антиоксидативни капацитет различитих врста рода *Vaccinium* (Prior и сар., 1998), док су подаци за друге врсте у извесној мери оскуднији.

Испитивањима антиоксидативне активности биоактивних једињења различитих врста рода *Rubus* у последњих 15 година је посвећено више пажње. Оскудни су подаци који се односе на антиоксидативни потенцијал и биоактивне компоненте дивље малине у односу на гајене. Неопходна су детаљнија истраживања како би се добили свеобухватни подаци о оправданости употребе дивље малине као функционалне хране, као и значају примене у фармацеутској и прехранбеној и козметичкој индустрији (Gulcin и сар, 2011).

Малина садржи бројна фенолна једињења са потенцијалним позитивним утицајем на здравље (de Ancos и сар., 2000). Мало је података који се односе на фитохемијски састав листова врста рода *Rubus*. Постоји свега неколико студија. Највише истраживања хемијског састава листа, од свих представника рода *Rubus* је спроведено управо за врсту *Rubus idaeus*. 1921. године је изолована елагинска киселина из сока од малине, а 1929. Wehmer је анализирао квантитативно-квалитативни састав једињења у листовима малине и утврдио присуство магнезијум лактата, сукцинилне, галне и елагинске киселине. Thoms је 1931. године забележио присуство танина и различитих органских киселина у листовима малине (Patel и сар., 2004). Beckett је 1954. пронашао аскорбинску киселину у листовима, док Норре (1958) помиње флаване као компоненте листова малине (Patel и сар., 2004). Флавоноиди изоловани из листова малине су кверцетин-3- β -глукуронид и каемпферол-3- β -глукуронид (Ryan и сар., 1971; Mingsheng, 1994). Од елагитанина у листовима малине су заступљени ламбертианин Ц, ламбертианин Д, елагинска киселина и сангвин Н-6 (Okuda и сар., 1993; Tanaka и сар., 1993). Листови малине су нарочито богати у садржају танина (Marcasal, 1963; Okuda и сар., 1992).

Приказ концентрације флавоноида у листовима дивљих и култивисаних сорти малине је први пут испитан у истраживањима Gudej и Tomczyk (2004). Они су дошли до резултата који указују да су листови обе групе малина богати флавоноидима, као и елагинском киселином и танинима. Venskutonis и сар. (2007) су утврдили да су екстракти листова малине богати фенолним једињењима, као и да показују висок антиоксидативни потенцијал. Испитивањем фитохемијског састава екстраката листова култивисаних сорти малине са простора Србије бавили су се Pavlović и сар. (2016), при чему су дошли до резултата који указују на високу концентрацију полифенола, као и на значајну антиоксидативну активност. Постоје студије које показују да је фенолни састав листова такав да се листови малине могу препоручити као алтернативни извор биоактивних једињења (Ferlemi и Lamari, 2016).

С обзиром да су плодови малине широко заступљени у исхрани, више пажње је посвећено испитивању њиховог фитохемијског састава. Према Beekwilder и сар., (2005) малине су воће које садржи значајну количину антиоксидативних једињења. Заједно са витамином „Ц“, најодговорнија једињења за антиоксидативну активност су антоцијанини и елагитанини. Ово потврђује и неке претходне налазе до којих су дошли Wang и Lin

(2000). Они су пратили варирање антиоксидативне активности у плодовима купина, малина и јагода у зависности од фенолошке фазе. Подаци до којих су дошли указују да плодови малине показују највише ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) вредности у фази пуне зрелости. У свим плодовима, па и плодовима малине, током фазе умерене зрелости забележене су најниже ORAC вредности.

Kahkonen и сар. (2001), испитујући садржај фенолних једињења и њихову антиоксидативну активност код различитих врста бобичастог воћа, дошли су до података да су од фенола најзаступљенији елагитанини, што је потврђено и у каснијим студијама од стране Beekwilder и сар. (2005). Осим елагитанина, у плодовима малине су пронашли и знатне количине антоцијанина. Указали су на занимљив податак да су неки антоцијани (цијанидин-3-глукозид) присутни и у зеленим плодовима, док се други (цијанидин софорозид, пелагонидин) јављају искључиво кад се развије црвена боја. У сваком случају, количина антоцијанина значајно утиче на антиоксидативни капацитет плодова малине, што је такође потврђено у овој студији. Benvenuti и сар. (2004) су истраживали садржај полифенола, антоцијанина, аскорбинске киселине као и антиоксидативну активност више врста бобичастог воћа, између којих и малина. Резултати до којих су дошли указали су да малине имају најмање укупних полифенола, што је у контрадикторности са неким од претходних студија (Wang и Lin, 2000). Такође, вредности укупних антоцијанина и аскорбинске киселине су биле ниже у односу на неке од претходних истраживања (Rotundo и сар., 1998; Wang и Lin, 2000).

Wang и сар. (2009) су проучавали утицај светлости и зрелости плодова на садржај секундарних метаболита код малина. Они су дошли до података да светлост и стадијум зрелости значајно утичу на садржај фенолних једињења. Плодови који су убрани у стадијуму зрелости од 5% до 20%, никада не достижу количине шећера, органских киселина и фенолних једињења, као плодови који су убрани у пуној зрелости. Плодови истог стадијума зрелости, ако се држе под утицајем светлости, су показали више вредности растворљивих материја и ниже вредности слободних органских киселина, него они који се држе у мраку. Зрели плодови малине (100% зрелост), имају јачу антиоксидативну активност и више антоцијанина у поређењу са полузрелим стадијумом. На основу њихових истраживања види се да стадијум зрелости, као и еколошки услови значајно утичу на квантитет и квалитет секундарних метаболита у плодовима малине.

Поређење садржаја секундарних метаболита, растворљивих материја, киселости, количине аскорбинске киселине, као и антиоксидативне активности плодова дивље и питоме малине представљено је у раду Tosun и сар. (2009). Генерално, наведени аутори су дошли до закључака да дивљи екотипови малина имају више вредности свих тестираних параметара, чиме је доказана њихова потенцијална вредност као значајног извора природних антиоксиданаса и функционалне хране. Јасно је показана и веза између фенолних једињења и антиоксидативне активности – више фенолних једињења, виша антиоксидативна активност. Слични резултати су потврђени нешто касније од стране Sekic и Ozgen (2010), као и Mikulić-Petkovsek и сар. (2012). Овакви налази се могу искористити за стварање нових сорти са високим антиоксидативним потенцијалом, коришћењем дивљег екотипа као ресурса који ће помоћи у испуњавању данашњих трендова потрошача.

У ревијалном раду „Малине и људско здравље“ (Rao и Snyder, 2010) дат је добар приказ хранљивих материја и фитохемијски састав плодова малине. Малине садрже есенцијалне минерале, витамне, масне киселине као и влакна. Посматрајући садржај хранљивих материја, малине су добар избор здраве хране. Имају мало укупних калорија, доста влакана и преко 50% фруктозе од свих шећера па благотворно делују на садржај шећера у крви. У уљу од семенки малине налазе се велике количине (97,8%) незасићених масних киселина. Такође, висок је и садржај витамина Ц. На основу свега наведеног, малине се могу препоручити као додатак избалансираној исхрани, а полифеноли играју битну улогу у ублажавању штетног ефекта оксидативног стреса на ћелије, као и смањењу ризика од хроничних обољења. Фитохемијски састав листова и плодова дивље малине са простора Србије није познат, па је самим тим значај резултата који ће бити представљени у овој дисертацији већи.

5. Биолошка активност метаболита врста рода *Rubus* и *R. idaeus*

Испитивање биолошке активности воћа је доста заступљено, међутим на основу литературних података евидентиран је мали број студија које се конкретно баве проучавањем биолошке активности дивљих малина. На основу нешто већег броја истраживања која се баве фитохемијским саставом, може се претпоставити да активна једињења малине потенцијално имају биоактивну улогу у здрављу људи.

Постоји свега једна студија која се бавила испитивањем биолошке активности екстракта листова малине. Durgo и сар. (2012) су дошли до података који показују да водени екстракти листова малине поседују цитотоксични ефекат на ћелије карцинома грла и дебелог црева, при чему одговор ћелија зависи од времена инкубације, концентрације екстракта и врсте ћелија.

Rauha и сар. (2000) су у експерименталном истраживању антимикуробног потенцијала малине утврдили да матанолни екстракти плодова малине имају благу антибактеријску и антифунгалну активност, док дејство на квасце није утврђено. Од бактерија, на дејство метанолног екстракта плода малине најосетљивија је била *Bacillus subtilis* (ATCC 9372). Seeram и сар. (2006) су утврдили да са порастом концентрације екстракта расте инхибиција ћелијске пролиферације. Voivin и сар. (2007) су потврдили да екстракти плодова малине смањују пролиферацију канцерогених ћелија, као и да не постоји корелација између антиканцерогене и антиоксидативне активности. Према њиховим резултатима, иста врста воћа може имати добар антиканцерогени, али слабији антиоксидативни потенцијал.

Испитивањем антиканцерогене активности плодова купине и малине су се бавили Bowen-Forbes и сар. (2010). Подаци до којих су они дошли указују да хексански и етанолни екстракти плодова дивље малине показују благу антиканцерогену активност према тумору дојке и желуца, док метанолни екстракт не испољава биолошку активност. Слични подаци су потврђени од стране Nile и Park (2014), који су указали да малине садрже бројне биоактивне супстанце (различита полифенолна једињења и витамин Ц) које показују позитиван ефекат на здравље људи. Позитивни ефекти се огледају у антиканцерогеној, антимикуробној, антиупалној и антимутагеној активности.

6. Дивља малина: традиционална употреба и значај

Вековима уназад је познато да људи користе самоникле биљке у својој исхрани. Употреба биљака зависи од социјалних, културолошких и економских потреба (Аг и сар., 2015). Од давнина, дивље биљке су саставни део локалних култура (Ashagre и сар., 2016). Самоникло биље које се користи у исхрани се означава као дивље јестиво биље. Дивље биљке су временом постале мање важан ресурс у исхрани јер су замењене пољопривредним и индустријским производима (Licata и сар., 2016). Међутим, тренд коришћења дивљих биљака је све више у порасту последњих година. Доказ за то је постојање великог броја продавница здраве, органске, „зелене“ и биохране широм Европе. Биошопови широм Европе нуде производе од дивљих зељастих биљака, или су оне искоришћене као додатак прехранбеним производима, као што је кафа на бази водопије, сирупи од маслачка, тестенина направљена са додатком праха коприве. Употреба самониклих биљака је посебно популарна у медитеранским земљама као што су Хрватска, Грчка, Италија, Шпанија и Турска (Dogan и сар., 2013).

Научници су показали да дивље врсте често садржи високу концентрацију минерала, протеина, висок ниво витамина А и Ц, као и значајан проценат влакана, често више него гајене биљке (Guerrero и сар., 1998; Aberoumand и Deokule, 2009; Alam и сар., 2014). Поређењем квалитета плодова дивље и питоме малине је утврђено да дивље форме показују различит нутритивни профил и укус од гајених сорти. Неколико истраживача је забележило да већина дивљих врста има виши антиоксидативни капацитет, богатији укус, атрактивнију боју, мирис и садржи другачија ароматична једињења (Ozgen и сар., 2007). Осим у исхрани, самоникло биље се користи и у народној медицини. У ову сврху користе се сви делови биљке у зависности од врсте.

Дивља малина (листови и плодови) се користи у народној медицини и исхрани. Употреба малине у медицинске сврхе је описана пре употребе у сврху исхране. За ове потребе користе се листови и плодови од којих се праве чајеви. Цветови малине су коришћени као маст за очи, као и за третирање стомачних проблема. Стари Римљани и Грци пре 2000 година, који су живели у подножју планине Ида у Малој Азији су јако ценили плодове малине. Грци су их назвали „ида“ према планини Ида.

Лине је касније управо употребио епитет „*idaeus*“ за црвену малину, изведен из речи „Ида“ и *Rubus* за име рода, јер на латинском реч рубер значи црвен (Castillo, 2006).

Листови дивље малине су укључени у British Pharmacopoeia од 1983 (Scientific Committee of the British Herbal Medicine Association, 1983), а 2012 European Medicines Agency је публиковало монографију о листовима дивље малине (<https://www.ema.europa.eu/en/committees/committee-herbal-medicinal-products-hmpc>).

Многи европски травари препоручују малину у лечењу пролива, мучнина и повраћања. Неки називају малину леком избора у току трудноће, јер олакшава јутарње мучнине, спречава побачај и олакшава порођајне болове (Patel и сар., 2004). Ипак, иако се лист малине традиционално употребљава током трудноће доста дуго, докази о ефикасности, безбедности и активним састојцима су слаби. Потребно је знатно више истраживања и научне верификације како би се ова дрога препоручила за употребу у званичној медицини (Holst и сар., 2009).

Напитак који се прави од стабла дивље малине позитивно утиче на анемију, посебно када се помеша са *Prunus virginiana* (Ritch-Krc и сар., 1996). Екстракти листова се у многим земљама Европе користе за третирање различитих обољења као што су дијабетес, инфекције, колике и опекотине. Листови неких *Rubus* врста се користе као антиспазмолитици, а највише је у употреби управо *R. idaeus* (Patel и сар., 2004). Употреба плодова малине даје добре резултате у комбинацији са другим бобичастим воћем. Заједно са боровницама, зауставља мутације ћелија карцинома дојке и грлића материце. У комбинацији са једном врстом дивљих јагода неутралише раст Грам негативних и Грам позитивних бактерија (Gruenwald, 2009).

Употреба дивље малине у народној медицини је забележена и на простору Србије (Јарић и сар., 2007). Чај од листова малине се користи за заустављање крварења (Јарић и сар., 2015). Чај од плодова малине се користи за побољшање имунитета после прехлада, као и за лечење респираторних обољења (Šavikin и сар., 2013).

У исхрани, плодови се конзумирају као свеже воће или се од њих праве различити традиционални производи. Најпознатији традиционални производи од малине на простору Србије су: различите форме сокова (сируп, бистар сок), слатко (традиционалан српски производ) (Јарић и сар., 2007; Јарић и сар., 2015), различите врсте колача са додатком плодова малине, као и алкохолна пића од плодова малине.

7. Гајена малина: порекло, особине и значај

Гајење малине је први пут поменуто од стране Римљана у IV веку, али тада су се још увек малине углавном сакупљале из дивљине. Плодови су се јели или користили за ароматизовање напитака, а листови су се користили за прављење чаја у терапеутске сврхе. До XVI века европски писци су забележили да се малине гаје у баштама, а од XVII века су описане различите форме малине, као што су оне са црвеним, жутим и белим плодовима. Избором варијетета и селекцијом, дошло се до знатно крупнијих плодова. Значајан напредак је направљен крајем XVIII века, па је тако 1823. године Хортикултурно удружење Лондона саопштило да постоји 23 сорте (Patel и сар., 2004).

Највећи изазови у оплемењивању јесу: стварање сорти без трнова, висока продуктивност, дужа сезона брања, као и повећана отпорност на абиотичке (веома су осетљиве на велику влажност земљишта, али и на недостатак влаге, као и на мраз) и биотичке факторе (*Didymella applanata* – изазива пегавост изданака малине, *Elsinoe veneta* – изазива антактозу, *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rubi* изазивају рак корена и рак изданака). Већина гајених сорти малине су настале од две подврсте и то европске малине, *R. idaeus*, и северно-америчке малине *R. strigosus*. Хибридизација између ове две подврсте је била успешна. Пет гајених сорти води порекло од црвене малине (Dale и сар., 1993). То су: “Loyd George” и “Rupe’s Royal” које су добијене од *R. idaeus*, „Newburgh“ од *R. strigosus* и „Preussen“ и „Cuthbert“ добијен укрштањем између *R. idaeus* и *R. strigosus*. Узгајивачи су такође искористили и друге *Idaeobatus* врсте (као што су *R. occidentalis*, *R. cockburnianus* Hemsl., *R. biflorus* Buch., *R. kuntzeanus* Hemsl., *R. parvifolius* Hemsl., и *R. pungens oldhamii* [Mig]. Maxim), две *Cyclatis* врсте (*R. arcticus* L. и *R. stellatus* Sm.) и једну *Anoplobatus* врсту (*R. odoratus* L.) да произведу нове сорте (Daubeney, 1996). Врста *Rubus occidentalis* је искоришћена за побољшање чврстине плодова и одлагање зрења код британских и шкотских сорти „Malling Leo“, „Malling Joy“, „Glen Prosen“ и „Glen Moy“ (Кеер, 1984). Северноамеричке сорте „Amity“ и „Summit“ произведене из OSU-USDA програма хибридизације такође имају гене од врсте *R. occidentalis*. Јака зимска чврстина и рано зрење плодова су добијени од арктичке малине *R. arcticus* и резултирали су стварањем сорти као што су „Merva“ и „Heija“ (Hiirsalmi и Sako, 1976).

Две азијске врсте, *R. kuntzeanus* Hemsl. и *R. parvifolius* су пореклом од „Van Fleet“, „Southland“ и „Dormanred“ сорти. У свету, најчешће се гаје сорте као што су „Willamette“, „Malling Exploit“, „Heritage“, „Glen Moy“, „Glen Prosen“, „Glen Empl“, „Oktavija“, „Tulamin“, „Polana“, „Himbo - Top“ и „Meeker“.

Циљ савремених програма оплећења је производња малина са унапређеним особинама. Ту се првенствено мисли на висок принос, плодове доброг квалитета, отпорност на болести и штеточине (Daubeny, 1996). Болести које су честе код гајених малина су пегавост изданака малине (*Didymella applanata*), антракноза (*Elsinoe veneta*), бактеријски рак малине, трулеж корена (*Phytophthora fragariae* var. *rubi*), увенуће изданака (*Verticillium albo-atrum* и *V. dahliae*), сива плесан (*Botryotinia fuckeliana*, *Botrytis cinerea*). У малињацима проблем могу створити и вируси, па тако малину заражава чак око 30 врста вируса (Благојевић и Божић, 2012). Међутим, припитомљављање је довело до смањења морфолошког и генетичког диверзитета код црвених малина (*R. idaeus*) (Jennings, 1988), при чему су створене сорте генетички сличне (Graham и McNicol, 1995).

Захваљујући свом изузетно пријатном мирису и укусу и великој нутритивној вредности, малина представља веома цењено и тражено воће које на светском тржишту има високу цену и веома је захвална за прераду. Поред финансијског ефекта, гајење малине омогућава упослење радне снаге, што је од велике социо-економске важности, нарочито у слабо развијеним руралним подручјима. Испитивањем неопходних средстава за улагање у производњу утврђено је да се производњом малине годишње постиже задовољавајућа економска добит, као и да се повраћај уложеног капитала остварује већ у другој години бербе засада (Кљajić и сар., 2017).

У Србији се највише гаје сорте „Willamette“, „Meeker“, „Polana“, „Heritage“, при чему су убедљиво највеће површине под сортом „Willamette“ (95%). Ова сорта настаје укрштањем сорти „Newburgh“ и „Lloyd George“. Карактерише је велика отпорност на абиотичке и биотичке факторе, рано зрење (почетком јуна), крупни плодови доброг укуса и висок принос (10 до 15 тона по хектару). Сорта „Meeker“ се на територији Србије гаји на 3-4% од укупних површина под малином. Настала је укрштањем сорте „Willamette“ и „Cuthbert“. Важи за слабоотпорну сорту, али је и поред тога веома призната и тражена у Европи (Благојевић и Божић, 2012).

Воћарство је веома важна грана пољопривреде у Србији. Воћњаци заузимају 4,8% површина укупног пољопривредног земљишта, што је мало с обзиром на повољне климатске и земљишне услове за гајење воћака. Највеће површине под воћњацима у Србији се налазе у западној Србији, Шумадији, Подунављу и деловима јужне Србије (Keserović и Magazin, 2014). Јабучасте воћне врсте покривају нешто преко 20% укупних површина под воћњацима, коштичаве воћне сорте 67% (при чему чак две трећине отпадају на гајење шљиве), језграсте воћне врсте (орех и леска) око 5%, док јагодичасте воћне врсте заузимају 8,6% укупних површина воћњака. Од јагодичастог воћа највише се гаје малина и купина, док су површине под боровницом, рибизлом и аронијом слабије заступљене.

Према подацима Републичког завода за статистику, као и према подацима за период од 2010. до 2015. године, малина је водећа воћна врста на основу извозне вредности (Клјајић и сар., 2017). Гаји се на површини од око 11041 ха, при чему се површина засада последњих година повећава. Највећа количина малине се производи у западној и југозападној Србији у око 60000 домаћинстава, при чему се највише површина под малином налази у општинама Косјерић, Ужице, Ариље, Пожега, Ивањица, Ваљево, Мионица, Осечина, Коцељева, Крупањ, Љубовија, Горњи Милановац, Чачак, Лучани, Брус и Александровац (Клјајић и сар., 2017). Најбољи малињаци се налазе у зони букве на растреситим, пропустљивим и слабо киселим земљиштима, која располажу повољним водно-ваздушним режимом. У нашим условима су за малину најприкладније северне експозиције (Благојевић и Божић, 2012).

Сорте малине у Србији су одавно уведене у производњу и не мењају се лако. Доминира сорта „Willamette“ са око 95%, следи „Meeker“ са 3-4%, а све остале сорте су заступљене са 1-2% (Nikolić и сар., 2007).

Гајење малине у Србији је почело у XX веку, после Првог Светског Рата. У другој половини XX века производња се стално повећавала и 1988. године малина је постала водећа врста бобичастог воћа у бившој Југославији (Nikolić и сар., 2008). Укупна производња малине у Србији је до 2012. године била на стабилном нивоу од нешто преко 80000 тона, а у тој и у 2013. години бележи пад на око 70000 тона. Пад производње је забележен и у сезони 2014. и 2015. године (Републички завод за статистику, Статистички годишњак Републике Србије, 2007-2016).

Ако се узму у обзир горе наведене чињенице, јасно је да се мора радити на унапређењу производње и повећању приноса, како би Србија остала конкурентна на светском тржишту. Такође, потребно је радити на стварању нових сорти са унапређеним карактеристикама. У том циљу, неопходно је детаљно упознавање са карактеристикама популација дивље малине, како би се исте употребиле за стварање нових, отпорнијих сорти. Али, без обзира на значај дивље малине као материјала за оплемењивање гајене малине, дивља врста се спорадично сакупља због квалитета и ароме плодова, мада због релативно ограниченог ареала и бројности јединки, сакупљање из природе нема већег економског значаја.

ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Предмет истраживања докторске дисертације је утврђивање варијабилности унутар и између популација дивље малине – *Rubus idaeus* L, применом морфоанатомских, фитохемијских и молекуларних метода, као и испитивање њихове распрострањености и основних еколошких карактеристика станишта ове врсте на подручју Републике Србије. Такође, овим истраживањем је обухваћено сакупљање етноботаничких података о традиционалној употреби листова и плодова дивље малине у народној медицини, као и испитивање квалитета одабраних традиционалних производа од ове биљне врсте.

Основни циљеви истраживања односе се на:

- ✚ Сагледавање распоростраћења и типова станишта врсте *R. idaeus* за подручје Србије ради процене евентуелне угрожености и могућности одрживог сакупљања;
- ✚ Мапирање и очување знања о традиционалној употреби дивље малине на подручју Србије;
- ✚ Испитивање варијабилности унутар и између истраживаних популација врсте *R. idaeus* поређењем морфолошких и анатомских особина;
- ✚ Поређење популација на основу анализе фитохемијских података на нивоу садржаја кључних примарних и секундарних метаболита, као полазне основе у побољшању квалитета постојећих традиционалних и стварања нових функционалних производа од дивље малине;
- ✚ Испитивање биолошке активности (антимикробна и антиканцерогена) екстракта листова и плодова и њихове везе са фитохемијским профилима;
- ✚ Утврђивање степена генетичке варијабилности ради сагледавања вијабилности и односа популација унутар врсте, применом молекуларних маркера;

✚ Утврђивање варијабилности између популација у зависности од географског положаја и надморске висине са етноботаничког, морфоанатомског, фитохемијског и генетичког аспекта;

✚ Обједињавање свих добијених резултата ради креирања будућих акционих мера и планова за дугорочно очување ове врсте у природи.

При изради плана и програма истраживања пошло се од следећих претпоставки:

✚ Да постоје морфоанатомске и фитохемијске разлике на интрапопулацијском и интерпопулацијском нивоу као последица генетичке дивергентности;

✚ Да се постојеће разлике у морфолошкој и анатомској грађи, као и разлике у квалитативном и квантитативном фитохемијском и молекуларном профилу популација могу довести у везу са различитим условима станишта;

✚ Да различите популације имају различити садржај примарних метаболита (плодови) и/или секундарних метаболита (листови и плодови) и, тиме испољавају различиту антиоксидативну активност и биолошке ефекте;

✚ Испољене разлике у фитохемијским карактеристикама имају утицаја на квалитет традиционалних производа ;

✚ Поједине популације ће бити погодне за развијање и стварање нових производа као и за унапређење квалитета неких постојећих традиционалних производа.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални део истраживања (морфоанатомска) реализован је у лабораторијама Департмана за биомедицинске науке Државног универзитета у Новом Пазару, Пољопривредног факултета у Београду, Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, као и Свеучилишта у Загребу.

1. Опис истраживаних локалитета

Узорци за морфоанатомска, фитохемијска и молекуларна истраживања су узети са локалитета који су претходним прегледом вегетацијских база одређени као најбогатији јединкама. Етноботаничка испитивања вршена су на локалитетима који су били географски најближи популацијама дивље малине које су анализирани са морфоанатомског, генетичког и фитохемијског аспекта. С обзиром да је за етноботаничка истраживања неопходан већи узорак становништва, ова анализа је проширена на још два локалитета и то Ртањ и Власинско висораван. Истраживани локалитети се могу груписати у два већа географска региона, тј. макролокалитета: југозападна Србија – ЈЗС (обухвата истраживане локалитете Студена планина, Жељин, Гоч, Голија и Копаоник – на мапи су ови локалитети означени бројевима од 1 до 5, Слика 9) и југоисточна Србија – ЈИС (обухвата истраживане локалитете Стара планина, Озрен, Ртањ и Власинска висораван– на мапи су наведени локалитети означени бројевима од 6 до 9) у циљу да се уоче евентуалне разлике на нешто већем простору. Такође, у истом циљу, истраживани локалитети се могу груписати и у две висинске групе. Прву групу (планинске популације) чине истраживани локалитети који се налазе на надморским висинама испод 1000 m (Студена планина, Гоч, Озрен), док другу групу (субаплијске популације) чине истраживани локалитети који се јављају на надморским висинама изнад 1000 m (Жељин, Голија, Копаоник, Студена планина, Ртањ, Власинска висораван). Подаци о истраживаним локалитетима су дати у Табели 4.

Табела 4. Географски положај истраживаних локалитета

Географско подручје	GPS	Надморска висина (m)	Локалитет	Број становника	Тип заједница
Студена планина	N-43,5172 E-20,6444	983	Попова река	53	<i>Quercetum montanum petraea</i>
Жељин	N-43,4703 E-20,8276	1357	Рокци	102	<i>Fegetum montanum</i>
Гоч	N-43,5717 E-20,7300	675	Брезна	65	<i>Carpino orientalis-Quercetum cerris</i>
Голија	N-43,1914 E-20,2510	1432	Себимиље	65	<i>Aceri heldreichii-Fagetum</i>
Копаоник	N-43,1833 E-20,4953	1985	Семетеш	68	<i>Vaccinio-Junipero-Picetum subalpinum</i>
Озрен	N-43,3653 E-21,5328	931	Леговик	101	<i>Querco-Fagetum</i>
Стара планина	N-43,3616 E-22,5786	1710	Балта Бериловац	105	<i>Piceo subalpine-Vaccinio-Juniperetum</i>
Ртањ	N-43,4617 E-21,5602	1131	Ртањ	82	<i>Festuco drymeiae-Fagetum submontanum</i>
Власинска висораван	N-42,4128 E-22,2208	1332	Власина Стојковићева	130	<i>Fagetum moesiacaе montanum</i>

2. Климатске карактеристике истраживаних локалитета

За приказивање климатских карактеристика истраживаних локалитета коришћени су подаци из WorldClim базе (Hijmans и сар., 2005; <http://www.worldclim.org/>). У питању је глобална база климатских података, која садржи податке на основу вредности температуре и количине падавина са око 3500 националних метеоролошких станица које су укључене у светску мрежу.

Анализом климатских параметара за педесетогодишњи период (1950-2000. године) који су приказани у Табели 5, може се видети да се средња годишња температура (БИО1) на истраживаним локалитетима креће од 4,6 °C (Стара планина) до 9,8 °C (Копаоник). Најшири температурни опсег је карактеристичан за планину Копаоник (29,9 °C), док је најужи опсег забележен на Старој планини (26,9 °C). Средња температура највлажнијег квартала (БИО8) се креће у опсегу од 5,3 °C (Копаоник) до 10,7 °C (Гоч), а средња температура најсушнијег квартала (БИО9) се креће од -4,0 °C (Стара планина) до 0,1 °C (Копаоник). Највећа годишња количина падавина (БИО12) је карактеристична за планину Голију (1005 mm), док је најмање падавина у посматраном периоду било на планини Озрен (751 mm). Количине падавина највлажнијег квартала (БИО16) су прилично уједначене и варирају од 238 mm (Озрен) до 285 mm (Жељин), док количина падавина најсушнијег квартала (БИО17) има нешто већу амплитуду – од 156 mm (Озрен) до 221 mm (Голија). Просечна количина падавина најтоплијег квартала (БИО18) је намања на Озрену (209 mm), док је највећа на Гочу (255 mm). Најмање падавина у току најхладнијег квартала (БИО19) је забележено на Озрену (167 mm), док је највиша количина карактеристична за Голију (237 mm).

Табела 5. Климатски параметри истраживаних локалитета

Климатски параметри	П1	П2	П3	П4	П5	П6	П7
Средња годишња температура (БИО1)	7,5	6,0	8,7	6,7	9,8	7,5	4,6
Опсег средњих месечних температура (БИО2)	8,7	8,2	9,3	8,4	9,5	8,9	8,3
Изотермалност (БИО2/БИО7) (* 100) (БИО3)	30	29	31	30	31	31	30
Температурна сезоналност (стандардно одступање * 100) (БИО4)	6945	6780	7105	6747	7190	6985	6632
Максимална температура најтоплијег месеца (БИО5)	22,3	20,4	24,0	21,1	25,5	22,7	18,8
Минимална температура најхладнијег месеца (БИО6)	-6,1	-7,0	-5,3	-6,5	-4,4	-5,9	-8,1
Годишњи температурни опсег (БИО5-БИО6) (БИО7)	28,4	27,4	29,3	27,6	29,9	28,6	26,9
Средња температура највлажнијег квартала (БИО8)	14,3	12,6	15,7	10,0	5,3	14,3	11,1
Средња температура најсушнијег квартала (БИО9)	-0,4	-1,8	-0,8	-2,3	0,1	-1,8	-4,0
Средња температура најтоплијег квартала (БИО10)	16,1	14,4	17,4	15,0	18,6	16,1	12,8
Средња температура најхладнијег квартала (БИО11)	-1,8	-3,0	-0,8	-2,3	0,1	-1,8	-4,0
Годишња количина падавина (БИО12)	884	905	838	1005	907	751	764
Падавине највлажнијег месеца (БИО13)	100	102	96	104	94	87	92
Падавине најсушнијег месеца (БИО14)	56	58	52	69	63	48	48
Сезоналност падавина (коэффициент варијације) (БИО15)	17	17	18	12	13	18	21
Падавине највлажнијег квартала (БИО16)	277	285	266	279	252	238	252
Падавине најсушнијег квартала (БИО17)	180	188	168	221	200	156	158
Падавине најтоплијег квартала (БИО18)	247	255	237	248	217	209	225
Падавине најхладнијег квартала (БИО19)	192	199	178	237	216	167	173

3. Преглед распрострањења и ценобиотичке припадности дивље малине

Преглед распрострањења и ценобиотичке припадности дивље малине је одређен прегледом базе вегетације Балканског полуострва (Аџић и сар., 2012), као и Приручника “Станишта Србије” (Лакушић и сар., 2005).

4. Етноботаничка истраживања

Етноботаничка студија је спроведена на девет локалитета у планинском региону Србије (Слика 9). Локалитети су изабрани према богатству природних популација дивље малине, на основу наших претходних теренских истраживања, анализе постојећих флористичких и фитогеогрфских података, и увида у постојећу базу вегетације централног Балкана (Аџић и сар., 2012). Сви изабрани локалитети представљају села која се налазе у близини циљаних популација дивље малине. Надморска висина изабраних локалитета се креће од 675 до 1985 m. Сеоска изолована подручја, се карактеришу ниском густином насељености, углавном због старости становништва и миграције према градовима. Број становника, као и број домаћинстава (Табела 6) на истраживаним локалитетима је добијен према подацима Републичког завода за статистику републике Србије (<http://www.stat.gov.rs/WebSite/Public/ReportView.aspx>).



Слика 9. Мапа истраживаних локалитета (ЈЗС: 1- Студена планина; 2 – Жељин; 3 –Гоч; 4 – Голија; 5 – Копаоник; ЈИС: 6 – Стара планина; 7- Озрен; 8 – Ртањ; 9 – Власинска висораван)

Табела 6. Географска позиција, број испитаника, број домаћинстава и тип станишта на истарживаним подручјима

Макролокалитет	Локалитет	Испитивано подручје (село)	GPS	Надморска висина (m)	Број испитаника	Број домаћинстава
Југозападна Србија – ЈЗС	Студена планина	Попова река	N-43,5172 E-20,6444	983	53	19
	Жељин	Рокци	N-43,4703 E-20,8276	1357	102	42
	Гоч	Брезна	N-43,5717 E-20,7300	875	65	27
	Голија	Себимиље	N-43,1914 E-20,2510	1432	64	26
	Копаоник	Семетеш	N-43,1833 E-20,4953	1985	68	29
	Стара планина	Балта Бериловац	N-43,3616 E-22,5786	1710	105	46
Југоисточна Србија – ЈИС	Озрен	Левовик	N-43,3653 E-21,5328	931	101	39
	Ртањ	Ртањ	N-43,4617 E-21,5602	1131	82	36
	Власинска висораван	Власина Стојковића	N-42,4128 E-22,2208	1332	130	42

4.1. Прикупљање, обрада и статистичка анализа етноботаничких података

Етноботаничко истраживање је спроведено у периоду између јуна и септембра 2016. године. Током истраживања, спроведени су интервјуи са 93 особе, од којих је било 66 жена и 27 мушкараца. Већи број жена у узорку се објашњава чињеницом да се жене углавном баве прикупљањем дивљих плодова и биљака, као и прављењем различитих традиционалних производа од шумских плодова и самониклог биља. Такође, жене су више ангазоване око одржавања домаћинства, тако да је женски пол био приступачнији за добијање етноботаничких података. Сатрост испитаника је била између 20 и 80 година, са највећим бројем испитаника који су припадали старосној групи између 50 и 60 година. Није постојао специфичан критеријум за одабир испитаника, с обзиром да је густина насељености веома мала. Обично су испитаници указивали ко би могао бити испитан следећи. Минимални број испитаника на сваком истраживаном локалитету је био 10. Сви испитаници су били из сеоских подручја и главна окупација домаћинства је пољопривреда и сточарство, углавном за њихове сопствене потребе. Када се ангажују око сакупљања биља или шумских плодова, углавном су наводили да то раде док чувају стоку или понекад за потребе локалних маркета.

Популација која је испитивана је етнички хомогена: сви испитаници су били Срби, православне вероисповести, који говоре српски језик. Демографске карактеристике испитаника су дате у Табели 7.

Сви интервјуи по типу семиструктурираног, полузатвореног упитника (Прилог 1), су спроведени у директном разговору са испитаницима. Двосмислени одговори нису бележени. Интервјуи су трајали између 0,5 и 1 h. Објашњен је разлог испитивања и сви учесници су дали свој пристанак за учешће.

Информације добијене у интервјуима су записиване у теренски дневник. Хербаријумски узорци са свих локалитета су прикупљени и чувају се у Хербаријуму Департмана за биомедицинске науке, студијског програма Биологија, Државни универзитет у Новом Пазару. Материјал је проверен на Катедри за агроботанику, Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

Током интервјуа узимани су следећи подаци: име и презиме; пол; старост; степен образовања; главна активност домаћинства; број чланова домаћинства; локални назив за дивљу малину; употреба листова малине; употреба плодова; када сакупљају листове и плодове; за лечење којих болести користе листове и плодове; друга употреба малине; употреба плодова у исхрани и за прављење напитака – које традиционалне производе праве од малине; које друго шумско воће сакупљају. Упитник који је коришћен, дат је у Прилогу 1.

Основна дескриптивна статистика је коришћена за обраду демографских података испитиваних популација. Анализа варијансе, ANOVA, са Tukey HSD тестом је коришћена да се испитају разлике између нумеричких променљивих (параметри квалитета и антиоксидативна активност), док је Fisher-ов тест (2-страни) коришћен да се испитају разлике између категоријских променљивих. Све категоријске променљиве су кодиране као дихотоме, са позитивним одговором као бројчаном вредношћу (1 – значи да, 2 – значи не). Употреба листова и плодова дивље малине је анализирана коришћењем опције вишеструких одговора (унакрсна анализа), зато што су испитаници могли дати више од једног одговора на питање. Из овог разлога дефинисана су два сета вишеструких одговора (употреба у традиционалној медицини и употреба у исхрани). Испитивана веза је означена као статистички значајна ако је p – вредност била мања од 0,05. Анализа података је спроведена употребом програма SPSS (SPSS 18.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). У табелама, маркиране вредности су статистички значајне на нивоу $p < 0,05$.

Табела 7. Демографске карактеристике испитаника, укупан узорак N = 93

		Локалитет							Макролокалитет				Укупно
		Студена планина	Жељин	Гоч	Голија	Копаоник	Стара планина	Озрен	Ртањ	Власинска висораван	ЈЗС	ЈИС	
Пол	Женски	72,7%	70%	60%	80%	81,8%	72,7%	60%	70%	70%	73,1%	68,3%	71%
	Мушки	27,3%	30%	40%	20%	18,2%	27,3%	40%	30%	30%	26,9%	31,7%	29%
Старост	20-30	0%	0%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3,8%	0%	2,2%
	30-40	9,1%	20%	0%	20%	27,3%	0%	0%	0%	0%	15,4%	0%	8,6%
	40-50	54,5%	0%	50%	30%	27,3%	0%	0%	0%	0%	32,7%	0%	18,3%
	50-60	18,2%	80%	0%	20%	27,3%	63,6%	60%	40%	30%	28,8%	48,8%	37,6%
	60-70	9,1%	0%	30%	20%	9,1%	36,4%	40%	60%	20%	13,5%	39%	24,7%
	70-80	9,1%	0%	0%	10%	9,1%	0%	0%	0%	50%	5,8%	12,2%	8,6%
Степен образовања	Основна школа	36,4%	30%	0%	10%	27,3%	36,4%	0%	60%	20%	21,2%	29,3%	24,7%
	Средња школа	63,6%	70%	70%	90%	63,6%	36,4%	100%	40%	80%	71,2%	63,4%	67,7%
	Високо образовање	0%	0%	30%	0%	9,1%	27,3%	0%	0%	0%	7,7%	7,3%	7,5%

5. Анализа морфолошких карактеристика

Биљни материјал је узоркован у току теренских истраживања, у периоду од јуна до септембра 2016. године, са седам локалитета (Табела 8). Од морфолошких параметара, директно на терену, мерен је обим (cm) и висина (cm) 30 испитиваних јединки из сваке популације, укупно 210 јединки. На хербарском материјалу је вршено мерење дужине (cm) и ширине листова (cm), узетих са истих 30 јединки из сваке популације.

Табела 8. Географска позиција испитиваних локалитета

Популација	GPS	Надморска висина (m)	Село
П1	N-43,5172 E-20,6444	983	Полумир
П2	N-43,4703 E-20,8276	1357	Плоче
П3	N-43,5717 E-20,7300	675	Брезна
П4	N-43,1914 E-20,2510	1432	Себимиље
П5	N-43,1833 E-20,4953	1985	Семетеш
П6	N-43,3653 E-21,5328	931	Лемовик
П7	N-43,3616 E-22,5786	1710	Бабин зуб

П1 - Студена планина, П2 - Жељин, П3 - Гоч, П4 - Голија, П5 - Копаоник, П6 - Озрен,
П7 - Стара планина

За статистичу обраду резултата коришћене су различите методе у оквиру софтверског пакета STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) и SPSS (SPSS 18.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Израчунати су параметри дескриптивне статистике: аритметичке средине, минималне и максималне вредности, као и коефицијенти варијације за испитиване морфолошке карактере. Урађена је једнофакторска анализа варијансе ANOVA у циљу утврђивања статистичке значајности разлика варијабилности испитиваних популација по сваком испитиваном карактеру. Израчунате су F – вредности у односу на дате карактере посматране на нивоу популација, за ниво сигнификантности $< 0,05$. Општа структура варијабилности узорака утврђена је методом анализе главних компоненти (PCA). Статистичка зависност испитиваних морфолошких параметара од географске позиције и надморске висине је тестирана уз помоћ K independent samples теста.

6. Анализа анатомских карактеристика

Биљни материјал за анатомска истраживања (листови) је узет са седам локалитета (Табела 8), при чему су из сваке популације узети узорци са 30 јединки, те су анатомска истраживања спроведена за 210 јединки. Листови за анатомску анализу узорковани су у фази пуног листања, из сваке популације и фиксирани у 50% етанолу. Приликом узорковања листова поштован је принцип униформности. Микроскопски препарати припремани су парафинском методом (Ruzin, 1999). Дехидратација је обављена спровођењем кроз серију раствора етанола различите концентрације, затим кроз ксилол до калупљења у парафину. Парафински калупи су сечени на микротому марке LEICA SM 2000 R. Добијени пресеци дебљине 6-10 μm су бојени сафранином и алцијан плавим. Микроскопски препарати су посматрани светлосним микроскопом LEICA DMLS и фотографисани дигиталном камером LEICA DC 300, а мерење анатомских пресека листова вршено је коришћењем софтверског пакета IM 1000. Мерени су следећи анатомски параметри: висина епидермиса лица (μm), висина епидермиса наличја (μm), дебљина целог листа (μm), дебљина палисадног ткива (μm), дебљина сунђерастог ткива (μm), дужина проводног снопића главног лисног нерва (μm), ширина главног проводног снопића (μm), дужина и ширина проводних снопића бочних лисних нерава (μm).

За сваки испитвани анатомски параметар вршено је пет мерења по листу на листовима узетих са 30 јединки из сваке популације. За статистичку обраду резултата анатомских анализа коришћене су различите методе у оквиру софтверског пакета STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) и SPSS (SPSS 18.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Израчунате су аритметичке средине, стандардне грешке и коефицијенти варијације за испитиване карактере. Сигнификантност разлика анализираних параметара између популација одређена је уз помоћ Duncan-овог теста ($p \leq 0,05$). Општа структура варијабилности узорака утврђена је методом анализе главних компоненти (PCA), засноване на корелационој матрици. Статистичка зависност испитиваних анатомских параметара од географске позиције и надморске висине је тестирана уз помоћ K independent samples теста.

7. Фитохемијска испитивања

7.1. Узорковање биљног материјала

За фитохемијска испитивања прикупљени су листови са 30 јединки из седам популација (Табела 8). У фази пуне зрелости, узимани су плодови са различитих јединки, из сваке популације. На истраживаним локалитетима су од локалних продаваца узети традиционални производи од плодова малине. Листови су сушени на тамном месту, седам дана, и затим спаковани у папирне кесе у којима су чувани до анализе. Плодови су замрзнуте и чувани у замрзивачу до анализе.

За потребе фитохемијских истраживања (укупни садржај фенола, флавоноида, танина и антоцијанина, као и антиоксидативна активност) припремљени су метанолни екстракти листова и плодова.

7.2. Припрема метанолних екстраката

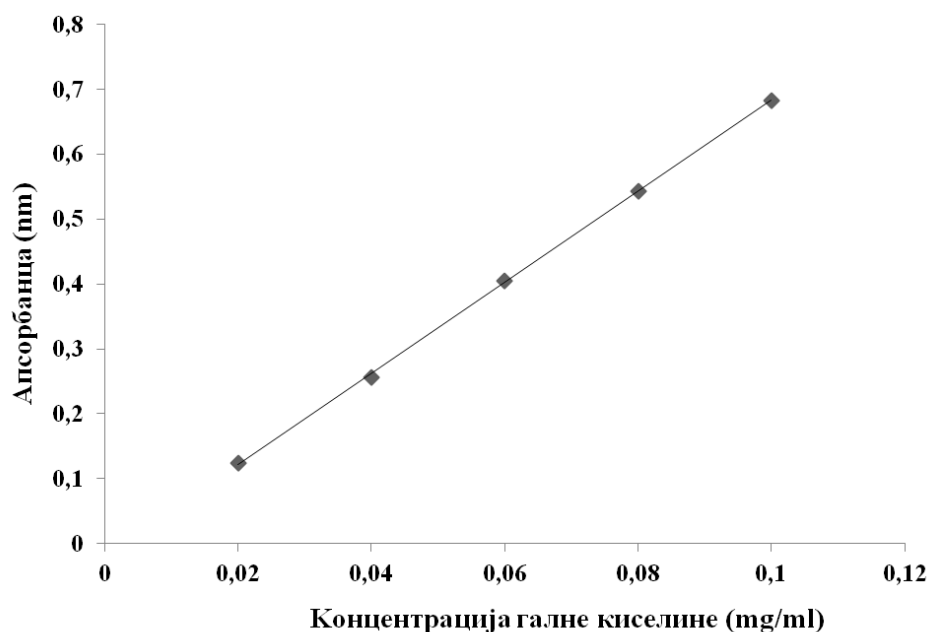
Екстракти су припремљени тако што је биљни материјал стављен у тамне боце са 200 mL растварача (метанол) и остављени 24 h на собној температури. После 24 h раствори су филтрирани кроз филтер папир Whatman No 1. Остатак је поново екстрахован са истом запремином растварача. Комбиновани филтратаи су упарени до сува на температури од 40 °C помоћу вакуум упаривача. Добијени екстракти су до употребе чувани у фрижидеру на 4 °C.

7.3. Одређивање количине укупних фенолних једињења

За одређивање концентрације укупних фенола коришћен је Folin-Ciocalteu реагенс. У 0,2 mL раствора екстракта концентрације 1 mg mL⁻¹ додато је 1,5 mL 1:10 Folin-Ciocalteu реагенса. Узорак је инкубиран 5 min/RT/ на тамном месту. Затим је додато 1,5 mL 6% натријум карбоната и садржај је промешан на вортексу. После инкубације у трајању од 90 min на тамном месту вршено је читавање апсорбанце на $\lambda=725\text{nm}$ (Jenway 6105; Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). За сваки узорак измерене су три апсорбанце и израчуната је средња вредност. Слепа проба је направљена на претходно описани начин, са том разликом што се уместо узорка користило 0,2 mL метанола (Wootton-Beard и сар., 2011).

Количина укупних фенола је изражена у еквивалентима галне киселине, па је из тог разлога конструисана калибрациона права за галну киселину.

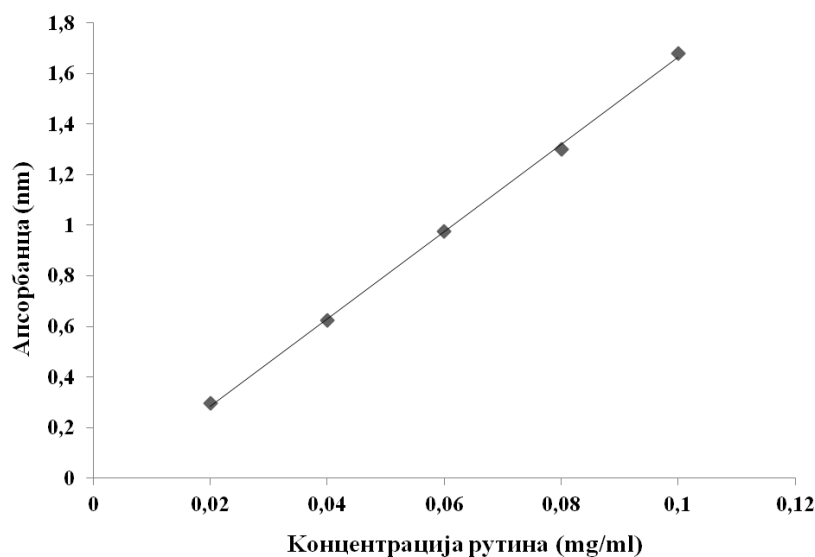
Припремљен је метанолни раствор галне киселине концентрације 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 31,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ и 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. У 0,2 mL раствора галне киселине наведених концентрација додато је 1,5 mL 1:10 Folin-Ciocalteu реагенса и затим је садржај инкубиран 5 min на тамном месту. Потом је додато 1,5 mL 6% натријум карбоната и смеша је промешана на вортексу. После мешања, узорак је инкубиран 90 min на тамном месту. Читавање апсорбанце је вршено на $\lambda = 725 \text{ nm}$. За сваки узорак су измерене три апсорбанце и израчуната је средња вредност. На основу добијених вредности конструисана је калибрациона права (Графикон 1).



Графикон 1. Калибрациона права за прерачунавање вредности укупне количине фенолних једињења

7.4. Одређивање количине флавоноида

Количина флавоноида је одређивана алуминијум-хлоридном методом (Quettier-Deleu и сар., 2000). Тестирани узорак је припремљен тако што је помешано 2 mL раствора екстракта концентрације 1 mg mL^{-1} и додато 2 mL 2 %-тног раствора алуминијум хлорида. Узорци су инкубирани 10 min на тамном месту. Потом је вршено читавање апсорбанце на $\lambda = 430 \text{ nm}$. За сваки узорак измерене су три апсорбанце и израчуната средња вредност. Бланк је припремљен на исти начин, само је уместо узорка додато 2 mL метанола. Количина флавоноида је изражена у еквивалентима рутина коришћењем калибрационе праве за рутин. Припремљен је метанолни раствор рутина концентрације $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $12,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $6,25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ и $3,125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. У 2 mL раствора рутина одређене концентрације додато је 2 mL 2% раствора алуминијум хлорида. Узорак је инкубиран 10 min на тамном месту. Читавање апсорбанце је вршено на $\lambda = 430 \text{ nm}$. За сваки узорак измерене су три апсорбанце и израчуната средња вредност. На основу добијених вредности конструисана је калибрациона права (Графикон 2).



Графикон 2. Калибрациона права за прерачунавање вредности количине флавоноида

7.5. Одређивање количине укупних танина

Укупна количина танина одређивана је спектрометријским мерењем (Hosu и сар., 2014). Узорци су припремани мешањем 2 mL екстракта, 3 mL концентроване HCl и 1 mL дестиловане воде. Садржај првог узорка је инкубиран 30 min на 100 °C, док је у други узорак додавано по 0,5 mL етанола. Апсорбанце узорака су одређиване на таласним дужинама $\lambda = 470, 520$ и 570 nm. Разлике (ΔA) између добијених вредности узорака су одређиване на истим таласним дужинама (ΔA_{470} , ΔA_{520} , ΔA_{570}). Вредности за таласне дужине ΔA_{470} , ΔA_{520} , ΔA_{570} , израчунаване су коришћењем једначине: $\Delta A_{520} = 1,1 \times \Delta A_{470}$; $\Delta A_{520} = 1,54 \times \Delta A_{570}$. Укупна количина танина изражена у mg mL^{-1} екстракта добијена је на следећи начин: $\text{TTC (mg mL}^{-1}\text{)} = 15,7 \times \text{минимум } (\Delta A_{520})$.

7.6. Одређивање количине укупних антоцијанина

За одређивање укупне количине антоцијанина припремљени су узорци са 0,5 mL екстракта, 0,5 mL 0,1% етанолног раствора HCl и 10 mL 2% воденог раствора HCl. 4,4 mL дестиловане воде је додато у први узорак, док је 4,4 mL 13% натријум бисулфата додато у други узорак и направљено је разблажење у односу 1:1. Апсорбанца узорака је одређивана на таласној дужини $\lambda = 520 \text{ nm}$, коришћењем стартног раствора припремљеног од 4,9 mL дестиловане воде, 0,5 mL 0,1% етанолног раствора HCl и 10 mL 2% воденог раствора HCl. Израчунате су разлике (ΔA) између вредности апсорбанце за узорке. Добијене вредности (ΔA) су помножене са коефицијентом 875. Укупна количина антоцијанина у узорку је изражена у $\mu\text{g mL}^{-1}$ екстракта (Hosu и сар., 2014).

7.7. Испитивање укупне антиоксидативне активности DPPH методом

Одређивање антиоксидативне активности вршено је DPPH методом (Такао и сар., 1994). У 6 епрувета је одмерено по 2 mL метанола, потом је у прву епрувету додато 2 mL раствора екстракта почетне концентрације ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) и припремљена је серија двоструких разблажења ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $15,625 \mu\text{g mL}^{-1}$). Исти поступак припреме је примењен и за позитивне контроле. Потом је додато 2 mL раствора DPPH у сваку епрувету и узорци су инкубирани 30 min на тамном месту. Контрола (бланк) је припремљена тако што је у једну епрувету одмерено 2 mL метанола и потом додато 2 mL раствора DPPH. Затим је садржај инкубиран 30 min на тамном месту. Очитавање апсорбанце је вршено на $\lambda = 725 \text{ nm}$. На основу добијених резултата одређена је IC_{50} вредност концентрација. IC_{50} вредност представља концентрацију екстракта која врши 50% редукцију DPPH. Вредност IC_{50} у $\mu\text{g mL}^{-1}$ је израчуната применом статистичког програма, при чему на графику X вредности представљају тестиране концентрације екстракта, а Y вредности проценте инхибиције за одговарајућу тестирану концентрацију. За сваки узорак су измерене три апсорбанце и израчуната средња вредност, при чему су резултати приказани као средња вредност $\pm$ стандардна девијација.

8. Статистичка обрада резултата фитохемијских анализа

За статистичку обраду резултата фитохемијских анализа коришћене су различите методе у оквиру софтверског пакета SPSS (18.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Методом линеарне регресије испитана је статистичка зависност између АОА и фенолних једињења. Општа структура варијабилности узорака утврђена је методом анализе главних компоненти (PCA). Такође, испитано је постојање статистичке зависности између резултата фитохемијских анализа и географске позиције (макролокалитета), као и између резултата фитохемијских анализа и надморске висине (планинске и субалпијске популације), коришћењем непараметарског теста (K independent sample).

9. Испитивање квалитета плодова и традиционалних производа

9.1. Припрема етанолних екстракта

За потребе одређивања укупних шећера и органских киселина прављени су етанолни екстракти. Количина плодова од 12,5 g је хомогенизована са 11,25 mL 70% етанола. Узорци су затим инкубирани 30 min. Након хлађења, узорци су центрифугирани на 9000 rpm у трајању од 10 min. Супернатант је филтриран кроз G-3 или GF/D филтер папир у чаше од 50 mL. Узорци су затим враћени у епандорфе и додато је по 5 g активног угља. Након интензивног мешања, узорци су поново инкубирани у воденом купатилу 30 min на 70 °C. После хлађења, узорци су центрифугирани на 9000 rpm у трајању од 10 min. Садржај је профилтриран кроз G-3 филтер папир. Преостали филтрат је прбачен у нормални суд од 50 mL и допуњен је дестилованом водом до црте.

9.2. Одређивање садржаја укупних шећера

Из етанлног екстракта одређиван је садржај укупних шећера рефрактометријском методом (Džamić, 1989). Рефрактометрија је метода која се користи за одређивање индекса преламања светлости, једне од основних особина супстанце. Користи се за идентификацију супстанци у чврстом или течном стању. Такође, може се користити и за одређивање процентуалног састава појединачних супстанци које се налазе у гасној или течној смеси.

9.3. Одређивање садржаја укупних органских киселина

Сдржај укупних органских киселина је одређиван титрацијском методом (Horwitz, 1975). У ерленмајер је додато 10 mL екстракта и 2-3 капи индикатора фенолфталеина. Садржај је затим титриран са 0,1 М NaOH до појаве светло црвене боје. На основу утрошка базе израчунат је садржај органских киселина и изражен у грамима лимунске киселине по граму свеже масе плодова.

9.4. Количина витамина Ц

Екстракција аскорбинске киселине. Анализа аскорбинске киселине је изведена према протоколу Stevens-а и сарадника (2006). Плодови су фиксирани у течном азоту и чувани на температури од -80 °C до анализе. 500 mg плодова малине је хомогенизовано у киветама од 2 mL са 600 mL 6% трихлорсирћетне киселине (ТСА). Тубе су шејковане у TissueLyser апарату (Qiagen) један минут, а затим пребачене на vortex 20 s. Екстракти су потом центрифугирани 15 min на 13200 rpm. За даљу анализу аскорбинске киселине је коришћен супернатант.

Испитивање аскорбинске киселине. За сваки узорак припремљене су две пробе: једна за мерење укупног аскорбата (укључује додатак DTT – дитиотреитол) и једна за мерење умањеног садржаја аскорбата (изостављање DTT из пробе). После додатка DTT и фосфатног пуфера, плоча са 96 комора је инкубирана 20 min на 37 °C.

У коморе са DTT је додато 10 μ l N-етилмалемида. У сваку од комора је додато 80 μ L обојеног реагенса. Плоче су инкубиране 60 min на 37 °C и потом је читавана апсорбанца на 550 nm. За конструисање стандардне криве коришћена је комерцијална L-аскорбинска киселина.

9.5. Испитивање укупне антиоксидативне активности плодова и традиционалних производа ABTS+ методом

Око 1 g зрелих плодова малине је хомогенизовано са 10 mL 80% етанола. Суспензија је центригуирана 10 min на 10000 обртаја на собној температури. Горњи слој је одвојен Пастеровом пипетом. Тако добијен етанолни екстракт коришћен је за одређивање антиоксидативне активности плодова малине. Антиоксидативна активност је одређена по методи Millera и сарадника (1996), модификованој од стране Bohm-а и сарадника (2002).

ABTS⁺ радикал катјон добијен је тако што је 7 mM раствора ABTS-а (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) (Sigma-Aldrich) у 5 mL фосфатном пуферу (PBS), pH 7,4, пропуштан кроз MnO₂ који се налазио на филтер папиру. Вишак MnO₂ одстрањен је кроз 0,2 μ m филтер (Syringe filter). Добијени раствор разблаживан је са 5 mM фосфатним пуфером (pH 7,4) тако да је његова апсорбанца на 734 nm била 0,7 (SPECTRO UV-VIS RS, 1166, Lambomed, Inc. USA). Пре употребе ABTS⁺ радикал катјон је стабилизован на собној температури 2 h.

Trolox (6-hydroxy 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) је коришћен као антиоксидативни стандард. Као основни стандардни раствор коришћен је 2,5 mM trolox припремљен у 5 mM фосфатном пуферу – pH 7,4. Серија стандардних раствора (0, 20, 40, 60, 80, 100 μ M) припремљена је непосредно пре употребе тако што је основни раствор разблаживан са 5 mM фосфатним пуфером, pH 7,4.

У епендорф кивете одмерено је 1 mL ABTS⁺ радикал катјона и 200 μ L етанолног екстракта (тј. 150 μ L 5 mM фосфатног пуфера pH 7,4 и 50 μ L етанолног екстракта узорка – ако је узорак био превише концентрован). Помоћу vortex-а (EV – 102) узорак је мешан 30 s, затим центрифугиран у трајању од 30 s на 10000 rpm (16M TECHNE). Апсорбанца је мерена на 734 nm (SPECTRO UV-VIS RS, 1166, Lambomed, Inc.

USA) два min после почетка мешања на вортех – у уз PBS као слепу пробу. За конструисање калибрационе праве припремљен је узорак на претходно описан начин, са разликом да су уместо етанолног екстракта коришћене различите концентрације (0, 20, 40, 60, 80, 100 μM) trolox раствора.

Измерена антиоксидативна активност израчуната је и изражена у Trolox еквивалентним јединицама по граму свеже масе узорка узетог за анализу ($\mu\text{molTU s}^{-1}$) (Zhou и Yu, 2006).

10. Биолошка активност екстракта листова и плодова

10.1. Антимикробна активност

Антимикробна активност метанолних екстракта листова и плодова дивље малине тестирана је према панелу ATCC (American Type Culture Collection) микроорганизама, укључујући Грам-позитивне – *Sarcina lutea* (ATCC 9431) и *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) и Грам-негативне – *Escherichia coli* (ATCC 8739).

Антимикробна активност је тестирана одређивањем минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне бактерицидне концентрације (MBC) коришћењем методе микродилуције (Sarker и сар., 2007). Тестирана концентрација испитиваних екстракта била је 40 mg mL⁻¹. Двострука разблажења екстракта су прављена у 96-коморним плочама која су садржала Mueller-Hinton индикатор раста за бактерије. Тестиране концентрације су биле од 20 mg mL⁻¹ до 0,16 mg mL⁻¹. Крајња концентрација је била 5 x 10⁵ CFU mL⁻¹. Раст бактерија је праћен додатком ресазурина, индикатора бактеријског раста. Као позитивна контрола коришћен је доксициклин. Плоче су инкубиране 24 h на 37 °C. MIC се дефинише као најнижа концентрација тестиране супстанце која изазива промену боје ресазурина из плаве у розу. Минимална бактерицидна активност се одређује пребацавањем 10 μL узорака са плоче где није било промене боје на хранљиви агар. На крају инкубације, најнижа концентрација без пораста бактерија се дефинише као минимална бактерицидна концентрација. Сва тестирања су рађена у три понављања.

10.2. Анतिकанцерогена активност

Ћелијска култура и третирање. За тестирање антиканцерогене активности биљних екстраката коришћене су ћелије канцера дебелог црева, ћелијска линија HCT-116 – American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Ћелије су гајене у DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco, USA) са додатком 10% феталног говеђег серума, пеницилина (100 IU mL^{-1}) и стрептомицина ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) на 37°C у 5% CO_2 влажној атмосфери. Ћелијска видљивост и пролиферација су одређиване на 80% до 85% конфлуентности коришћењем MTT теста. За MTT тест, ћелије су засејане у плоче са 96 комора (10^4 ћелија по зиду) и инкубиране 24 h на 37°C у влажној атмосфери која је садржала 5% CO_2 . После 24 h, медијум је замењен са $100 \mu\text{L}$ раствора различитих концентрација испитиваних екстраката. Стартни раствори екстраката су припремљени у диметил сулфоксиду (DMSO) при концентрацији од $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Крајња концентрација DMSO у растворима је била 1% (v/v). Стартни раствори су двоструко разблежени у концентрацијама које су се кретале од $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ до $6,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ у DMEM медијуму. Нетретиране ћелије су коришћене као контрола. Ћелије су инкубиране на 37°C и 5% CO_2 влажној атмосфери у трајању од 24 h и 48 h. Контрола и сваки од екстраката су тестирани у три понављања у три независна теста.

MTT тест. После 24 h и 48 h третирања, ћелијска видљивост и пролиферација су одређиване коришћењем MTT теста (Mosmann, 1983). MTT тест се базира на редукцији жуте тетразолиум соли MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) од стране митохондријалне дехидрогеназе живих ћелија у љубичасти формаза који је растворљив. После периода инкубације, медијум са третираним ћелијама је померен и $100 \mu\text{L}$ MTT раствора крајње концентрације 5 mg mL^{-1} је додато у сваки зид и инкубирано у 5% CO_2 влажној атмосфери на 37°C у трајању од 3 h. После инкубирања, MTT раствор је одбачен а створени обојени кристали формазана су растворени у $150 \mu\text{L}$ DMSO. Вредности апсорбанце су мерене на 550 nm. Ћелијаска вијабилност је израчуната као однос апсорбанце третиране групе подељене са апсорбанцом контролне групе и помножен са 100 да би се добио проценат вијабилности. Подаци су изражени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. Ефекат биљних екстраката је изражен као IC_{50} . Вредности IC_{50} су израчунате са стандардне криве преко компјутерског програма (CalcuSyn).

11. Испитивање генетичке варијабилности природних популација дивље малине и сорти питоме малине применом молекуларних маркера

11.1. Биљни материјал

Биљни материјал (свежи млади листови) за испитивање генетичке варијабилности прикупљен је у периоду између јуна и септембра 2016. године на локалитетима Гоч, Студена планина, Жељин, Озрен, Стара планина, Копаноник и Голија, док су узорци сорти (C1- „Mekeer”; C2 – „Willamette”; C3 – „Polka”; C4 – „Polana”; C5 – „Loganberry”; C6 – „Tayberry”; C7- „Black Jewel”) питоме малине узети у јуну 2017. године са плантаже предузећа „Superior D.O.O.“ из Велике Планае (Табела 9). Узорци из дивљих популација су подразумевали по један млади лист са најмање 15 јединки који је стављан и сушен у силика гелу. Јединке са којих је вршено узорковање су биле удаљене најмање 30 m, како би се избегло узимање оних које су вегетативно размножене. Што се тиче питомих малина, од сваке сорте је узет по један млади лист који је стављен и сушен у силика гелу. Једна јединка за сорту је репрезентативан узорак, пошто се јединке у сортама пропадају вегетативно.

У студију генетичке варијабилности је укључено укупно 135 јединки врсте *R. idaeus*, од којих су 128 из дивљих популација, док су седам јединки сорте питоме малине које се најчешће узгајају на плантажама у Србији. Сорте су узете како би се утврдила евентуална веза и положај у односу на дивљу врсту. Географски положај истраживаних локалитета, припадност популација одређеној просторној и висинској групи, као и број јединки по свакој популацији из којих су узети узорци је приказан у Табели 10. У просторну групу 1 (југо-западна група – Г1) спадају Гоч, Студена планина и Жељин, у групу 2 спадају Озрен и Стара планина (југо-источна група – Г2), док у групу 3 спадају Голија и Копаноник (централно југо-западна група – Г3). У зависности од надморске висине, Гоч, Студена планина и Озрен спадају у групу 1 (надморска висина испод 1000 m – планински регион – А1), док Жељин, Стара планина, Голија и Копаноник спадају у групу 2 (надморска висина изнад 1000 m – субалпски регион – А2).

Табела 9. Популације врсте *R. idaeus* укључене у AFLP анализу

Популација	Локалитет	Географска ширина (N)	Географска дужина (E)	Надморска висина (m)	Број јединки	Просторна група	Висинска група
П1	Гоч	43,57	20,73	675	22	Г1	A1
П2	Студена планина	43,52	20,64	983	19	Г1	A1
П3	Жељин	43,47	20,83	1357	15	Г1	A2
П4	Озрен	43,37	21,53	931	14	Г2	A1
П5	Стара планина	43,36	22,58	1710	19	Г2	A2
П6	Голија	43,19	20,25	1432	19	Г3	A2
П7	Копаоник	43,18	20,50	1985	20	Г3	A2
П8	Сорте	-	-	-	7		
					135		
Дивље популације					128		
Сорте питоме малине					7		

11.2. Изолација ДНК и AFLP анализа

Ради утврђивања генетичке варијабилности унутар и између популација, најпре је вршена је екстракција ДНК. Укупна ДНК је екстрахована из 20 mg листова који су осушени у силика гелу коришћењем GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Концентрација ДНК је мерена коришћењем Qubit Fluorometer (Invitrogen®). AFLP анализа је спроведена према протоколу који су описали Vos и сар. (1995), али са неколико измена (Carović-Stanko и сар., 2011). Ова метода се заснива на селективном умножавању подскупа рестрикционих фрагмената из смеше ДНК фрагмената добијених након дигестије геномске ДНК са рестрикционом ендонуклеазом. Полиморфизам се детектује на основу разлике у дужини умножених фрагмената. Ова техника подарзумева четири корака:

- (1) сечење ДНК молекула и спајање са олигонуклеотидним адаптерима
- (2) преселективно умножавање
- (3) селективно умножавање и
- (4) анализу умножених фрагмената на гелу.

Умножени ДНК фрагменти су дужине од 80 до 500 bp. Полиморфизам се бележи кроз присуство/одсуство продукта амплификације, што их сврстава међу доминантне маркере. Предности AFLP маркера се заснивају на великој заступљености широм генома, великој репродуцибилности, великом броју информативних трака по реакцији, као и чињеници да није потребна база података секвенци за дизајнирање прајмера. Недостаци ове методе су што захтева ДНК високе чистоће, као и доминантност алела.

Рестрикциона дигестија и лигација адаптера, пре-амплификација и селективна амплификација су спроведене у GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®). Комбинација четири прајмера је изабрана за амплификацију и то:

- VIC-EcoRI-ACG+Tru1I-CGA;
- NED-EcoRI-AGA+Tru1I-CAC;
- FAM-EcoRI-ACA+Tru1I-CAC и
- PET-EcoRI-ACC+Tru1I-CGA.

Припремљени узорци су детектовани уз помоћ ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Присуство или одсуство фрагмената је забележено на хроматограму са GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems®). Забележени су сви фрагменти између 50 and 500 bp. Добијени пикови су аутоматски пребачени у бинарну матрицу. Када је висина пика прелазила апсолутну вредност 50, према аутоматском подешавању доње границе амплитуде GeneMapper 4.0, пик је био забележен као присутан (1), у супротном забележен је као одсутан (0).

11.3. Статистичка анализа података

Диверзитет. Молекуларни диверзитет дивљих популација је добијен прерачунавањем пропорције полиморфних маркера (%P), Шеноновог информационог индекса (I), броја приватних маркера (N_{pr}) и индекса реткости (RI). Шенонов информациони индекс је прерачунат према следећој формули $I = -\sum(p_i \log_2 p_i)$, где p_i представља фенотипску фреквенцију (Shannon и Weaver, 1949; Lewontin, 1972). Учесталост вредности ниско-молекуларних маркера (DW ; Schönswetter и Tribsch, 2005) су израчунате коришћењем AFLPdat (Ehrich, 2006). Вредности су стандардизоване за добијање индекса реткости (RI; Winkler и сар., 2010). Пропорција полиморфних маркера (%P), Шенонов информациони индекс (I) и број приватних алела (N_{pr}) су такође израчунати за групу сорти малине.

Фреквенција алела на локусима AFLP маркера је прерачуната из посматране учесталости фрагмената, коришћењем Бајесове анализе описане од стране Zhivotovsky (1999) као што је примењено у AFLP-Surv v. 1.0 (Vekemans и сар., 2002) претпостављајући Харди-Вајнбергов еквилибријум, оправдан странооплодним природом врсте *R. idaeus*. Фреквенција алела је искоришћена у анализи генетичког диверзитета унутар (H_E) и између дивљих популација праћењем протокола који је описан од стране Lynch и Milligan (1994). Генетичка структура популације је описана у јединицама укупног генског диверзитета (H_T), просечног генског диверзитета унутар популација (H_W), просечног генског диверзитета између популација који је виши од оног забележеног унутар популација (H_B), и Wright-ове F_{ST} статистике.

РсоА. Удаљеност парова између појединих јединки је прерачуната коришћењем Dice-овог коефицијента (Dice, 1945). Анализа главних координата (PCoA) базирана на Dice-овој матрици удаљености је спроведена коришћењем PAST верзије 2.01 (Hammer и сар., 2001) како би се приказале везе између индивидуа.

Удаљеност дивљих популација/SplitsTree/NJ. Стандардна удаљеност генетичких парова између дивљих популација су прерачунате према Nei (1972). Neighbor-net дијаграм (Bryant и Moulton, 2004) је конструисан на основу генетичке матрице удаљености коришћењем SplitsTree 4 (Huson и Bryant, 2006).

Bootstrap вредности (Felsenstein, 1985) су базиране на 1000 понављања коришћењем AFLP-Surv и накнадно коришћењем у NEIGHBOR и CONSENSE програму софтверског пакета PHYLIP ver. 3.6b (Felsenstein, 2004).

Удаљеност сорти. Да би се утврдила веза између сорти конструисано је дрво сродности базирано на Dice-овој матрици удаљености. Стабло је укорењено на основу дивљих индивидуа. Статистичка подршка грана је тестирана анализом bootstrap вредности коришћењем 1000 понављања (Felsenstein, 1985). Прерачунавање је извршено коришћењем PAST верзија 2.01 (Hammer и сар., 2001).

Бајесова анализа структуре популације (BAPS). Присуство различитих еволуционих кластера између јединки је утврђено уз помоћ Бајесове анализе која се примењује у BAPS-у 6.0 (Corander и сар., 2003). Прва анализа је спроведена укључујући сорте, док су друга и трећа анализа обухватила само дивље популације. Друга анализа је спроведена без употребе географских координата популација („кластероване индивидуа“), док је за трећу коришћен овај предуслов („просторно кластероване индивидуа“; Corander и сар., 2008). BAPS је урађен са максималним бројем кластера (K) 20 и са понављањем од 10 пута. Најбоља вредност K процењена је коришћењем вредности маргиналних вероватноћа најбољих партиција и расподеле постериорних вероватноћа за различите K вредности. Резултати комбинованих анализа су искоришћени као улаз за додатну анализу популација (Corander и Marttinen, 2006), са подразумеваним подешавањима у циљу да се уочи мешање између кластера.

AMOVA. Анализа молекуларне варијансе (AMOVA; Excoffier и сар., 1992) је искоришћена за поделу укупног AFLP диверзитета (A) између група (дивље vs. гајене), између популацијама унутар група и унутар популација, (B) између и унутар дивљих популација, (C) између три просторне групе (само дивље популације), између популација унутар група и унутар популација, и (D) између две висинске групе (само дивље популације), између популација унутар група и унутар популација. Компоненте варијансе су тестиране статистички уз помоћ непараметарског рандомизацијског теста коришћењем 10000 пермутација уз примену Arlequin ver. 3.5.2.2 (Excoffier и Lischer, 2010). Упоредно упоређивање између популација које је спроведено уз помоћ AMOVA резултирало је у ϕST вредностима које су еквивалентне пропорцији укупне варијансе која је била подељена између две популације.

Изолација на основу удаљености/надморске висине. Израчунате су и тестиране корелације између (А) матрице природних логаритама географске удаљености (у km) између парова дивљих популација и матрица односа парова $F_{ST}/(1-F_{ST})$ и (Б) матрица висинске разлике (у m) и матрица односа парова $F_{ST}/(1-F_{ST})$. Као додатак, троструки Mantel тест (Ц) је примењен између матрица висинских разлика и матрица односа парова $F_{ST}/(1-F_{ST})$, узимајући у обзир географске удаљености између популација. Ниво значајности је достигнут након 10000 пермутација како је примењено у NTSYS-rc Ver. 2.02 (Rohlf, 1997).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

1. Преглед распрострањења и ценобиотичке припадности дивље малине

Типична вегетација природних станишта дивље малине су букове шуме, мешовите шуме букве и јеле, као и високопланинска вегетација пашњака (Аџић и сар., 2015). Брдски предели Србије и унутрашњег дела Балканског полуострва се карактеришу високим биодиверзитетом и импресивним природним пределима. Земљиште је недовољно искоришћено и већина пољопривредних површина су напуштене, укључујући полуприродне травњаке, односно ливаде и пашњаке (Дажич Стевановић и сар., 2008). Због тога, већина полуприродних ливада и пољопривредно-шумских типова вегетације у планинским пределима централног Балкана пролази кроз сукцесије према травњацима лошијег квалитета и жбунастим заједницама (Дажич Стевановић и сар., 2010), што доводи до губитка биодиверзитета и угрожености многих самониклих врста и природних ресурса, као што је дивље бобичасто воће.

Анализом вегетацијске базе листопадне шумске вегетације Балкана утврђено је присуство малине у састојинима заједница које синтаксономски припадају свези термофилних храстових шума *Quercion frainetto* централног Балкана у којој доминирају храстови *Quercus frainetto* и *Quercus cerris*. Заједнице ове свезе се развијају на топлим и отвореним стаништима на средњим надморским висинама од 200 до 800 m, где се развијају дубока, благо кисела земљишта.

Присуство малине је забележено у спрату жбунова у мешовитој светлој листопадној шуми *Ostryo-Quercetum petraeae* у којој доминирају китњак *Quercus petraea* и црни граб *Ostrya carpinifolia*. Поред малине у спрату жбунова се јављају и *Acer tataricum*, *Fagus moesiaca*, *Fraxinus ornus*, *Juniperus oxycedrus* и *Cotinus coggygria*. У спрату зељастих биљака као најчешће врсте се јављају *Brachypodium silvaticum*, *Chrysanthemum corymbosum*, *Dentaria bulbifera*, *Festuca drymeia*, *Festuca heterophylla*, *Galeobdolon luteum*,

Galium lucidum, *Gentiana asclepiadea*, *Helleborus serbicus*, *Melica ciliata*, *Oxalis acetosella*, *Primula columnae* и друге Ова заједница се развија на благо нагнутим, субтермофилним, експонираним теренима, у брдском региону на висинама између 600 и 800 m. Подлога је серпентинит на коме се јављају различити типови хумусно-силикатних или скелетних, смеђих земљишта (Lakušić и сар., 2005).

Присуство малине је забележено и у листопадној шуми *Quercus-Paeonietum officinalis-masculae* (*Quercion frainetto*) на планини Тари (Amidžić и Krivošej, 2001). Овим светлим шумама, у којима доминирају сладун *Quercus frainetto* и цер *Quercus cerris*, посебан печат у приземном спрату дају веома бројни бусенови две врсте божура *Paeonia officinalis* и *Paeonia mascula*. Поред малине у спрату жбунова се јављају и *Prunus mahaleb*, *Rhamnus cathartica*, *Corylus avellana*, *Crataegus monogyna*, *Juniperus communis* и друге. Спрат зељастих биљака је добро развијен, а као најчешће врсте се јављају *Festuca heterophylla*, *Thymus pulegioides*, *Briza media* и *Fragaria vesca*.

На Старој планини малина је забележена у заједници *Festucetum paniculatae* из свезе *Potentillo-Festucion paniculatae* Redžić ex Čarni et Mucina. Ова свеза обухвата пашњаке који се развијају на дубоким земљиштима на високим надморским висинама Балканског полуострва и распрострањени су од Динарских планина Хрватске све до Македоније и Бугарске на југу (Horvat и сар., 1974; Mišić и сар., 1978; Čarni и Mucina, 2015). Ово је флористички релативно богата високопланинска травна заједница у којој доминира *Festuca paniculata*. Станишта су флористички богата и јављају се многе ендемичне врсте. Најзначајније врсте које граде ову заједницу су *Anthoxanthum odoratum*, *Campanula rotundifolia*, *Centaurea velenovskyi*, *Chamaespartium sagittale*, *Festuca nigrescens*, *Fragaria elatior*, *Geum montanum*, *Hieracium pilosella*, *Luzula campestris*, *Peucedanum aequiradium*, *Thymus balcanus*, *Thymus praecox subsp. jankae* и *Vaccinium myrtillus*. Састојине ове заједнице се развијају претежно на силикатима, на висинама између 1300 и 2400 m (Lakušić и сар., 2005).

У источној Србији малина је распрострањена на серпентинским стаништима на којима се развијају заједнице свезе *Festucion valesiacaе* као што је заједница *Galio-Festucetum valesiacaе*. Ово је ксеротермна, ниска, отворена, травњачко-жбунаста заједница која се развија на плиткој црвеници на кречњаку. Најважније врсте су *Galium purpureum*, ксерофилне вишегодишње бусенасте траве *Festuca valesiaca* и *Andropogon ischaetum*.

Надморска висина је од 800 до 1000 m. Карактеристичне врсте ове заједнице су: *Achillea millefolium* subsp. *collina*, *Achillea pannonica*, *Andropogon ischaemum*, *Bromus squarrosus*, *Calamintha acinos*, *Cerastium brachypetalum*, *Euphorbia platyphyllos*, *Festuca valesiaca*, *Filipendula hexapetala*, *Fragaria collina*, *Galium pedemontanum* и *Galium purpureum* (Jovanović, 1955; Lakušić и сар., 2005; Аџић, 2018).

На сличним степоликим стаништима источне и југоисточне Србије развијају се заједнице из балканске свезе *Saturejion montanae* Horvat у Horvat и сар., 1974 која обухвата ксерофилне суве ливадске заједнице које се развијају на кречњаку. Малина је распрострањена у заједници *Potentillo-Caricetum humilis* Jovanović 1955, која припада овој свези. Ово је флористички богата степолика заједница која се развија на теренима на којима доминирају врсте трава као што су *Festuca valesiaca*, *Andropogon ischaemum*, *Chrysopogon gryllus*, *Stipa tirsia*, *Stipa pennata*, *Danthonia calycina*, а од осталих врста *Carex humilis*, *Achillea collina*, *Alectorolophus rumelicus*, *Anthoxanthum odoratum*, *Bromus squarrosus*, *Centaurea atropurpurea*, *Cephalaria laevigata* и *Chamaecytisus ciliates*. Заједница се развија на кречњаку, на плитким карбонатним црницама на висинама између 800 и 1200, ретко и до 1800 m (Lakušić и сар., 2005; Аџић, 2018).

Поред тога, малина је забележена и у заједницама Балканске свезе *Chrysopogono-Danthonion calycinae* Kojić 1957 која се развија на дубљим земљиштима, као што је заједница *Agrostio-Asphodeletum albae* Jovanović 1978. Ова флористички богата травњачка заједница развија се на силикатним теренима на којима доминира трава *Agrostis capillaris*. Заједница се развија на висинама између 160 и 1400 m и то углавном на заравнима или мање нагнутим падинама, на киселим земљиштима развијеним на различитим типовима силикатних стена углавном на станишту искрчених шума климатогених заједница свезе *Quercion frainetto*. Карактеристичне врсте заједнице *Agrostio-Asphodeletum albae* су *Achillea millefolium*, *Agrimonia eupatoria*, *Agrostis capillaris*, *Alectorolophus major*, *Alopecurus pratensis*, *Anthoxanthum odoratum*, *Asphodelus albus*, *Campanula patula*, *Carex verna*, *Carlina acaulis*, *Centaurea jacea*, *Centaurea phrygia*, *Centaurea solstitialis*, *Cerastium banaticum*, *Chrysanthemum leucanthemum*, *Cynosurus cristatus*, *Dorycnium herbaceum*, *Eryngium campestre*, *Euphorbia cyparissias*, *Ferulago sylvatica*, *Festuca pratensis*, *Festuca valesiaca*, *Filipendula hexapetala* и *Fragaria vesca* (Mišić и сар., 1978; Lakušić и сар., 2005; Аџић, 2018).

Малина је распрострањена и у високопланинским ливадским заједницама у којима доминира тврдача *Nardus stricta*. Ово су затворене, флористички релативно богате заједнице у којима се налазе и врсте као што су: *Crocus veluchensis*, *Silene sendtneri*, *Anthoxanthum odoratum*, *Festuca nigrescens*, *Viola dacica*, *Luzula campestris*, *Potentilla erecta*, *Ranunculus montanus*, *Vaccinium myrtillus*, *Rumex acetosella*, *Ornithogalum collinum*, *Thymus balcanus*, *Vaccinium vitis-idaea*. Заједница *Nardetum strictae* и сличне се развијају углавном на силикатима, ређе на кречњаку или серпентиниту, на надморским висинама између 800 и 2000 m. Ове заједнице по правилу представљају секундарне облике вегетације развијене на местима некадашњих храстових и букових шума и припадају свези *Potentillo ternatae-Nardion* Simon 1958 (Мишић и сар., 1978; Лакушић и сар., 2005).

На основу анализе „Станишта Србије“ (Лакушић и сар., 2005) утврђено је присуство дивље малине у различитим, пре свега, четинарским, мешовитим и жбунастим заједницама планинског и алпијског појаса.

Дивља малина се јавља у вечно зеленим субалпијским вриштинама и жбунастим стаништима која се налазе на надморској висини изнад 1500 m. На овим локалитетима малина се налази у жбунастим формацијама са клекама у заједницама *Daphno alpini-Juniperetum sibiricae*, *Vaccinio-Juniperetum sibiricae*, *Piceo subalpinae-Vaccinio-Juniperetum*, *Vaccinio-Junipero-Piceetum subalpinum*. Наведене формације се јављају на надморским висинама између 1700 и 2000 m, на силикатној геолошкој подлози, ретко на кречњацима, што су на простору Србије следећи локалитети: Сува и Стара планина, као и Копаоник. Главни едификатори спрата жбунова су врсте *Juniperus nana* и *Juniperus intermedia*, *Picea excelsa* subsp. *subalpina*. У овим заједницама су честе и следеће врсте: *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium uliginosum*, *Vaccinium vitis-idaea*, као и врсте *Campanula abietina*, *Campanula patula*, *Euphorbia amygdaloides*, *Gentiana lutea*, *Luzula silvatica*, *Poa violacea*.

Едификаторску улогу малина има у мешовитим жбунастим заједницама са клекама и листованим жбуновима, у заједници *Rubeto-Geranietum macrorrhynzi*, где су поред малине едификатори и врсте *Rosa spinosissima*, *Rhamnus saxatilis*, *Juniperus nana* и *Juniperus intermedia*. Поменуте формације се јављају на Сувој планини, на надморској висини између 1500 и 1700 m, на кречњацима.

Присуство малине је забележено и у субалпијским и оробореалним жбунастим стаништима на Копаонику и Старој планини где се јавља у заједницама *Salici-Alnetum viridis*, *Junipero-Salicetum silesiaca*, *Salicetum waldesteinianae dinaricum*, *Vaccinio-Salicetum appendiculatae*. У овим заједницама доминирају *Salix silesiaca*, *Salix appendiculata*, *Salix waldsteniana* и *Alnus viridis*. Развијају се на силикатној, карбонатној или серпентинској геолошкој подлози, на надморским висинама од 1300 до 2000 m.

Станишта која су распрострањена широм Србије, а у којима такође има дивље малине јесу субконтиненталне и континенталне листопадне шикаре, која се углавном налазе у клисурама. На простору Војводине се јавља на стаништима централноевропске субконтиненталне листопадне шикаре, али са малом бројношћу и то у заједницама *Crataego-Prunetum spinosae*, *Pruno spinosae-Crataegetum*, *Pruno spinosae-Crataegetum*, *Prunetum spinosae*, *Rhamno cathartici-Prunetum spinosae*, где доминирају врсте *Crataegus monogyna*, *Prunus spinosa* и *Prunus fruticosa*.

Занимљиво је да се дивља малина може наћи и на стаништима крајречних шума јове. На Голији и у околини Сјенице се може наћи на стаништима сиве јове у заједницама *Alnetum incanae*, *Oxali-Alnetum incanae*, *Alnetum glutinosae-incanae* и другим. У овим заједницама су доминантне следеће врсте *Alnus incana*, *Alnus glutinosa* и *Oxalis acetosella*.

Широм Србије малина се може наћи на стаништима букових шума у заједницама као што су *Fagetum submontanum*, *Festuco drymeiae-Fagetum submontanum*, *Quercu-Fagetum*, *Fagetum moesiaca montanum*, *Aceri heldreichii-Fagetum*, *Corylo colurnae-Fagetum*, *Fagetum montanum*, *Aceri heldreichii-Fagetum*, *Fagetum subalpinum serbicum*. Ове заједнице се јављају на Озрену, Ртњу, Старој планини, Власинској висоравни, Сувој планини, Маљену, Повлену, Жељину, Копаонику, Хомољским планинама, Голији, Јавору, Гочу, и тд. Најчешћи пратиоци букве од дрвенастих врста у овим заједницама су *Acer cheldreichii*, *Acer tataricum*, *Fraxinus ornus*, *Quercus cerris*, *Quercus petraea*. Понекад буква доминира у толикој мери да спратови жбунова и зељастих биљака потпуно недостају. Најчешће зељасте биљке су *Aegopodium podagraria*, *Allium ursinum*, *Anemone nemorosa*, *Blechnum spicant*, *Epilobium montanum*, *Impatiens noli-tangere*, *Melica uniflora*, *Festuca heterophylla*, *Vaccinium myrthyllus*.

На надморским висинама између 50 и 1100 m дивља малина се често јавља на стаништима термофилних храстових шума у заједницама *Carpino orientalis-Quercetum cerris*, *Farneto-Quercetum*, *Orno-Quercetum petraea*, *Ostryo-Quercetum cerris*, *Quercetum cerris*, *Quercetum montanum petraea*, *Quercetum sessiliflorae*, које се налазе на Гочу, Студеној планини, Столовима, Златибору и Авали. У овим заједницама апсолутно доминирају следеће врсте: *Quercus petraea*, *Quercus cerris*, *Quercus pedunculiflora*, *Quercus daleschampi*, а честе су и врсте *Fraxinus ornus*, *Carpinus orientalis* и *Ostrya carpinifolia*. Малина је слабо заступљена у заједницама китњака и црног граба на серпентиниту (*Ostryo-Quercetum petraeae serpentinicum*) које су распрострањене на Гочу.

На простору Косова и Копаоника малина се јавља у заједницама *Abieti-Piceetum bertisceum*, *Abieti-Piceetum serbicum* и *Blechno-Abietetum* на надморској висини од 1100 до 1700 m. Доминантне врсте у овим заједницама су јела и смрча, а поред њих честе су и *Fagus moesiaca*, *Pinus peuce*, *Betula pendula*, *Acer pseudoplatanus*, *Sorbus aucuparia*, *Salix caprea*, *Lonicera xylosteum* и *Rubus idaeus*.

На простору Суве и Старе планине јавља се и на стаништима смрчевих шума у заједницама *Piceetum excelsae montanum serbicum*, *Piceetum excelsae serbicum*. У овим шумама доминира смрча, док су спратови дрвећа, жбунова и зељастих биљака флористички углавном сиромашни. Може се рећи да су релативно честе следеће врсте: *Vaccinium vitis-idaea*, *Luzula sylvatica*, *Luzula luzuloides*, *Mnium cuspidatum*, *Abies alba*, *Bruckenthalia spiculifolia*, *Campanula patula*, *Crocus veluchensis*, *Fagus moesiaca* и *Gentiana asclepiadea*. Ове заједнице се развијају на киселим силикатним земљиштима.

Прегледом литературних података присуство дивље малине је забележено и на стаништима борових шума. На Косову (надморска висина од 1500 до 2100 m) малина се јавља у шумама молике у заједницама као што су *Piceo-Pinetum peucis*, *Pinetum peucis*, *Potentillo-Pinetum peucis*, *Pinetum peucis calcicolum*, *Ajugo pyramidalis-Pinetum peucis* М. Јанковић et Богојевић 1962 *mugetosum* Стевановић, Јовановић, Јанковић 1994. У овим формацијама доминира молика, а у спрату жбунова и приземном спрату се са великом покровношћу јављају и врсте *Vaccinium myrtillus*, *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus mugo*, *Wulfenia bleicicii*, *Ajuga pyramidalis* и *Potentilla verna*. Такође, малине има и у мешовитим шумама мунике и молике у заједницама *Pinetum heldreichii-peucis scardicum*, *Pineo-Pinetum peucis mixtum* и *Pineto peucis-Piceetum excelsae-Vaccinio myrtyllae*.

У овим заједницама доминирају муника (*Pinus heldreichii*) и молика (*Pinus peuce*), а и спратови жбунова и зељастих биљака су релативно богати и у њима су најчешће следеће врсте: *Anemone nemorosa*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Bruckenthalia spiculifolia*, *Dactylus hispanica*, *Fraxinus excelsior*, *Hieracium sylvaticum*, *Juniperus communis*, *J. nana*, *Leucanthemum vulgare*, *Luzula nemorosa*, *Thymus jankae* и *Vaccinium myrtillus*.

На надморској висини између 600 и 1600 m, на Гочу, Старој планини, Јастребцу, Копаонику, Жељину, Сувој планини, Ртњу, Златару, Голији, дивље малине има у мешовитим буково-јеловим шумама у заједницама као што су *Abieti-Fagetum moesiicum*, *Corylo colurnae-Abieti-Fagetum*, *Carpino betuli-Abieti-Fagetum*, *Abieti-Fagetum calcicolum*, *Abieti-Fagetum serpentanicum*, *Vaccinio myrtilli-Fago-Abietetum*, *Abieti-Fagetum silicicolum*, *Carpino betuli-Abieti-Fagetum*, *Piceo-Fago-Abietetum*. У наведеним заједницама доминирају буква и јела, али се са великом бројношћу јављају и *Acer visianii*, *Corylus colurna*, *Carpinus betulus*, *Ilex aquifolium*, *Acer pseudoplatanus* и *Picea excelsa*. Приземни спрат је добро развијен и у њему се са великом бројношћу јављају врсте *Luzula luzuloides*, *Luzula sylvatica*, *Festuca drymeja*, *Poa nemoralis*, *Polypodium vulgare*, *Cardamine trifolia*, *Vaccinium myrtillus* и *Epimedium alpinum*. На Тари, присуство малине је забележено на стаништима у мешовито буково-јелово-смрчевим, буково-јелово-борово-омориковим и буково-јелово-смрчево-омориковим шумама у заједницама као што су *Piceo-Fago-Abietetum*, *Omorikae Piceeto-Abieto-Fageto-Pinetum mixtum*, *Omorikae Piceeto-Abieto-Fageto-Pinetum nigrae*, *Piceo omorikae-abietis-Abieti-Pinetum serpentanicum* и *Piceo omorikae-abietis-Abieti-Fagetum*, на надморским висинама између 1000 и 1100 m. У овим заједницама доминирају врсте *Abies alba*, *Picea abies*, *Fagus sylvatica*, *Picea omorika*, *Pinus nigra* и *Pinus sylvestris*. Остале високо фреквентне врсте су *Acer pseudoplatanus*, *Alnus glutinosa*, *Betula pendula*, *Picea abies*, *Fraxinus ornus*, *Lonicera nigra*, *Ostrya carpinifolia*, *Populus tremula*, *Rosa pendulina*, *Salix caprea*, *Sorbus aucuparia*, *Geranium robertianum*, *Oxalis acetosella*, *Potentilla erecta* и *Vaccinium myrtillus*.

На основу прегледа база вегетације и приручника „Станишта Србије“ евидентирано је да се малина налази у малом броју (пет) зељастих, али зато у великом броју листопадних (у преко 200 заједница), жбунастих и четинарских заједница (око 100 заједница где су едификатори четинари).

Малина је најбројнија на стаништима букових шума, али је честа и на стаништима термофилних храстових шума. Велика бројност дивље малине је забележена у јеловим и смрчевим заједницама, као и жбунастим четинарским заједницама где је едификатор клека.

2. Етноботаничка истраживања

Анализом етноботаничких упитника који су спроведени на девет локалитета широм ЈЗС и ЈИС откривени су занимљиви подаци о употреби дивље малине, од којих су неки потпуно нови за простор Србије, али и Балканског полуострва. Резултати података прикупљених од испитаника показју да се дивља малина користи за припремање различитих традиционалних производа, као и у медицинске и превентивне сврхе (Табела 10). Забележена су различита народна имена за малину у различитим истраживаним подручјима. Највише испитаника користи управо име „малина“, док се назив „женска биљка“ користи само на истраживаном локалитету Власина. Осим најуобичајенијег назива („малина“), „црвена купина“ је друго по учесталости (12,9% испитаника), затим следе дивља малина (9,6%) и ситна купина (5,2%). На готово свим локалитетима испитаници су навели да користе и лист и плод. Лист се користи у народној медицини за третирање, али и превенцију различитих здравствених тегоба (стомачни проблеми – дијареја, упала простате, анемија, прехлада, у току трудноће/дојења – за превенцију побачаја, као и за подстицај лактације, очне болести, унапређење имунитета, гинеколошка обољења). Забележена је и употреба дивље малине у козметици – одварак од целог изданка малине се на простору Гоча користи као купка, док се изгњечени плодови на подручју Голије користе за масажу. Испитаници са свих локалитета су навели да плодове користе за припрему различитих традиционалних производа (сок, слатко, алкохолна пића, колачи). На питање да ли сакупљају друго шумско воће, на свим локалитетима добијен је позитиван одговор. Највише различитих шумских плодова се сакупља на простору Гоча (дивља јабука, дивља крушка, дивља трешња, купина, трњина, шипурак и шумска јагода), а на осталим локалитетима се осим набројаних сакупљају још и боровница и брусница. Од сакупљених шумских плодова се праве различити традиционални производи (сок, слатко, ликери), а користе се и као додатак посластицама.

Табела 10. Употреба дивље малине на истраживаним локалитетима у народној медицини и у исхрани

Локалитет	Локални (народни) назив за дивљу малину	Део биљке који се користи	Употреба листа у народној медицини	Употреба у козметици	Традиционални производи који се праве од плодова	Друго самоникло воће које се сакупља
Студена планина	Малина, црвена купина	Лист, плод	Стомачни проблеми, упала простата	/	Сок, слатко, алкохолна пића, колачи	Боровнице, дивље јабуке, дрењине, купине, шипурак, шумске јагоде
Жељин	Малина, ситна купина	Плод	/	/	Сок, слатко, алкохолна пића, колачи	Боровнице, дрењине, клека, купине, шумске јагоде
Гоч	Малина, милина	Цео изданак, лист, плод	Упала простате, стомачни проблеми, анемија	Купка	Сок, алкохолна пића	Дивље јабуке, дивље крушке, дивља трешња, купине, трњине, шипурак, шумске јагоде
Голија	Малина, црвена купина	Лист, плод	Стомачни проблеми	Мацерирани плодови за масажу	Сок, слатко, алкохолна пића, колачи	Боровнице, дрењине, клека, купине, шумске јагоде
Копаоник	Малина, црвена купина	Лист, плод	Стомачни проблеми, упала простате	/	Сок, слатко, алкохолна пића, колачи	Боровнице, дрењине, клека, купине, шипурак, шумске јагоде
Стара планина	Малина, дивља млина	Лист, плод	Анемија, прехлада	/	Сок, слатко, алкохолна пића	Боровнице, бруснице, дрењине, клека, купине, шумске јагоде
Озрен	Малина, црвена купина	Лист, плод	Стомачни проблеми, анемија, у току трудноће/дојења, очне болести	/	Сок, слатко	Купине, шумске јагоде
Ртањ	Малина	Лист, плод	Анемија, стомачни проблеми (дијареја), у току трудноће/дојења (превенција побачаја), очне болести	/	Безалкохолна (сок) и алкохолна (ликер) пића, слатко	Боровнице, дрењине, купине, шумске јагоде
Власинска висорава	Малина, женска биљка	Лист, плод	Имунитет, стомачни проблеми (дијареја), у току трудноће/дојења (превенција побачаја), гинеколошка обољења, очне болести	/	Безалкохолна (сок) и алкохолна (ликер) пића, слатко, колачи (торта са малинама, штрудла)	Боровнице, купине, шумске јагоде

На бази Fisher-овог теста (Табела 11), статистички значајна разлика је уочена између локалитета и старосне границе, као и нивоа образовања, док не постоји статистички значајна разлика у односу на пол. Макролокалитети – већа географска подручја: југозападна (ЈЗС) и југоисточна Србија (ЈИС) су слични по демографским карактеристикама. Високо-значајна разлика је утврђена за старосну групу. Приметно је да на подручју ЈИС нема испитаника испод 50 година, док је више од половине испитаника из ЈЗС старости испод 50 година. Деведесете године XX века у Србији су карактерисали неповољни друштвени и демографски фактори, као и неравномеран регионални развој (Todorović и Drobñjaković, 2010). Последице тога су низак наталитет, висок морталитет, миграције младих као и средовечних, образованих људи. Овај тренд је настављен и касније, а као посебно угрожено подручје се помње ЈИС, где је просечна старост становништва преко 50 година (<http://www.stat.gov.rs/>). Према попису становништва из 2011. године, око хиљаду насеља у Србији има испод 100 становника, а највећа концентрација тих насеља је у ЈИС. Наведени подаци су један од узрока за поменућу старосну структуру на истраживаним локалитетима.

Табела 11. Веза између демографских карактеристика испитаника и испитиваних подручја (Fisher тест)

Демографске карактеристике	Локалитет	Макролокалитет
Пол	0,978	0,651
Старост	0,000	0,000
Степен образовања	0,005	0,665

Анализом одговора добијених на питање који део дивље малине користе, лист и плод су најчешће у употреби. Само један испитник са Гоча је навео употребу целог изданка малине за припрему купке. Према његовим наводима, купка од изданка малине благотворно делује на изглед коже. Ако упоредимо макрорегионе, сув лист се више користи на подручју ЈИС него ЈЗС.

Fisher-ов тест (Табела 12) је показао да се употреба плода статистички не разликује између локалитета и макрорегиона док употреба сувог и свежег листа показује статистички значајну разлику у зависности од локалитета и макрорегиона. Готово сви испитаници (95,7%) користе плод, док половина такође користи и суве листове, а мали проценат интервјуисаних користи свеже листове.

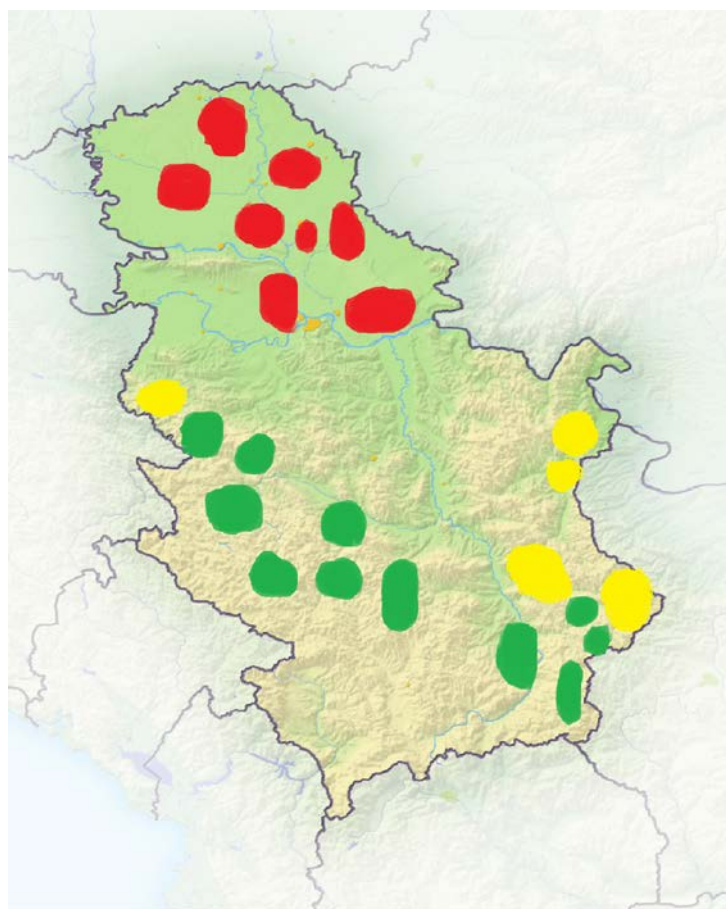
Не постоји статистички значај утицаја пола и степена образовања испитаника на употребу различитих делова дивље малине. Статистички значајна разлика је уочена у употреби листова дивље малине у односу на старосну групу (Табела 12). Углавном су млађи испитаници наводили да сув лист користи за третирање мањег броја обољења, највише за лечење стомачних тегоба. Старији испитаници су наводили употребу сувог листа за лечење већег броја обољења и делом за исхрану домаћих животиња.

Табела 12. Повезаност између употребе различитих делова биљке и изабраних променљивих на бази Fisher – овог теста

Део биљке	Локалитет	Макролокалитет	Пол	Старост	Степен образовања
Плод	0,061	0,808	0,577	0,954	0,789
Сув лист	0,000	0,000	0,109	0,001	0,569
Свеж лист	0,035	0,029	0,987	0,019	0,483

Испитаници су наводили да чај од сувих листова малине помаже у третману различитих обољења (Табела 13), али је најприсутнија употреба за лечење стомачних проблема, олакшавање стомачних болова и третман дијареје. Осим стомачних проблема, чај од листа малине се користи и против упале простате, за побољшање крвне слике (третман анемије) и имунитета, за санирање различитих гинеколошких обољења од којих су испитаници најчешће наводили вагинитис, у току трудноће за превенцију побачаја, у току дојења за подстицај лактације, као и за спољашњу употребу код упале ока. Генерално, суви лист се више користи у ЈИС него у ЈЗС.

Током етноботаничких истраживања, на простору ЈИС уочена је ангажованост људи око сакупљања лековитог биља, а између осталих и дивље малине. Иначе, југоисточна Србија се сматра центром за сакупљање, откуп и промет лековитог и ароматичног биља (Слика 10). Ова делатност представља значајан извор прихода, јер је загарантована продаја сакупљеног биља великим фирмама које се баве прерадом и производњом хербалних чајева. На овим просторима је знање о лековитом биљу дубоко утемељено у народу и преноси се са генерације на генерацију.



Слика 10. Производња и сакупљање лековитог биља у Србији: **црвено** – гајење лековитог биља; **жуто** – сакупљање дивљих биљака; **зелено** – зоне које су богате лековитим биљем које се спорадично сакупља

Табела 13. Анализа података употребе листа дивље малине у народној медицини

Медицинаска употреба	Локалитет							Макролокалитет			
	Студена планина	Жељин	Гоч	Голија	Копаоник	Стара планина	Озрен	Ртањ	Власина	ЈЗС	ЈИС
Стомачни проблеми	4 (66,7%)	0 (0%)	2 (50%)	1 (100%)	2 (100%)	0 (0%)	7 (100%)	7 (70%)	5 (55,6%)	9 (69,2%)	19 (61,2%)
Упала простате	2 (33,3%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (30,8%)	0 (0%)
Анемија	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (60%)	0 (0%)	5 (50%)	2 (22,2%)	1 (7,7%)	10 (32,3%)
Имунитет	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (33,3%)	0 (0%)	5 (16,1%)
Гинеколошка обољења	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (33,3%)	0 (0%)	3 (9,7%)
Трудноћа	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)	2 (20%)	6 (66,7%)	0 (0%)	9 (29%)
Дојење	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	3 (33,3%)	0 (0%)	4 (12,9%)
Упала ока	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	3 (33,3%)	0 (0%)	7 (22,6%)

Проценти су базирани на испитаницима који су дали најмање један позитиван одговор

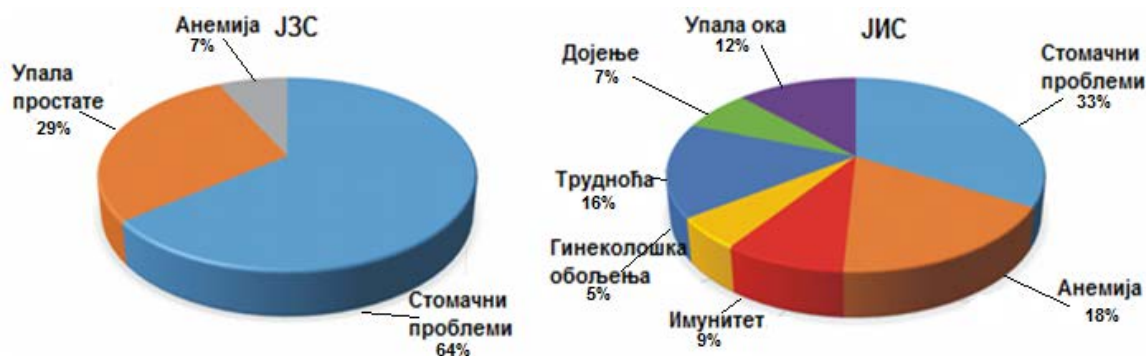
Малина се у Србији користи на мање-више сличан начин као и у осталим европским земљама. Постоје подаци да се лист малине користи као антигонотропик (зуставља дејство фоликул стимулирајућег и лутеинизирајућег хормона), антивирусни лек, за третман упале крајника, коњуктивитис, дијабетес и повишен крвни притисак (Ritch-Krc и сар., 1996), али се чешће користи против прехладе, грипа, дијабетеса, менструалних болова, дијареје и грчева (Gudej и Tomczyk, 2004). Šukand и Pieroni (2016) су указали да се на подручју Румуније и Украјине чај од гранчица малине користи за третирање грознице и прехладе.

Прегледом етноботаничких података за регион Балканског полуострва и Србије, забележено је да се листови купине и малине широко користе за припреме чајева (Jarić и сар., 2007) за јачање имунитета, третирање анемије и бола у грлу (Zlatković и сар., 2014), заустављање крварења (Jarić и сар., 2015), као и против дијареје и за испирање уста и ждрела (Menković и сар., 2014). Pieroni и сар. (2017) су указали на употребу листа малине као „лека за све“. Генерално, лист купине је више у употреби од листа малине, при чему се се наводи више болести, као што су респираторни проблеми, јачање апетита, зарастање рана, против дијареје, и за испирање уста и ждрела (Redžić и Ferrier, 2014).

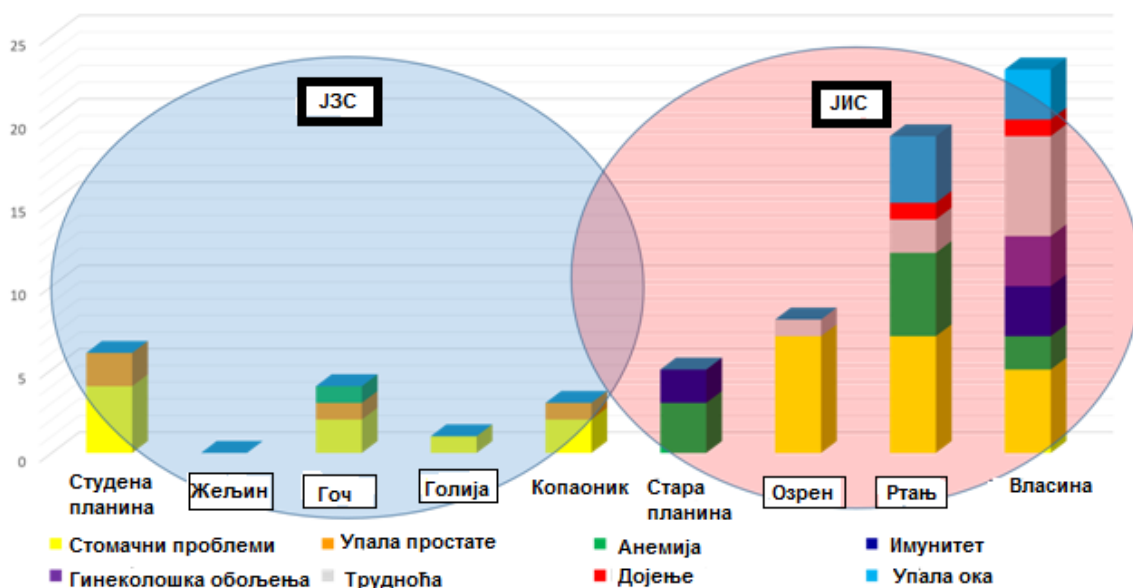
У приказаној студији, уочена је разлика у употреби сувих листова између макролокалитета. На подручју ЈЗС, значајна употреба сувих листова је забележена на свим подручјима, осим Жељина, где нико од испитаника није навео употребу листова малине. Овакав резултат се може објаснити чињеницом да је велики број становника мигрирао према градским срединама (<http://www.stat.gov.rs/WebSite/Public/ReportView.aspx>) и последично, приметан је губитак традиционалних знања.

На подручју ЈЗС четвртина испитаника (25%) је навела да користи суви лист. Последично, мали је и број болести за чији третман се користи чај од сувих листова малине (стомачни проблеми, упала простате, као и третман анемије). У ЈИС, више од 78% испитаника користи суве листове малине као народни лек. Једино на локалитету Стара планина евидентан је нешто мањи проценат људи који користе суве листове дивље малине (45,5%), што вероватно има везе са традицијом прикупљања бобичастог воћа, које је више распрострањено него сакупљање лековитог биља од стране локалног становништва овог краја (Peters и Dajić, 2006).

На подручју ЈИС где се листови малине више користе, забележена је и шира примена у лековите сврхе. Тако се само за ово подручје, наводи употреба листа за побољшање имунитета, код упале ока, у току трудноће/дојења, код различитих гинеколошких обољења, за третман анемије и стомачних проблема (Графикон 3 и 4; Табела 13). Као што је већ наведено, разлог за разлику између макролокалитета у употреби листа малине вероватно лежи у чињеници да се велики број локалних становника у ЈИС бави сталним или повременим прикупљањем дивљег биља, из комерцијалних разлога или за сопствену употребу. Свакако, овај крај Србије је познат као највећи центар за прикупљање лековитог и ароматичног биља, и познат и признат због дуге традиције употребе биљака у народној медицини (Dajić-Stevanović, <http://www.amapseec.com/Herbal%20sector%20of%20Serbia%20overview.pdf>).



Графикон 3. Употреба сувих листова дивље малине у лековите сврхе на простору ЈЗС и ЈИС



Графикон 4. Разлике у употреби листа дивље малине на истраживаним подручјима

Занимљиво је да је употреба малине за стомачне проблеме готово једнако поменута на оба макролокалитета, али је конкретније наведена за подручје ЈЗС. У ЈИС велики број испитаника је поменуо употребу чаја од малине током трудноће (превенција побачаја и употреба приликом дојења је поменута на неколико истраживаних локалитета), као и употреба за нека гинеколошка обољења (углавном упала јајника и вагинитис). У складу са тим, локални назив „женска биљка“ је забележен само на подручју ЈИС, и то на локалитету Власинска висораван.

У региону ЈЗС забележена је употреба малине у козметици. Један испитаник са подручја Гоча је навео употребу одварка од целог изданка малине као купке у циљу неге коже. Мештани Голије и подголијских села који су интервјуисани су наводили употребу плодова дивље малине за масажу. Бројни испитаници са простора ЈЗС су навели употребу чаја од малине за третман упале простате, што није забележено код испитаника са простора ЈИС.

Упоређивањем одговора који су евидентирани током спроведених етноботаничких истраживања, јасно је било да постоји разлика у употреби сувог листа дивље малине. Ова запажања су потврђена испитивањем статистичке значајности.

Добијени резултати указују да постоји статистички значајна разлика у већини наведених медицинских употреба сувог листа дивље малине између локалитета и макролокалитета (Табела 14). Као главне разлике је потребно истаћи употребу код упале простате на простору ЈЗС, док је на простору ЈИС забележена употреба код различитих гинеколошких обољења, затим у току трудноће и дојења, као и код упале ока. Ово су уједно и нови подаци о медицинској употреби листа дивље малине на простору Србије.

Табела 14. Веза између употреба листова дивље малине и подручја истраживања (Fisher тест)

Употреба у народној медицини	Локалитет	Макролокалитет
Стомачни проблеми	0,000	0,003
Упала простате	0,002	0,003
Анемија	0,001	0,001
Имунитет	0,009	0,014
Гинеколошка обољења	0,006	0,008
Трудноћа	0,000	0,000
Дојење	0,013	0,035
Упала ока	0,000	0,002

Нико од испитаника није споменуо да користи плодове малине у народној медицини, за разлику од података за купину која се користи за третирање анемије (Šavikin и сар., 2013). У ЈЗС је забележена употреба плодова у козметици. Неколико испитаника са подручја Голије су навели да користе мацериране плодове за масажу тела. Голија је иначе позната као планина на којој се становништво углавном бави пољопривредом, посебно гајењем кромпира, као и јабуке, малине и шљиве (<https://www.zanimljivedestinacije.info/lepote-srbije/306-park-priode-golija.html>).

На оба макролокалитета забележена је значајна употреба других дивљих воћака, као што су купина, шумска јагода, шипурак, боровница, дивља јабука, трњина, клека, дивља крушка и дивља трешња. Ови плодови се користе на сличан начин као што је забележено за дивљу малину, углавном за припрему различитих традиционалних производа.

Генерално, употреба малине у традиционалној медицини је широко присутна на оба макролокалитета. Знање о употреби лековитог биља се преносило са генерације на генерацију, с обзиром на дугу употребу лековитог биља код Словена (Јарић и сар., 2011).

За разлику од ранијих етноботаничких студија за подручје Србије и Балкана (Јарић и сар., 2007; Pieroni и сар., 2017), добијени резултати указују на неке нове начине коришћења ове биљке у лековите сврхе, као и примену у козметици. Нови подаци о употреби сувих листова малине се односе на лечење запаљења простате (на основу анкета са подручја ЈЗС), као и употребу надземних делова биљке за припрему одварка који служи као купка, док се плодови користе за масажу. Нови подаци о употреби листа против упале ока, за лечење неких гинеколошких обољења, употреба током трудноће (превенција побачаја) и периода дојења су забележене на простору ЈИС, а што се може и довести у везу са локалним називом за дивљу малину на овом подручју („женска биљка“). Плодови малине су присутни на светском и локалним тржиштима воћа, а служе и за припрему различитих индустријских производа, као и традиционалних домаћих производа (Catillo, 2006). Малине се широко користе на Балкану (Pieroni и сар., 2017) и у Србији (Јарић и сар., 2015; Šavikin и сар., 2013), углавном у ЈЗС, региону познатом по гајењу малина, где су сорте малине „Meeker“ и „Willamette“ најзаступљеније (Nikolić и сар., 2008).

Добро је познато да су широм Србије од традиционалних производа који се припремају од свежег и замрзнутог воћа, тако и од малине, најзаступљенији следећи: сок, сируп, ликер, ракија, вино, каше, мармелада, џем, компот, кандирано воће, колачи, пите, торте, као и традиционални српски производ слатко (<http://alternativa-zavvas.com/index.php/clanak/article/malina>).

Раније студије су указале на значај очувања и употребе генетичких ресурса воћа у традиционалној исхрани (Dajić-Stevanović и сар., 2014). Pieroni и сар. (2017) су показали да се на подручју Косова дивља малина користи свежа у исхрани, или се од плодова праве сок и вино. Söukand и сар. (2015) су навели да се на подручју Источне Европе праве ферментисани производи од листова и плодова малине (ракија, туршија, вино). Dei Cas и сар. (2015) су указали на употребу малине (дивље и култивисане) у Италији, где се плодови конзумирају свежи или се од њих прави џем.

Приказани резултати спроведеног истраживања указују да је најшира употреба малине на подручју централног Балкана (територија Србије) у исхрани. Осим конзумирања свежег воћа, плодови дивље малине се користе за припремање широког спектра традиционалних производа, у првом реду безалкохолних пића (углавном сок – сируп), затим традиционалног српског производа слатко, послastiца и алкохолних пића (Табела 15; Графикон 5).

Табела 15. Анализа употребе плодова дивље малине у традиционалној производњи хране и пића

Употреба	Локалитет							Макролокалитет			
	Студена планина	Жељин	Гоч	Голија	Копаоник	Стара планина	Озрен	Ртањ	Власина	ЈЗС	ЈИС
Безалкохолна пића	90,9%	100%	80%	90%	100%	100%	100%	87,5%	100%	92%	97,4%
Алкохолна пића	27,3%	30%	10%	10%	11,1%	54,5%	0%	37,5%	50%	18%	35,9%
Слатко	27,3%	30%	10%	70%	77,8%	81,8%	60%	62,5%	70%	42%	69,2%
Посластице	36,4%	100%	80%	60%	33,3%	27,3%	0%	0%	50%	62%	20,5%

Проценти су базирани на испитаницима који су дали бар један позитиван одговор.



Графикон 5. Употреба плодова малине као хране и напитака

Употреба плодова малине је подједнако заступљена на оба макролокалитета (ЈЗС 96,2%, ЛИС 95,1%). Припрема сока – сирупа је веома заступљена на оба макрорегиона. Осим ове примене, приметно је да се плодови дивље малине на подручју ЛИС више користе за производњу алкохолних пића, а мање за припрему посластица, него на подручју ЈЗС (Графикон 6), што има везе са близином становништва муслиманске вероисповести на истраживаним локалитетима Голија, Копаоник, Студена планина, Жељин. Познато је да муслиманска вера забрањује конзумирање алкохола, па је утицај бошњачке културе имао утицај на добијене резултате.



Графикон 6. Разлике у употреби плодова дивље малине на подручју ЈЗС и ЈИС

Статистичка обрада података (Табела 16) показала је да је употреба безалкохолних пића подједнако заступљена на оба макролокалитета (разлике нису статистички значајне). Употреба плодова дивље малине за припрему посластица је заступљенија на подручју ЈЗС. Употреба плодова за прављење алкохолних пића и слатког је чешћа у ЈИС (Табела 15).

Табела 16. Веза између употребе плодова дивље малине и локалитета или макролокалитета на бази Fisher-овог теста

Употреба у исхрани	Локалитет	Макролокалитет
Безалкохолна пића	0,180	0,726
Алкохолна пића	0,038	0,009
Слатко	0,013	0,021
Посластице	0,000	0,000

Како је већ поменуто, коришћење плодова за припрему различитих посластица је много више заступљено на подручју ЈЗС. На овом макролокалитету, шири је и спектар посластица које се праве са додатком плодова малине (штрудла, баклава и торта са

малинама), за разлику од подручја ЈИС, где испитаници нису истицали употребу дивље малине у изради послastiца. Овакав резултат се може објаснити чињеницом да се на подручју ЈЗС малина интензивно гаји и употребљава. Податак коришћења малине у баклави (Bardenstein, 2010), традиционалној турској послastiци на подручју ЈЗС, може се објаснити близином и утицајем становништва муслиманске вероисповести (Бошњака), који живе на подручју Санцака. Овај утицај може такође бити узрок мање употребе плодова за припрему алкохолних пића на овом подручју.

Добијени резултати представљају нове етноботаничке податке о употреби плодова дивље малине у припреми различитих послastiца, као што су штрудла, торте и баклава. Такође, нови податак се односи и на употребу плодова дивље малине за припрему алкохолних пића, ликера и ракије. Изненађујуће, није било података о припреми џема, компота или мармеладе. Традиционални српски производ слатко је нешто више заступљен на подручју ЈИС. Већ је поменуто да се на тим просторима становници интензивно баве прикупљањем шумских плодова, између осталих и малине, од којих припремају традиционалне производе, углавном за комерцијалне сврхе.

Постоји велика брига због губитка знања о медицинској и кулинарској употреби аутохтоних врста биљака, укључујући и малину, посебно у светлу депопулације, односно старења и миграција становништва на подручју Србије и осталих земаља Балкана са великим негативним утицајима на биодиверзитет (Dajić-Stevanović и сар., 2014). Губитак генетичког диверзитета и повезаних традиционалних знања о дивљим биљкама, као и нестанак старих и аутохтоних сорти и аутохтоних врста воћа је повезан и са садашњом доминацијом страних, модерних сорти и хибрида на тржишту, укључујући и сорте малине. Србија је данас један од највећих произвођача малине у свету (Nikolić и сар., 2008), па су култивисане сорте доступније од дивљих плодова.

3. Анализа морфолошких карактеристика

Резултати морфолошких анализа (висина и обим жбунова, дужина и ширина листова) су представљени у Табели 17. Највише просечне висине стабла имају јединке из популације са Гоча (123,40 cm), а прате их представници популација са Студене планине (104, 67 cm) и Голије (100,67 cm). Најнижу просечну висину имају јединке популације са Копаоника (77,00 cm). Најниже вредности су нешто ниже од оних које је забележио Булатовић и сар. (1972) за врсту *Rubus idaeus*. На висину јединки у многоме утичу еколошки фактори, како абиотички, тако и биотички. На пример, јединке са планине Копаоник и Жељин расту углавном у тамнијим шумама, окружене су четинарима. Супротно, јединке у чијем окружењу се налазе листопадни представници, као што су буква и храст, имају већу висину (Студена планина, Гоч). Највећи обим жбунова је забележен код јединки са Студене планине (59,33 cm), док најмањи обим жбунова имају јединке са планине Копаоник (29,07 cm).

Табела 17. Вредности морфолошких параметара јединки из различитих популација (cm)

Особина	Популација	Средња вредност	Минимум	Максимум	Std. Dev.	Коефицијент варијације (%)	Std. Err.
Висина жбунова	Студена планина (П1)	104,67	40	220	44,62	42,63	8,15
	Жељин (П2)	84,67	40	180	39,54	46,70	7,22
	Гоч (П3)	123,40	60	200	40,74	33,01	7,44
	Голија (П4)	100,67	40	170	31,18	30,97	5,69
	Копаник (П5)	77,00	50	100	12,36	16,05	2,26
	Озрен (П6)	91,00	40	150	28,06	30,84	5,61
	Стара планина (П7)	96,83	40	180	36,04	37,22	6,58
Обим жбунова	Студена планина (П1)	59,33	40	80	12,51	21,08	2,28
	Жељин (П2)	39,17	20	70	12,94	33,03	2,36
	Гоч (П3)	29,97	20	45	6,77	22,61	1,24
	Голија (П4)	33,67	20	60	10,08	29,94	1,84
	Копаник (П5)	29,07	20	45	5,90	20,28	1,08
	Озрен (П6)	43,40	20	60	10,97	25,27	2,19
	Стара планина (П7)	42,17	20	80	13,18	31,25	2,41
Дужина листова	Студена планина (П1)	9,20	6,42	12,02	1,48	16,05	0,27
	Жељин (П2)	6,34	4,46	10,14	1,28	20,16	0,23
	Гоч (П3)	7,13	4,30	10,36	1,50	20,98	0,27
	Голија (П4)	7,24	5,24	10,18	1,42	19,60	0,26
	Копаник (П5)	6,32	4,18	8,78	1,15	18,15	0,21
	Озрен (П6)	7,35	5,40	11,52	1,52	20,65	0,30
	Стара планина (П7)	7,00	5,50	11,30	1,36	19,39	0,25

Ширина листова	Студена планина (П1)	9,25	6,54	13,42	1,40	15,10	0,26
	Жељин (П2)	6,92	4,44	10,26	1,54	22,32	0,28
	Гоч (П3)	5,81	4,40	7,64	0,78	13,39	0,14
	Голија (П4)	5,47	4,16	7,14	0,86	15,72	0,16
	Копаоник (П5)	5,11	4,10	6,30	0,63	12,41	0,12
	Озрен (П6)	5,90	4,48	8,14	0,97	16,45	0,19
	Стара планина (П7)	5,43	4,40	7,78	0,76	13,95	0,14
Однос дужина/ширина	Студена планина (П1)	1,00	0,81	1,66	0,15	14,86	0,03
	Жељин (П2)	0,93	0,76	1,31	0,13	13,88	0,02
	Гоч (П3)	1,22	0,95	1,60	0,16	13,41	0,03
	Голија (П4)	1,33	0,99	1,71	0,18	13,89	0,03
	Копаоник (П5)	1,23	0,94	1,50	0,14	11,30	0,03
	Озрен (П6)	1,24	0,97	1,62	0,12	9,89	0,02
	Стара планина (П7)	1,29	1,09	1,53	0,11	8,20	0,02

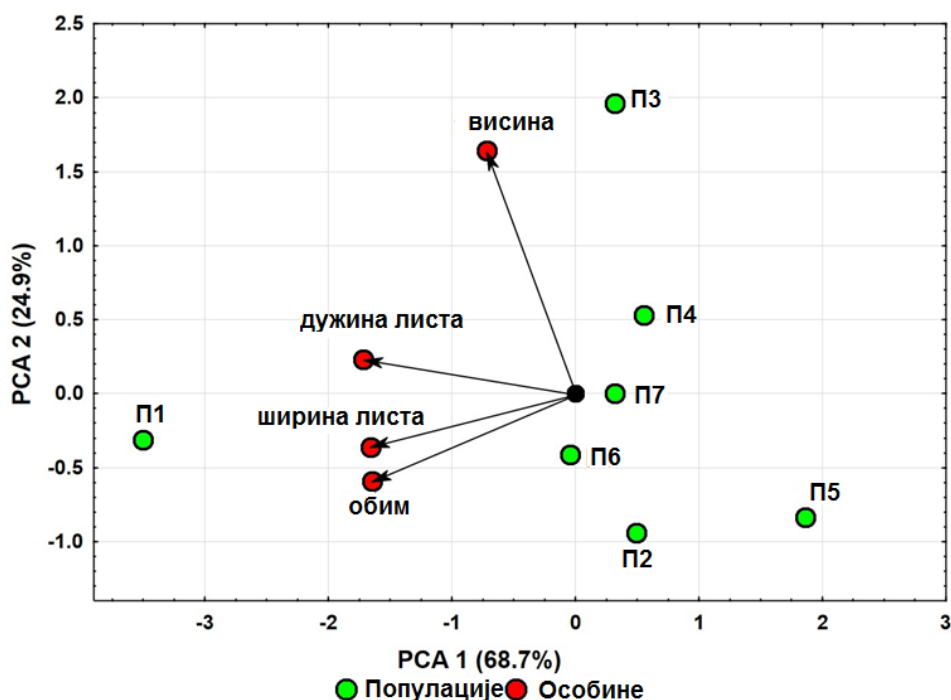
Сprovedено истраживање је показало да најдуже и најшире листове имају јединке са Студене планине (9,20 и 9,25 cm). Најмањи листови су забележени код јединки са Копаоника (дужина – 6,32 cm; ширина – 5.11 cm), а слична дужина листова је присутна код представника популације са Жељина. Из наведених резултата се може видети да са порастом надморске висине опада величина листова. Ако посматрамо ширину листова, она је готово слична за све популације (Голија, Копаоник, Гоч, Стара планина, Озрен), издвајају се само представници популација са Студене планине и Жељина. Слични резултати морфолошких карактеристика су забележени од стране Fell и Rowson (1960).

Једнофакторијална анализа варијансе (Табела 18) је показала да постоје статистички значајне разлике између свих тестираних популација, за све испитиване морфолошке карактеристике ($p < 0.05$).

Табела 18. Једнофакторијална анализа варијансе праћених морфолошких особина популација дивље малине

Особина	F	p
Висина жбуна	5,565	0,00
Обим жбунова	28,374	0,00
Дужина листова	14,514	0,00
Ширина листова	56,538	0,00

Анализа главних компоненти испитиваних морфолошких особина је показала да су се јединке популације П1 (Студена планина) издвојиле на основу свих тестираних карактеристика (Графикон 7). Код јединки из ове популације су забележени најдужи и најшири листови, као и највећи обим стабла.



Графикон 7. Анализа главних компоненти морфолошких особина популација дивље малине

У циљу утврђивања везе између испитиваних морфолошких параметара и географског положаја и надморске висине спроведена је анализа варијансе (K independent sample test). На основу добијених резултата (Табела 19) може се видети да макролокалитет има статистички значајан утицај на обим жбунова, док је утицај надморске висине статистички значајан за све анализиране морфолошке параметре (висина и обим жбунова, као и дужина и ширина листова). Повезаност између надморске висине и морфолошких карактеристика је потврђена и раније. Тако су Cordell и сар., (1998) утврдили да се величина листова, дужина петелки, као и дужина интернодија смањује са повећањем надморске висине, што је у складу са добијеним резултатима.

Табела 19. Статистичка зависност морфолошких параметара од географског положаја и надморске висине

	Макролокалитет	Надморска висина
Висина жбуна	0,357	0,001
Обим жбуна	0,006	0,012
Дужина листа	0,357	0,000
Ширина листа	0,357	0,001
Ratio	0,006	0,092

4. Анализа анатомских карактеристика

У Табели 20 су представљени резултати дескриптивне статистике за девет анатомских параметара листова дивље малине (висина ћелија епидермиса лица, висина ћелија епидермиса наличја, дебљина листа, дебљина палисадног ткива, дебљина сунђерастог ткива, дужина главног проводног снопића, ширина главног проводног снопића, дужина проводних снопића, ширина проводних снопића). Посматрањем унутрашње грађе листа јединки дивље малине запажен је низ карактеристика. Епидермис лица и наличја је једнослојан. Највећу висину ћелија оба епидермиса имају јединке са локалитета Голија (15,21 μm и 9,76 μm). Ћелије епидермиса лица су скоро два пута више од ћелија епидермиса наличја. Ова популација се издвојила и на основу других мерених карактеристика: листови ове популације имају најдебље листове (96,46 μm), палисадно и сунђерасто ткиво су нејдебљи код ових представника (41,92 μm и 33,15 μm). Листови са овог локалитета имају најдуже и најшире главне проводне снопиће, али и проводне снопиће бочних нерава. Мезофил је јасно диференциран на палисадно и сунђерасто ткиво. Ћелије палисадног ткива су постављене усправно у односу на површину ћелија епидермиса лица. Њихов облик варира од релативно издужених до конусних. Ћелије сунђерастог ткива су овалног до неправилног облика, са мање хлоропласта и већим интерцелуларима него код палисадног ткива. Дебљи мезофил обезбеђује листове са

вишим фотосинтетичким капацитетом по јединици површине, али такође пружа шансу ћелијама у конкуренцији за CO_2 и светлост. Givnish (1979) је навео да се дебљи листови јављају у оним условима средине где су оба ресурса подједнако заступљена а где је стопа апсорпције од стране ћелија мезофила ниска. Ово се дешава када је транспирација висока, а интензитет фотосинтезе низак (Castro-Diez и сар., 2000). Проводни снопићи у мезофилу су колатерални и затворени.

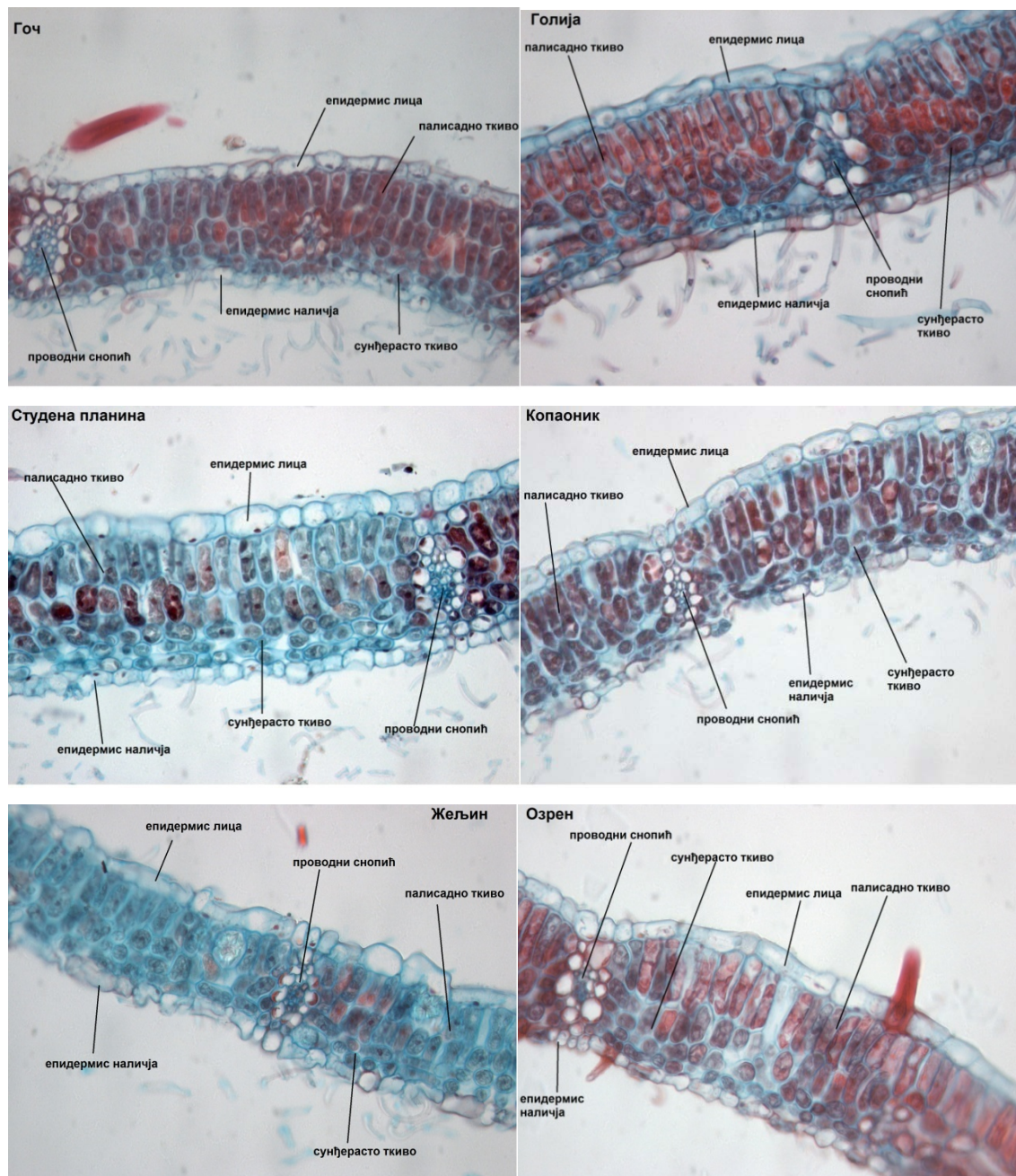
Анатомска варијабилност између различитих популација представља адаптивни одговор на различите факторе животне средине, као што је и истакнуто од стране Stevanović и Stevanović (1985) и Anderson и Creech (1975). На Слици 11 су приказане микрографије попречних пресека листа дивље малине са различитих локалитета.

Табела 20. Анализа анатомских параметара листа дивље малине из различитих популација (μm)

Особина (μm)	Популација	Средња вредност	Минимум	Максимум	Std. Dev.	Коефицијент варијације (%)	Std. Err.
Висина ћелија епидермиса лица	Студена планина (П1)	12,86	5,80	21,40	3,14	24,42	0,44
	Жељин (П2)	13,04	8,90	19,60	1,94	14,85	0,27
	Гоч (П3)	12,39	7,90	18,20	2,29	18,51	0,32
	Голија (П4)	15,01	9,10	22,30	3,04	20,24	0,43
	Копаоник (П5)	13,64	8,80	20,80	2,42	17,71	0,34
	Озрен (П6)	11,53	6,30	17,00	2,90	25,11	0,41
	Стара планина (П7)	12,95	9,40	20,40	2,48	19,13	0,35
Висина ћелија епидермиса наличја	Студена планина (П1)	8,34	4,10	17,60	2,59	31,03	0,37
	Жељин (П2)	7,77	5,20	12,10	1,45	18,61	0,20
	Гоч (П3)	8,68	6,30	11,60	1,44	16,61	0,20
	Голија (П4)	9,76	6,30	15,40	2,10	21,52	0,30
	Копаоник (П5)	7,82	4,70	12,30	1,54	19,74	0,22
	Озрен (П6)	7,75	5,00	11,00	1,37	17,71	0,19
	Стара планина (П7)	7,86	4,10	11,90	1,78	22,60	0,25
Дебљина листа	Студена планина (П1)	75,63	47,20	106,90	10,12	13,38	1,43
	Жељин (П2)	83,89	60,70	104,30	11,52	13,73	1,63
	Гоч (П3)	75,16	42,80	96,90	11,85	15,77	1,68
	Голија (П4)	96,46	56,00	134,90	19,19	19,90	2,71
	Копаоник (П5)	85,26	60,10	114,20	14,00	16,42	1,98
	Озрен (П6)	67,73	41,80	95,60	11,72	17,31	1,66
	Стара планина (П7)	83,92	53,10	122,00	14,11	16,81	2,00

Дебљина палисадног ткива	Студена планина (П1)	26,33	12,30	38,40	6,65	25,28	0,94
	Жељин (П2)	34,66	16,40	55,90	11,12	32,08	1,57
	Гоч (П3)	27,21	11,30	49,10	9,37	34,45	1,33
	Голија (П4)	41,93	19,50	70,10	13,10	31,23	1,85
	Копаноник (П5)	34,80	16,70	56,60	11,22	32,24	1,59
	Озрен (П6)	20,12	8,70	34,60	6,42	31,91	0,91
	Стара планина (П7)	37,41	13,50	56,60	10,57	28,26	1,50
Дебљина сунђерастог ткива	Студена планина (П1)	26,72	8,80	46,50	8,48	31,75	1,20
	Жељин (П2)	27,34	14,50	45,60	7,00	25,62	0,99
	Гоч (П3)	25,50	12,30	38,70	7,34	28,77	1,04
	Голија (П4)	33,15	17,60	61,60	10,90	32,89	1,54
	Копаноник (П5)	27,74	15,70	47,50	7,16	25,82	1,01
	Озрен (П6)	28,03	12,60	43,70	7,67	27,35	1,08
	Стара планина (П7)	26,52	14,20	49,70	6,89	25,98	0,97
Дужина главног проводног снопића	Студена планина (П1)	237,17	164,10	311,90	36,28	15,30	5,13
	Жељин (П2)	351,65	260,10	487,30	54,88	15,61	7,76
	Гоч (П3)	377,82	271,40	479,60	71,77	19,00	10,15
	Голија (П4)	408,02	254,70	573,30	103,46	25,36	14,63
	Копаноник (П5)	354,09	252,50	495,70	54,64	15,43	7,73
	Озрен (П6)	220,21	155,00	285,80	31,14	14,14	4,40
	Стара планина (П7)	315,24	209,70	399,70	53,00	16,81	7,50
Ширина главног проводног снопића	Студена планина (П1)	245,14	136,50	384,30	72,07	29,40	10,19
	Жељин (П2)	389,52	264,50	493,20	70,55	18,11	9,98
	Гоч (П3)	393,07	202,80	491,20	90,23	22,96	12,76

	Голија (П4)	423,70	265,70	602,20	120,75	28,50	17,08
	Копаоник (П5)	393,56	268,90	495,60	70,36	17,88	9,95
	Озрен (П6)	241,15	168,20	332,10	43,19	17,91	6,11
	Стара планина (П7)	361,97	237,40	499,70	79,53	21,97	11,25
Дужина проводних снопића	Студена планина (П1)	38,12	25,20	73,10	10,21	26,79	1,44
	Жељин (П2)	39,28	18,70	60,50	10,18	25,91	1,44
	Гоч (П3)	35,64	25,10	60,40	7,10	19,92	1,00
	Голија (П4)	43,72	25,80	69,80	9,77	22,34	1,38
	Копаоник (П5)	39,62	17,30	63,20	10,68	26,95	1,51
	Озрен (П6)	30,92	21,10	51,90	6,24	20,17	0,88
	Стара планина (П7)	39,06	25,80	62,40	8,41	21,54	1,19
Ширина проводних снопића	Студена планина (П1)	26,54	16,40	45,90	6,91	26,03	0,98
	Жељин (П2)	24,39	14,90	42,20	5,64	23,11	0,80
	Гоч (П3)	21,78	16,10	30,50	3,23	14,81	0,46
	Голија (П4)	28,60	17,60	44,70	6,07	21,23	0,86
	Копаоник (П5)	24,38	15,90	43,10	6,02	24,68	0,85
	Озрен (П6)	20,82	11,00	31,80	4,62	22,20	0,65
	Стара планина (П7)	24,76	14,50	43,40	6,11	24,68	0,86



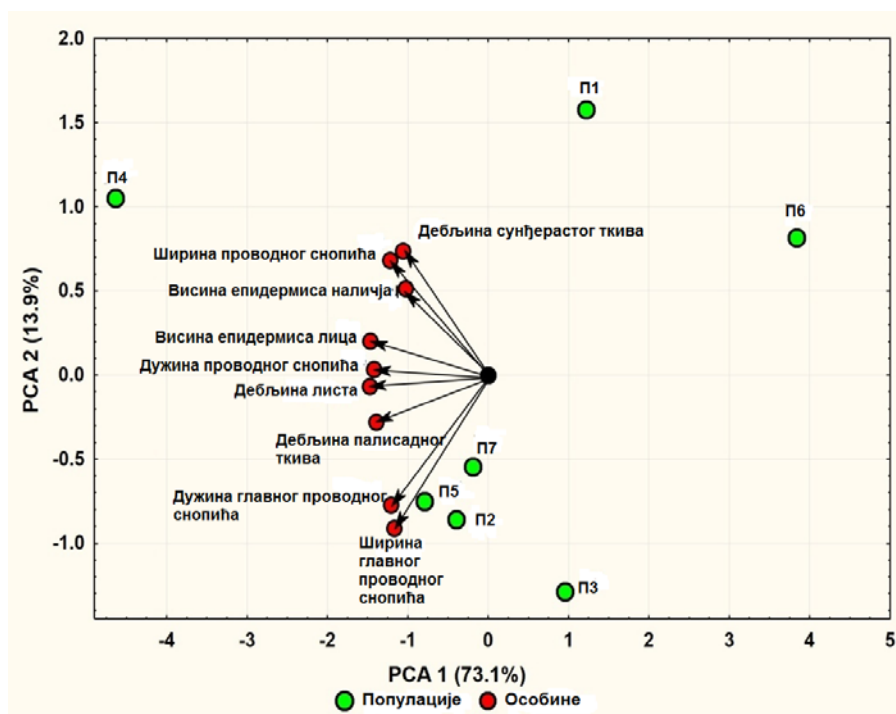
Слика 11. Попречни пресек листа дивље малине

У Табели 21 су приказани резултати двофакторијалне анализе варијансе (први фактор је популација, а други положај пресека) анатомских карактеристика листа, при чему је за сваку анатомску карактеристику спроведена засебна анализа.

Табела 21. Анализа варијансе анатомских карактеристика врсте *Rubus idaeus*

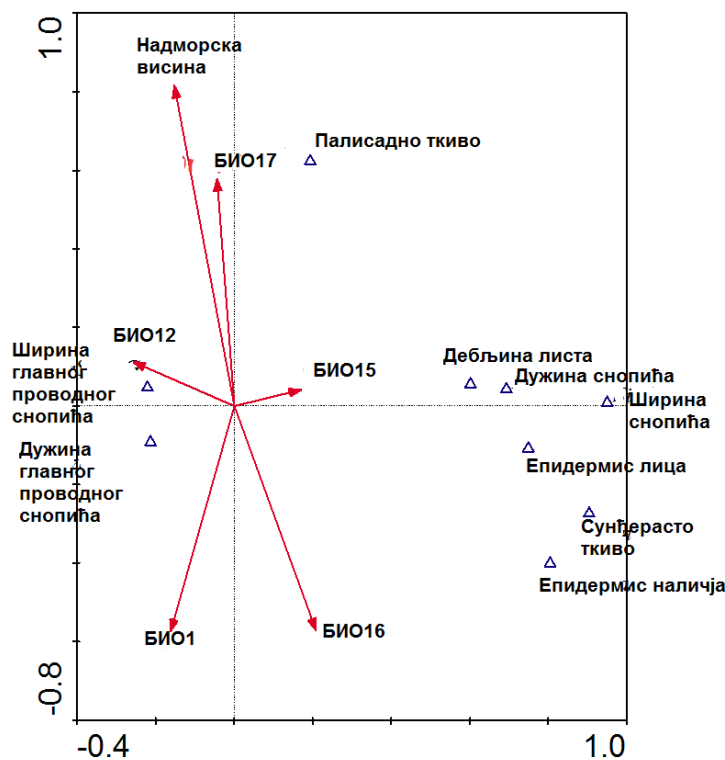
	Висина епидермиса лица		Висина епидермиса наличја		Дебљина листа		Дебљина палисадног тквива		Дебљина сунђерастог тквива		Дужина главног проводног снопића		Ширина главног проводног снопића		Дужина осталих проводних снопића		Ширина осталих проводних снопића	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Популација	2,96	0,012	2,95	0,013	5,18	0,000	5,99	0,000	1,08	0,380	12,31	0,000	7,91	0,000	3,30	0,006	4,27	0,001
Пресек	3,74	0,005	0,90	0,464	0,96	0,425	0,56	0,688	3,31	0,011	4,20	0,002	10,86	0,000	1,36	0,247	4,11	0,003
Популација * пресек	1,50	0,064	0,67	0,874	1,66	0,030	1,22	0,221	0,64	0,903	1,76	0,017	0,62	0,912	1,33	0,143	0,94	0,545

Из Табеле 21 се уочава да код висине епидермиса лица, висине епидермиса наличја, дебљине листа, дебљине палисадног ткива, дужине главног проводног снопића, ширине главног проводног снопића, као и дужине и ширине осталих проводних снопића постоји статистички значајна разлика између популација. Статистички значајне разлике између положаја пресека листа постоје код епидермиса лица, дебљине сунђерастог ткива, дужине и ширине главног проводног снопића, као и ширине осталих проводних снопића. Статистички значајна интеракција популације и положаја пресека постоји код дебљине листа и дужине главног проводног снопића. Мултиваријациона статистика (РСА) је показала да су се јединке са локалитета Голија издвојиле на основу свих тестираних карактеристика (Графикон 8). Код ових представника су забележене више вредности скоро свих испитиваних анатомских карактеристика. Са друге стране, јединке из популације са Озрена се карактеришу тањим листовима, као и нижим епидермисом и мањим проводним снопићима. Овакав резултат се може објаснити чињеницом да представници ове популације расту на мање осветљеним стаништима, окружени буковим стаблима, па стога имају тање листове са мење израженим палисадним ткивом.



Графикон 8. Анализа главних компоненти анатомских особина листа популација дивље малине

Анализом климатских фактора може се уочити да је за подручје Голије забележена највећа годишња количина падавина, док је са друге стране на Озрену забележена најмања годишња количина падавина. На основу наведеног, може се претпоставити да су фактори климе (у првом реду количина падавина) у многоне допринели оваквим резултатима, што се може видети и са Графикана 9. Варијабилност морфоанатомских карактеристика листова дивље малине може указивати на адаптацију према факторима спољашње средине, посебно према сунчевом зрачењу, влажности ваздуха и температури, као и изложености ветру. Утицај спољшњих фактора на анатомске карактеристике листа других биљних врста са простора Србије је такође забележен, што је у сагласности са приказаним резултатима. Тако су Vasić и Dubak (2012) показали промене у анатомским карактеристикама листа врсте *Juniperus oxycedrus* са различитих надморских висина и различитих услова станишта. Може се претпоставити и да је тип подлоге битно утицао на добијене резултате, с обзиром да се популације у ЈЗС углавном налазе на серпентинитима, док у ЈИС доминира кречњак. Тако су Kuzmanović и сар., (2012) показали да геолошка подлога битно утиче на анатомију листа.



Графикон 9. Утицај климатских фактора на испитиване анатомске особине

У циљу утврђивања везе између испитиваних анатомских параметара и географске позиције и надморске висине спроведена је анализа варијансе (K independent sample test). На основу добијених резултата (Табела 22) може се видети да макролокалитет има статистички значајан утицај на епидермис лица и наличја, као и на дужину проводних снопића. Утицај надморске висине је статистички значајан за већину анализираних анатомских параметара (дебљина листа, висина палисадног ткива, дужина и ширина проводних снопића) Утицај надморске висине на анатомске карактеристике је потврђен и раније. Тако су Gonuz и Özorgucu (1999) утврдили значајан утицај надморске висине на анатомске и морфолошке параметре. Слично добијеним резултатима, Zarinkamag и сар. (2011) су утврдили статистички значајне разлике анатомских карактеристика исте врсте са различитих надморских висина, с обзиром на јасне везе између одређене надморске висине и климатских параметара.

Табела 22. Статистичка зависност анатомских параметара од географског положаја и надморске висине

	Макролокалитет	Надморска висина
Епидермис лица	0,006	0,000
Епидермис наличја	0,006	1,000
Дебљина листа	0,065	0,000
Висина палисадног ткива	0,357	0,000
Висина сунђерастог ткива	1,000	0,092
Дужина главног проводног снопића	0,000	0,012
Ширина главног проводног снопића	0,000	0,001
Дужина проводних снопића	0,006	0,000
Ширина проводних снопића	0,065	0,012

5. Фитохемијска испитивања

Како би се утврдио садржај различитих секундарних метаболита у листовима и плодовима спроведен је низ фитохемијских анализа. Количина секундарних метаболита је одређивана из метанолних екстраката који су упаравани до суве материје. Резултати фитохемијских испитивања (количина укупних фенолних једињења, флавоноида, танина и антоцијанина, као и укупна антиоксидативна активност метанолних екстраката листова и плодова малине) су приказани у Табели 23.

Табела 23. Количина укупних фенолних једињења (mg GA g⁻¹ екстракта), флавоноида (mg Ru g⁻¹ екстракта), танина (mg mL⁻¹ екстракта), укупних антоцијанина (μg mL⁻¹ екстракта) и антиоксидативна активност изражена у IC₅₀ вредностима (μg mL⁻¹) у екстрактима листова и плодова малине

Узорак	Популација	Садржај укупних фенола	Садржај флавоноида	Садржај танина	Садржај антоцијанина	АОА
Лист	Голија (П1)	59,68 ± 1,40	7,53 ± 0,06	0,73 ± 0,031	8,61 ± 1,05	199,18 ± 1,12
	Копаоник (П2)	69,17 ± 0,57	7,39 ± 0,17	0,99 ± 0,006	7,36 ± 0,63	198,30 ± 1,18
	Гоч (П3)	92,42 ± 0,30	7,19 ± 0,23	0,85 ± 0,009	5,90 ± 0,46	117,83 ± 1,49
	Студена планина (П4)	96,83 ± 1,24	7,27 ± 0,15	1,04 ± 0,035	6,26 ± 0,97	118,49 ± 0,66
	Жељин (П5)	87,25 ± 1,03	7,12 ± 0,07	0,97 ± 0,026	4,43 ± 0,75	128,33 ± 1,83
	Озрен (П6)	76,62 ± 0,59	7,37 ± 0,19	0,90 ± 0,074	9,00 ± 1,11	158,70 ± 0,93
	Стара планина (П7)	95,50 ± 0,65	7,02 ± 0,18	1,27 ± 0,029	7,46 ± 0,93	110,17 ± 1,42
Плод	Голија (П1)	36,29 ± 0,43	4,93 ± 0,27	0,40 ± 0,017	4,73 ± 0,45	294,79 ± 1,63
	Копаоника (П2)	32,97 ± 0,86	4,97 ± 0,35	0,23 ± 0,027	2,63 ± 0,24	343,98 ± 0,90
	Гоч (П3)	31,83 ± 0,2	4,39 ± 0,32	0,4 ± 0,015	2,37 ± 0,16	352,08 ± 1,36
	Студена планина (П4)	37,05 ± 0,92	4,95 ± 0,29	0,27 ± 0,011	1,45 ± 0,34	286,18 ± 1,51
	Жељин (П5)	24,29 ± 0,36	4,76 ± 0,42	0,20 ± 0,016	0,31 ± 0,04	489,60 ± 1,70
	Стара планина (П7)	38,71 ± 0,89	4,59 ± 0,21	0,22 ± 0,024	2,08 ± 0,06	246,09 ± 2,58

5.1. Количина укупних фенолних једињења у екстрактима листова и плодова

Количина укупних фенолних једињења у метанолним екстрактима листова је у опсегу од 59,68 до 96,83 mg GA g⁻¹. Најниже вредности су забележене у узорцима са планине Голије, док су највише вредности забележене код популација са локалитета Студена планина и Стара планина. Узорци са Старе планине имају нешто ниже вредности за количину укупних фенолних једињења од узорака са Студене планине (95,50 mg GA g⁻¹). Количина укупних фенолних једињења у плодовима малине је у опсегу од 24,29 mg GA g⁻¹ (Жељин) до 38,71 mg GA g⁻¹ (Стара планина). Фенолни профил је под утицајем многих фактора, неки од њих су: генотип, позиција локалитета, климатски услови, методологија припреме и година. Узимајући у обзир да услови спољашње средине утичу на метаболичке реакције биљака, Mikulić-Petkovsek и сар. (2012) су сугерисали да виши садржај фенолних једињења у дивљем бобичастом воћу у поређењу са култивисаним сортама може бити резултат адаптације, који омогућава дивљим сортама да опстану у сировом природном окружењу. Wang и Lin (2000) су утврдили да се садржај укупних фенолних једињења у плодовима малине креће од 208 до 268 mg GAE 100 g⁻¹ fw. Сличан садржај укупних фенолних једињења је потврђен и од стране Mazur и сар., (2014) у плодовима неколико гајених сорти са простора Норвешке (183,1-287,7 mg GAE 100 g⁻¹ fw). Mikulic-Petrovsek и сар., (2012) су пронашли да дивље малине из Словеније садрже 223,2 mg GA kg⁻¹ fw укупних фенолних једињења у поређењу са гајеним, које садрже 107,6 mg GA kg⁻¹ fw. Pantelidis и сарадници (2007) су навели да 50% метанолни екстракт плодова неколико сорти малине које расту у Грчкој садржи између 1052 и 2494 mg GAE 100 g⁻¹ dw. Према налазима Bobinaite и сар. (2012) садржај укупних фенолних једињења у метанолним екстрактима плодова малине са простора Литваније („Pokusa“ и „Bristol“) варира од 278,6 до 714,7 mg GAE 100 g⁻¹ fw. Chen и сарадници (2013) су показали да је садржај укупних фенола 0,1% (v/v) метанолног екстракта малине са простора Кине био од 215,54 до 619,35 mg 100 g⁻¹ fw. Kostecka-Gugała и сар., (2015) су утврдили да садржај укупних фенолних једињења, изражен у еквивалентима хлорогенске киселине, у плодовима малине (сортe „Sokolica“ и „Laszka“) износи 175,90 у сезони 2013, до 549,02 mg 100 g⁻¹ fw у сезони 2012.

5.2. Количина флавоноида у екстрактима листова и плодова

Флавоноиди су значајна група фенолних једињења са аспекта биљне физиологије и њихових улога као биоактивних супстанци (Nile и Park, 2014). Флавоноиди малине могу учествовати у превенцији срчаних обољења и испољити значајне антиоксидативне ефекте (Gülçin и сар., 2011).

Количина флавоноида у испитиваним узорцима листова дивље малине је у опсегу од 7,02 mg Ru g⁻¹ (Стара планина), до 7,53 mg Ru g⁻¹ (Голија). Количина флавоноида у екстрактима листова је прилично уједначена. Садржај флавоноида у листовима дивље малине и култивисаних сорти је испитиван од стране Gudej и Tomczyk (2004), који су закључили да су малине богат извор флавоноида, елагичне киселине и танина. У екстрактима плодова, количина флавоноида се креће од 4,39 mg Ru g⁻¹ колико је забележено у узорцима са истраживаног локалитета Гоч, до 4,97 mg Ru g⁻¹ у узорцима са локалитета Копаоник. Сличне вредности флавоноида (6,0 mg g⁻¹ свеже масе) у плодовима малине су забележене од стране Rauha и сар. (2000). Највише вредности за количину укупних флавоноида у плодовима малине су утврђене за један дивљи екотип при поређењу са неколико узорака култивисаних и дивљих екотипова Турске (Gülçin и сар., 2011).

5.3. Количина танина у екстрактима листова и плодова малине

Танини су битан састојак бобичастог воћа, при чему већина плодова садржи кондензоване танине (Lopes da Silva и сар., 2007). Они имају битну улогу у обликовању сензорних особина плодова и производа. Танини су одговорни за опор укус и промене сензорних особина код воћа и воћних сокова (Puurponen-Pimiä и сар., 2005; Lopes da Silva и сар., 2007).

Количина укупних танина у метанолном екстракту листова дивље малине се креће од 0,73 mg mL⁻¹, колико је забележено код узорака са Голије, до 1,27 mg mL⁻¹, код узорака са Старе планине. Резултати за количину танина су слични онима који су забележени од стране Durgo и сар. (2012).

У екстрактима плодова, количина танина се креће од $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$ (Жељин) до $0,45 \text{ mg mL}^{-1}$ (Гоч). Танини су познати по томе што редукују нутритивну вредност неких биљних производа, док у обојеним плодовима, који су богати у антоцијанинима, танини стабилизују антоцијанине повезујући их у форму кополимера (Lopes da Silva и сар., 2007).

5.4. Количина антоцијанина у екстрактима листова и плодова

Антоцијанини имају значајну биолошку улогу, укључујући антиоксидативну, антиканцерогену и антимикробну активност (Nile and Park, 2014). Бобичасто воће које је црвене, плаве или љубичасте боје је један од најзначајнијих извора антоцијанина (Kähkönen и Heinonen, 2003). Бобице богате антоцијанинима или њиховим дериватима дају бројне заштитне особине са потенцијалним позитивним ефектом на здравље људи и животиња (Konić-Ristić и сар., 2011). Црвено воће има више вредности гликозида на бази цијанида, док тамно обојено воће садржи више делфинидин гликозида. Не постоји значајна разлика између састава антоцијанина култивисаних и дивљих сорти воћа исте врсте (Veberić и сар., 2015). Количина антоцијанина у метанолном екстракту листова је у опсегу од $4,43$ до $9,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. највећа количина је забележена код узорака са планине Озрен, док је најнижа количина забележена код узорака са Жељина. Највећа количина антоцијанина у метанолним екстрактима плодова је забележена у узорцима са локалитета Голија ($4,73 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), док је најнижа вредност забележена у узорцима са Жељина ($0,31 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Wang и Lin (2000) су показали да количина антоцијанина расте са порастом зрелости плодова, и њихови резултати су у сагласности са резултатима испитивања зрелих плодова.

5.5. Резултати испитивања антиоксидативне активности DPPH методом

Испитивање антиоксидативне активности (АОА) је спроведено DPPH методом. Резултати су изражени као IC_{50} вредности, при чему је АОА је обрнуто пропорционална добијеним бројчаним IC_{50} вредностима. Резултат АОА екстраката листова је у опсегу од $110,17$ до $199,18 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Највиша АОА је утврђена у екстракту листова са Старе планине.

Метанолни екстракти са истраживаних локалитета Гоч и Студена планина се такође карактеришу високим вредностима АОА. До сличних података су дошли Durgo и сар. (2012) који указују на висок антиоксидативни потенцијал екстраката листова малине. На основу добијених резултата, лист малине се може додати у чајне мешавине како би побољшао ефекат на људско здравље. АОА метанолних екстраката плодова је у опсегу од 246,09 до 489,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Највише вредности АОА показали су метанолни екстракти плодова дивље малине са локалитета Стара планина, док су најниже вредности забележене код узорака са планине Жељин. Према добијеним резултатима, дивље малине с простора Србије су добар извор природних антиоксиданаса. Tosun и сар. (2009) су показали да дивљи генотипови, у поређењу са гајеним сортама, имају виши садржај укупних фенолних једињења, вишу концентрацију аскорбинске киселине и бољу АОА. Упоређивањем АОА листова и плодова, може се уочити да листови имају већу АОА. На основу ових резултата, може се закључити да је антиоксидативни капацитет специфичан за тип ткива због различитог фитохемијског садржаја биоактивних супстанци (Wang и Lin, 2000). Антиоксидативна активност је значајно виша у листовима него у плодовима дивљих популација малине, што је у корелацији са садржајем укупних фенола, укључујући флавоноиде, танине и антоцијанине, слично резултатима за друго бобичасто воће (Vyas и сар., 2013).

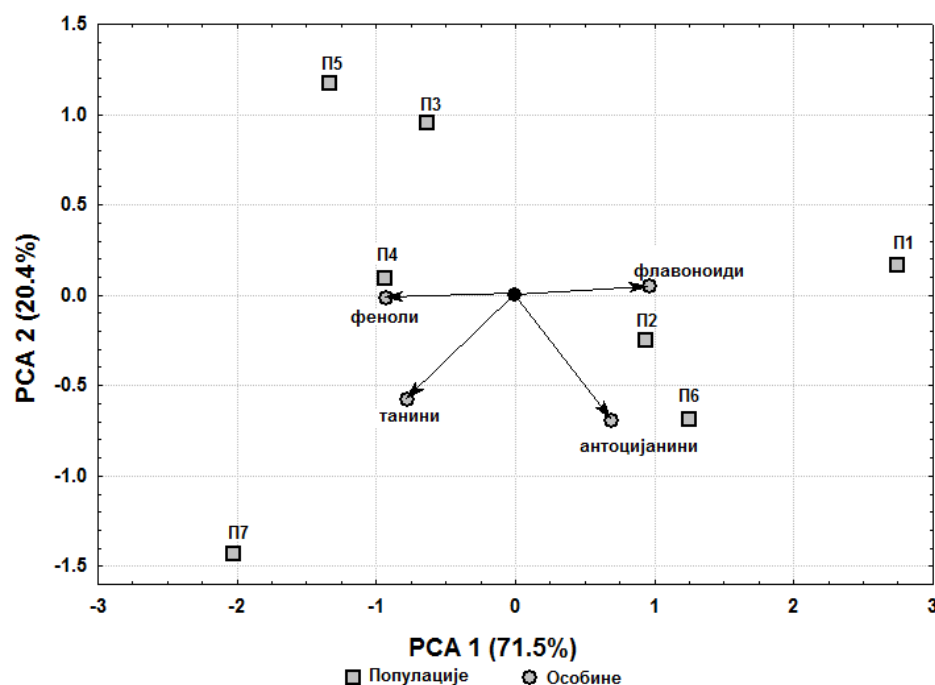
5.6. Статистичка обрада фитохемијских резултата

Између добијених вредности за укупна фенолна једињења, флавоноиде, танине и антоцијанине и утврђене АОА могуће је испитати статистичку зависност методом линеарне регресије. У спроведеној статистичкој анализи коефицијент корелације (R) и коефицијент детерминације (R^2) показују колико варијација зависне променљиве објашњава модел за АОА повезану са вредностима за количину укупних фенолих једињења, флавоноида, танина и антоцијанина (Табела 24). Све испитиване компоненте, у првом реду количина укупних фенолних једињења, су високо повезане са изражавањем АОА, што је и раније потврђено (Skrovankova и сар., 2015; Stanković и сар., 2015). На бази ових статистичких података, може се закључити да су фенолна једињења главне компоненте одговорне за АОА.

Табела 24. R коефицијент корелације и R^2 коефицијент детерминације између вредности за антиоксидативну активност и вредности за садржај укупних фенолних једињења, флавоноида, танина и антоцијанина

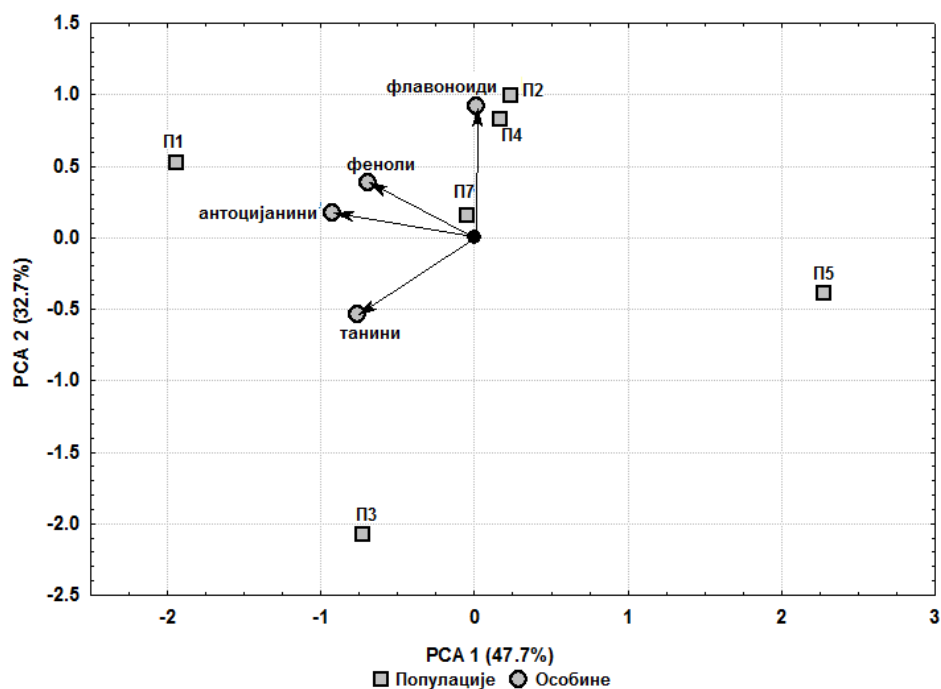
	R (R^2)
Садржај укупних фенолних једињења	0,923 (0,852)
Садржај флавоноида	0,838 (0,702)
Садржај танина	0,847 (0,718)
Садржај укупних антоцијанина	0,776 (0,602)

Употреба мултиваријационе статистике (РСА) је показала да је варијабилност популација одређена скоро искључиво разликама у количини укупних фенолних једињења и флавоноида (Графикон 10), где екстракти листова са локалитета Голија, Копаоник и Озрен имају виши садржај флавоноида, док остале популације имају више укупних фенолних једињења. Популације ближе доњем делу графикана имају више танина и антоцијанина (Стара планина, Озрен и Студена планина) од оних које се налазе у горњем делу графикана (Гоч и Жељин). Установљена је позитивна корелација између садржаја укупних фенолних једињења и танина, као и између флавоноида и антоцијанина.



Графикон 10. Анализа главних компоненти анализираних секундарних метаболита екстарката листова популација дивље малине

За разлику од вредности добијених за листове, где једино прва оса има значајан утицај на варијабилност популације, у случају екстарката плодова обе осе имају значајан утицај на раздвајање популација (Графикон 11). Посебно се издвајају узорци са Голије, са највишим садржајем секундарних метаболита. Њен положај је одређен вишим садржајем укупних фенолних једињења и антоцијанина, али такође и високим садржајем танина и флавоноида. Жељин се налази на страни графикана, и карактерише се ниским садржајем свих испитиваних метаболита. Узорци са Копаоника и Студене планине имају висок садржај флавоноида, док узорци са Гоча имају највиши садржај танина.



Графикон 11. Анализа главних компоненти секундарних метаболита екстарката плодова популација дивље малине

Употребом непараметарског теста K independent sample test, испитане су статистичке зависности добијених фитохемијских резултата од географског положаја и надморске висине. Резултати су приказани у Табели 25. Статистички значајна разлика постоји код оних вредности чија је Sig. $p < 0,05$ и оне су маркиране у табели. Анализом добијених статистичких резултата за вредности добијених за листове може се видети да макролокалитет има статистички значајан утицај на количину антоцијанина, док је надморска висина имала статистички значајан утицај на количину укупних фенолних једињења. Ако се посматрају резултати добијени за плодове, макролокалитет је имао статистички значајан утицај на количину укупних фенолних једињења, флавоноида, танина и АОА, док је надморска висина статистички значајно утицала на количину танина. Спроведеном анализом су потврђене неке од ранијих студија које су показале утицај надморске висине на количину секундарних метаболита (Ghasemi и сар., 2011).

Табела 25. Статистичка зависност фитохемијских параметара од географског положаја и надморске висине

	Лист		Плод	
	Макролокалитет	Надморска висина	Макролокалитет	Надморска висина
Укупна фенолна једињења	0,357	0,012	0,000	1,000
Флавоноиди	0,065	1,000	0,034	0,265
Танини	0,065	0,400	0,034	0,001
Антоцијанини	0,000	1,000	0,481	0,265
АОА	0,065	0,092	0,000	1,000

6. Квалитет плодова и традиционалних производа

Квалитет плодова је анализиран за узорке са свих истраживаних подручја како би се утврдила веза између квалитета плодова и учесталости употребе. Резултати средњих вредности количине аскорбинске киселине (витамина Ц), укупних шећера и органских киселина плодова дивље малине сакупљених на истраживаним локалитетима, као и антиоксидативна активност (ABTS+ методом) су приказани у Табели 26.

Табела 26. Параметри квалитета плодова и антиоксидативна активност

Локалитет	Аскорбинска киселина, mg 100 g ⁻¹ fw	Укупни шећери, BRIX	Садржај органских киселина, mg лимунске киселине g ⁻¹ fw	TEAC, mmolTU g ⁻¹ fw
Студена планина	28,99±1,59 ^f	5,62±0,08 ^a	824,6±63,0 ^{ac}	12,98±0,31 ^{bcd}
Жељин	8,06±0,40 ^a	6,56±0,09 ^c	991,04±24,15 ^b	5,52±0,27 ^a
Гоч	26,46±0,57 ^{de}	4,86±0,09 ^b	855,77±22,20 ^c	19,14±0,67 ^f
Голија	46,62±2,25 ^g	7,02±0,04 ^d	882,22±24,15 ^c	15,07±1,22 ^e
Копаоник	27,43±0,90 ^{ef}	4,8±0,10 ^b	579,28±6,44 ^f	14,50±0,70 ^{de}
Стара планина	10,84±0,45 ^b	7,04±0,05 ^d	596,03±27,12 ^{ef}	12,51±0,68 ^{bc}
Озрен	24,32±0,72 ^{cd}	6,48±0,24 ^c	646,96±20,05 ^e	12,09±0,84 ^b

Вредности са истим словом између колона се не разликују статистички, $p < 0.05$ (ANOVA, followed by the Tukey HSD test).

Највиша количина аскорбинске киселине (46,62 mg 100 g⁻¹ fw) је забележена код узорака са планине Голије, и вредности су скоро два пута веће него што је то уобичајено за плодове малине (25 mg 100 g⁻¹ fw) (Mapson, 1970). Најниже вредности аскорбинске киселине су забележене код узорака са Жељина и Старе планине (8-10 mg 100 g⁻¹ fw). Највиша количина витамина Ц је шест пута виша од најниже вредности. Слични резултати су добијени приликом испитивања количине аскорбинске киселине у плодовима дивље малине са подручја Македоније (Karakashova и сар., 2012), као и за култивисане сорте са територије Норвешке (Mazur и сар., 2014). Pantelidis и сар. (2007) су навели да су култивисане сорте добар извор аскорбинске киселине. Сprovedено истраживање на плодовима дивље малине је у корелацији са претходним студијама које су

показале да је бобичасто воће богат извор витамина Ц са значајним антиоксидативним потенцијалом (Szajdek и Borowska, 2008). Битно је напоменути да су добијени резултати значајно бољи у поређењу са резултатима за количиноу аскорбинске киселине свежих плодова малине које се гаје на простору Турске (од 7,60 до 18,11 mg 100 g⁻¹) (Tamer, 2012). Gulcin и сар., (2011) су пронашли веома малу количину аскорбинске киселине у плодовима дивљих (2,4 mg kg⁻¹) и гајених сорти малине (5,34 mg kg⁻¹).

Количина шећера и органских киселина има битан утицај на укус и квалитет воћа (Wang и сар., 2009). Количина укупних шећера се креће од 4,8 до 7,04 Brix. Најниже вредности су забележене код узорака са Копаоника, док су највише вредности у узорцима са Старе планине. Добијене вредности су нешто ниже од оних које су забележене код дивљих малина са простора Словеније (Mikulic-Petkovsek и сар., 2012). Познато је да количина шећера расте са ступњем зрелости плодова (Siriwoharn и сар., 2004) и повезана је са изложеношћу светлости, као што је са случај са биљкама које расту на отвореним, сунчаним и толпим стаништима (Wang и сар., 2009). Варирање количине шећера се може објаснити различитим еколошким условима, с обзиром да су сви узорци узети у стадијуму пуне зрелости. Разлика у количини шећера је у сагласности са подацима забележеним на терену, с обзиром да је евидентно да јединке са планине Копаоник расту на стаништима које карактерише мала количина светлости јер су окружене високим смрчевим стаблима. Резултати студије Milivojević и сар., (2011) указују на малу количину сахарозе у плодовима култивисаних сорти *R. idaeus*, „Willamatte“ и „Meeker“ (са простора Србије) (6,9 mg g⁻¹ fw, 6,4 mg g⁻¹ fw и 5,3 mg g⁻¹ fw). Супротно, две сорте са простора Словеније („Amira“ и „Polka“) имају већу количину укупних шећера (34.3 mg g⁻¹ fw и 31.9 mg g⁻¹ fw) него испитивани узорци плодова (Mikulic-Petkovsek и сар., 2012). Gulcin и сар., (2011) су утврдили укупну количину шећера у количини од 15,56% у култивисаним и 19,58 – 22,03% у три дивља екотипа плодова малине (са простора Турске).

Количина укупних органских киселина варира између узорака, са највишим вредностима забележеним код узорака са планине Жељин. Ове вредности су нешто више од оних до којих су дошли Mikulic-Petkovsek и сарадници (2012). С обзиром на чињницу да органске киселине нису кључни метаболит дивљих малина, њихова комбинација са количином шећера значајно утиче на сензорни квалитет и укус плодова (Wang и сар., 2009). Ранији налази количине органских киселина у плодовима малине се углавном

односе на плодове малине различитих гајених сорти из различитих региона, а само једна студија је истраживала плодове *R. idaeus* и две гајене сорте из Србије. Milivojević и сар., (2011) су утврдили значајно мање количине органских киселина у плодовима *R. idaeus* и гајеним сортама „Willamette“ и „Meeker“ са простора Србије (0,15 mg CA g⁻¹ fw, 0,24 mg CA g⁻¹ fw и 0,18 mg CA g⁻¹ fw). Gulcin и сар., (2011) су открили растворене киселине гајених и три дивља екотипа плодова малине са простора Турске у количинама од 1,35% и 1,05 – 1,11%. Tamer (2012) је утврдио да се укупна количина органских киселина код четири сорте гајене малине са простора Турске креће од 0,54 до 0,87 g CA 100 g⁻¹. Mazur и сар., (2014) су пронашли растворене киселине код неколико гајених сорти са простора Западне Норвешке које се крећу у интервалу од 1,76 до 2,23 g 100 g⁻¹ fw. Истраживање Zorenc и сар., (2017) показује да две гајене сорте „Amira“ и „Polka“ са простора Словеније имају садржај укупних органских киселина 20,2 и 19,9 mg g⁻¹ fw. Поређењем добијених резултата са горе поменутим, може се закључити да су испитивани плодови од врсте *R. idaeus* са простора Србије много бољи извор органских киселина него поменуте гајене сорте. Према закључцима Pourazoglu и сар., (2002) разлике у садржају органских киселина у плодовима малине јављају се као последица генетичких и климатских фактора.

Сprovedена истраживања су показала да плодови са Гоча и Голије имају највишу антиоксидативну активност, а прате их узорци са Копоника. Најнижу АОА имају узорци са Жељина, код којих је забележена и најнижа вредност витамина Ц, значајне антиоксидативне компоненте. Генерално, најбољи квалитет плодова са планине Голије одговара широкој употреби дивље малине у различитим традиционалним производима на овом локалитету. Milivojević и сар. (2011) су утврдили да је антиоксидативна активност плодова *R. idaeus* са простора Србије 1,41 mg AA g⁻¹ fw, а код гајених сорти „Willamette“ 3,20 mg AA g⁻¹ fw и “Meeker” 1,32 mg AA g⁻¹ fw. Sariburun и сар., (2010) су утврдили да се ABTS активност водених и метанолних екстраката гајених малина са простора Турске креће од 64,36 – 83,66 µmol TE g⁻¹ fw до 72,92 – 117,07 µmol TE g⁻¹ fw. Venskutonis и сар. (2006) су навели да је степен неутрализације слободних радикала од стране етанолних екстраката плодова малине са простора Литваније од 52,5 до 97,8%. Çekiç и Özgen (2010) су утврдили да се антиоксидативни капацитет код дивљих и култивисаних сорти малине са различитих надморских висна креће од 8,9 до 21,5 µmol TE g⁻¹.

Заједно са витамином Ц, малина (*R. idaeus*) садржи бројна фенолна једињења, као што су антоцијанини, фенолне киселине, као и флавоноиди, која имају потенцијално позитивни утицај на здравље (Beekwilder и сар., 2005), при чему у првом реду утичу на антиоксидативну и антиинфламаторну активност (Rauha и сар., 2000). Плодови су мекани, сочни, свежег укуса, са истанчаном аромом која потиче од „малина кетона“ 4-(4-hydroxyphenyl)-butane-2-one (Larsen и сар., 1991). Због наведених особина, плодови јединки са природних станишта, као и гајених сорти малине се често користе на територији Србије и суседних земаља Балкана, као свеже воће или у виду различитих прерађених производа.

Традиционални производи од малине, ракија, сок (сируп) и слатко, су набављени у локалним етномаркетима на планини Голији, с обзиром да је овај регион познат по прикупљању шумских плодова, као и доступности производа од малине у истим. Планина Голија је изабрана и због доброг квалитета плодова који су узорковани на овом локалитету.

Резултати испитивања квалитета традиционалних производа, као и њихове антиоксидативне активности ABTS+ методом су представљени у Табели 27. Количина витамина Ц опада у традиционалним производима, као што је и очекивано. Присуство аскорбинске киселине није забележено у ракији, док у соку и традиционалном српском производу – слатко количина витамина Ц опада неколико пута у односу на концентрацију забележену у свежим плодовима. Добро је познато да је аскорбинска киселина термолабилно једињење (Tiwarī и сар., 2009), па тако у сирупу њена количина опада 4,8 пута, а у слатку 10,9 пута. Добијени резултати су значајно мањи у поређењу са свежим плодовима. Овај налаз је у складу са налазима других истраживача. Tamer (2012) је навео да је садржај аскорбинске киселине у мармелади од малине мањи од садржаја у плодовима различитих гајених сорти. У зависности од сорте, њен садржај се креће од 3,88 до 6,45 mg 100 g⁻¹. као што је већ поменуто, аскорбинска киселина је термолабилно једињење (Rauha и сар., 2000), па тако је пад количине у производима очекиван. Деградација витамина Ц у многоме зависи од температуре. Најбоља температура за очување термолабилних витамина је 70 °C (Kadaka и сар., 2017).

Највећа количина шећера је забележена у сирупу, што је и очекивано с обзиром да се у поступку припреме у сируп додаје значајна количина шећера.

Од тестираних производа, сок има највећу количину укупних органских киселина, која је нешто већа него код свежих плодова, што је вероватно резултат додавања лимунске киселине. Количина органских киселина у слатку је 3,5 пута мања него у свежим плодовима, док је у ракији чак 18 пута мања у поређењу са свежим плодовима. Сви ови резултати могу бити и последица технике припреме. Ови резултати су супротни онима до којих је дошао Tamer (2012) који је забележио пораст укупних киселина (око 2 до 3 пута) у узорцима мармеладе која је припремљена од гајених сорти малине. Он је објаснио овакав резултат додатком лимунске киселине током процеса припреме.

Ракија је показала веома ниску антиоксидативну активност, као што је и очекивано, док су у слатку забележене значајне вредности антиоксидативне активности, које су у рангу са оним вредностима забележеним код плодова са Жељина. У сваком случају, вредности су око два и више пута мање од оних забележених код већине узорака плодова. Veda и сар., (2006) су навели да загревање и оксидација доводе до смањења антиоксидативне активности. На пример, антиоксидативна активност мармеладе значајно опада и то у интервалу од 1,79% до 12,11%, у поређењу са плодовима.

Табела 27. Анализа квалитета различитих врста традиционалних производа

Традиционални производ	Аскорбинска киселина, mg 100 g ⁻¹ fw	Укупни шећери, BRIX	Садржај органских киселина, mg лимунске киселине g ⁻¹ fw	TEAC, mmol TU g ⁻¹ fw
Ракија	0,00	0,00	48,99	0,278
Сок (сируп)	9,73	25,74	396,29	4,870
Слатко	4,25	16,12	250,73	5,145

Неке од ранијих студија су показале да се од малине може успешно припремати џем, и да се фруктоза, сорбитол и сируп агаве могу користити као заслађивачи (Karakashova и сар., 2012). У њиховим истраживањима је показано да џем од плодова сорте „Willamette“ има боље карактеристике од џема произведеног од плодова

дивље малине. Генерално, неки од производа дивље малине, због својих добрих карактеристика се могу препоручити као здрава храна, што је показано у спроведеном истраживању, с обзиром на виске вредности квалитета традиционалних производа.

7. Испитивање биолошке активности екстраката листова и плодова

Антимикробна и антиканцерогена активност је испитивана за метанолне екстракте листова и плодова, али не и код одабраних традиционалних производа – с обзиром да се у слатко и сок (сируп) додаје знатна количина шећера, која може изазвати раст бактеријских колонија и канцерогених ћелија, па добијени резултати не би били релевантни.

7.1. Антимикробна активност

Прегледом етноботаничких података евидентирано је да се употреба малине највише везује за превенцију и санирање стомачних тегоба. Управо због ових чињеница, антимикробна активност екстраката листова и плодова је тестирана коришћењем три соја бактерија: Грам-позитивне бактерије *Sarcina lutea* (ATCC 9431) и *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), а од Грам-негативних је изабрана *Escherichia coli* (ATCC 8739). Три изабрана микроорганизма су нормално присутни у цревној флори, при чему се међусобно разликују у смислу утицаја на функционисање гастро-интестиналног система. *B. subtilis* је позната као непатогена бактерија и углавном се користи као пробиотик. *S. lutea* је изабрана као могуће патогена бактерија дигестивног тракта која је чест изазивач кварења хране и тровања, повезана са желудачним опструкцијама и болестима (Lam-HimLin и сар., 2012), док су за патогене сојеве *E. coli* познате улоге у желудачним обољењима (Rowe, 1979). Постоји неколико налаза који указују на везу између цревне флоре и канцера дебелог црева (Sun и Kato, 2016), укључујући и улогу *E. coli* (Bonnet и сар., 2013; Khan и сар., 2017).

Резултати антимикробне активности су представљени у Табели 28. Узорци метанолних екстраката листова из свих популација имају средњу инхибиторну активност између 2,50 и 20,00 mg mL⁻¹. Бактерија *E. coli* је показала највећу осетљивост на испитиване екстракте у рангу од 2,50 до 10,00 mg mL⁻¹, док је најотпорнија Грам-позитивна бактерија *B. subtilis* са МИС од 10,00 до 20,00 mg mL⁻¹. Метанолни екстракти плодова такође показују средњу инхибиторну активност од 5,00 до 20,00 mg mL⁻¹, са најосетљивијом бактеријом *S. lutea*, док је најотпорнија *B. subtilis* са МИС од 20,00 mg mL⁻¹ за све тестиране узорке. Rauha и сар. (2000) су доказали умерену антимикробну активност метанолних екстраката плодова малине према *B. subtilis*, док је блага антимикробна активност уочена према неким бактеријама, укључујући, *S. lutea* и *E. coli*, слично добијеним резултатима. Фенолна једињења припадају биолошки активним супстанцама које значајно утичу на антимикробну активност (Nile и Park, 2014; Stanković и сар., 2017). Најбољи антибактеријски ефекат је забележен за екстракте листова са локалитета Голија, који су били богати у садржају флавоноида и антоцијанина, тако да се лист малине може препоручити за коришћење у форми чаја за третирање различитих инфекција. С обзиром да метанолни екстракт листа није показао значајну антимикробну активност према Грам позитивној бактерији *B. subtilis* – која се углавном користи као пробиотик (Liu и сар., 2012), док је истовремено ефикасан против патогених бактерија *S. lutea* и *E. coli*, чиме су потврђени етноботанички подаци о употреби чаја од листа малине за стабилизовање нормалне цревне флоре и третирању дијареје (Menković и сар., 2014; Pieroni и сар., 2017). Подаци о деловању листа малине на цревне болести су показани и у спроведеном етноботаничком истраживању. Сви екстракти су показали знатно слабију активност него тестирани антибиотик.

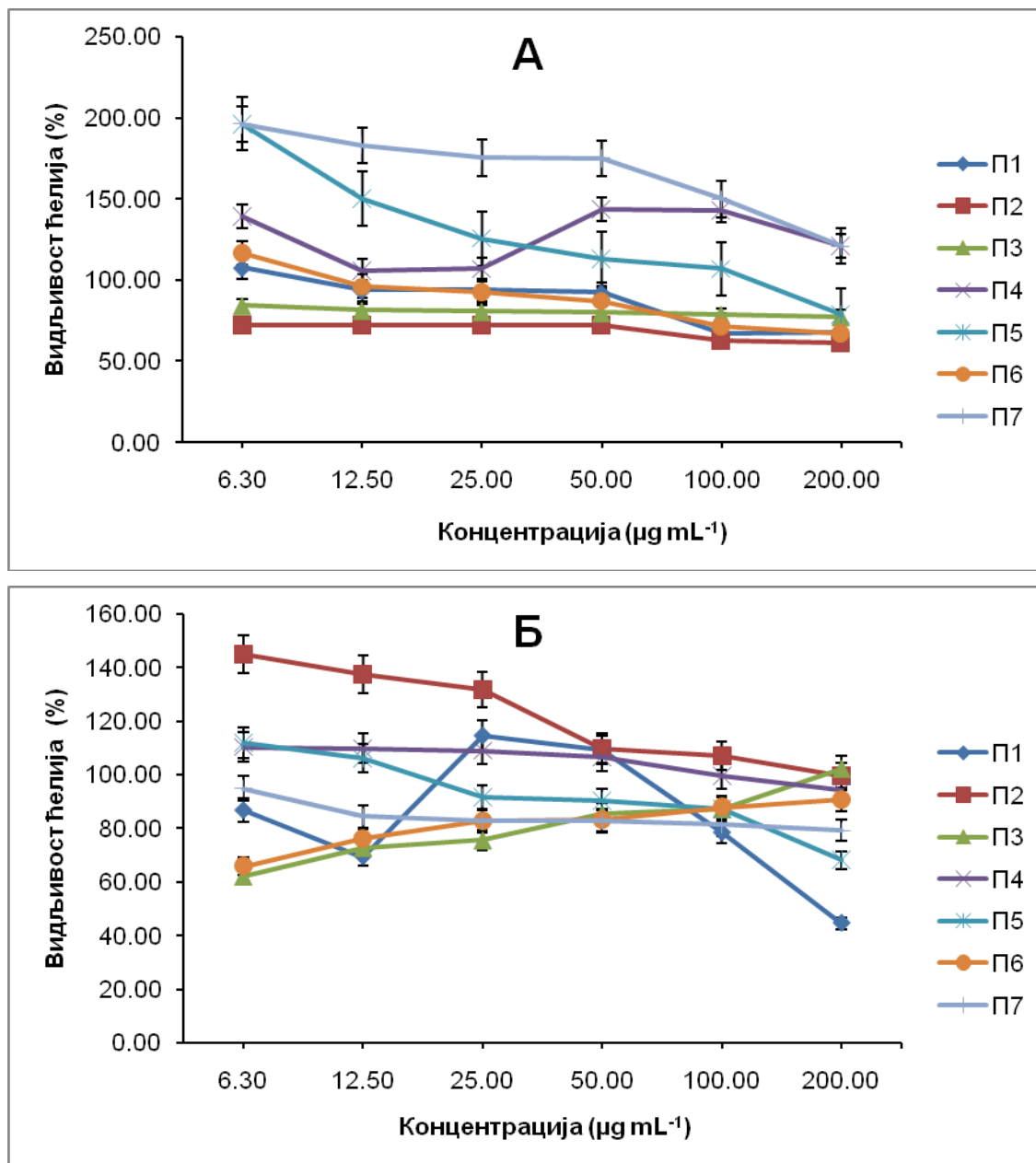
Табела 28. Антимикробна активност: минимална инхибиторна концентрација (MIC) и минимална бактерицидна концентрација (MBC) метанолних екстраката листова и плодова врсте *Rubus idaeus* (mg mL⁻¹)

Узорак	Популација	<i>S. lutea</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i> ATCC	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Лист	Голија	2,50	20,00	10,00	20,00	2,50	>20,00
	Копаоник	2,50	5,00	20,00	10,00	2,50	20,00
	Гоч	5,00	5,00	10,00	20,00	2,50	>20,00
	Студена планина	5,00	10,00	10,00	20,00	5,00	>20,00
	Жељин	20,00	20,00	20,00	10,00	2,50	>20,00
	Озрен	10,00	20,00	20,00	>20,00	5,00	>20,00
	Стара планина	5,00	20,00	10,00	>20,00	10,00	>20,00
Плод	Голија	10,00	20,00	20,00	20,00	10,00	>20,00
	Копаоник	5,00	20,00	20,00	>20,00	10,00	>20,00
	Гоч	5,00	20,00	20,00	10,00	10,00	20,00
	Жељин	5,00	20,00	20,00	20,00	10,00	>20,00
	Стара планина	5,00	20,00	20,00	20,00	10,00	20,00
Доксициклин		<0,50	3,80	0,11	2,00	15,60	31,30

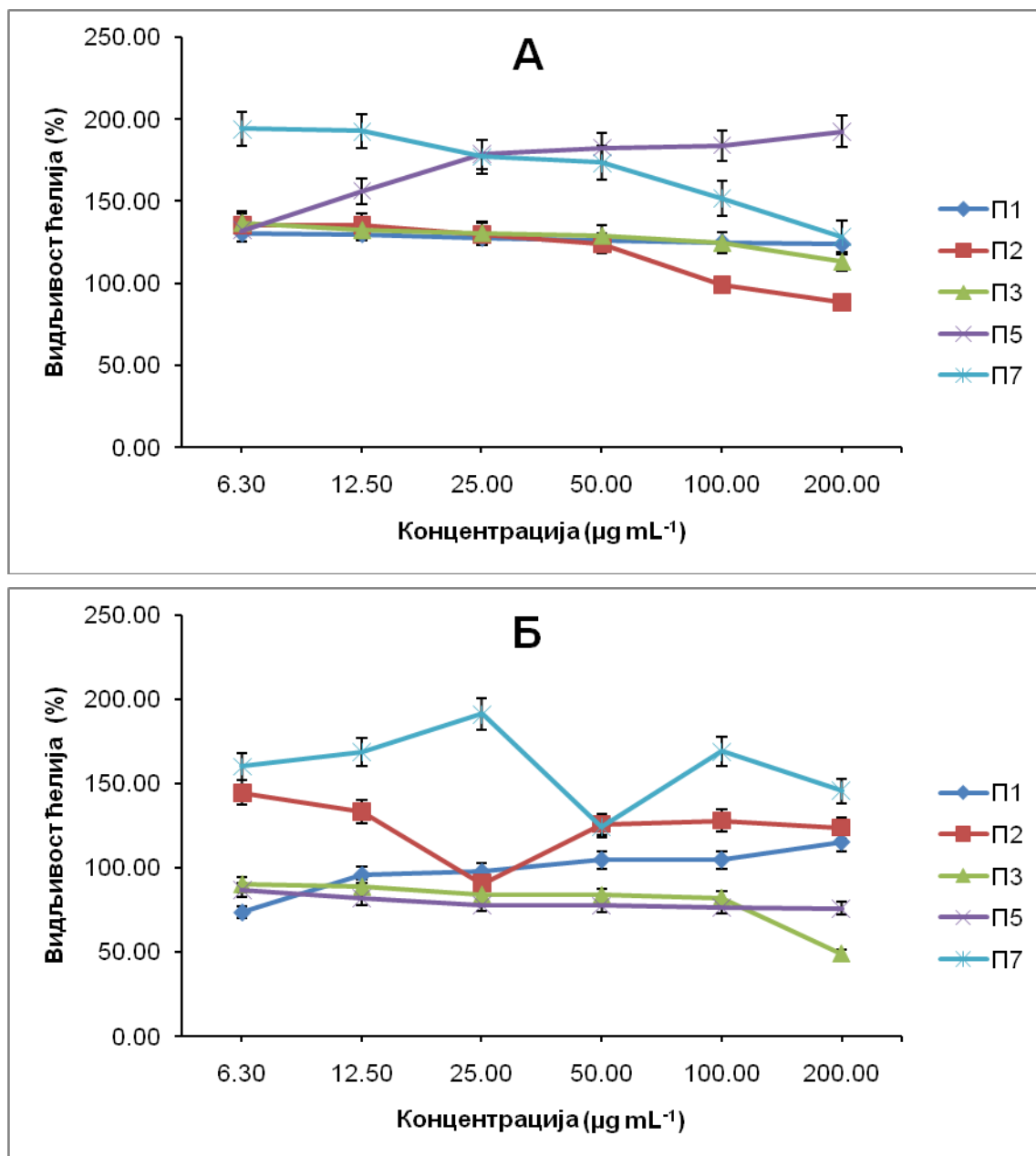
7.2. Анतिकанцерогена активност

Током истраживања тестирана је способност метанолних екстраката листова и плодова дивље малине да инхибирају раст хуманог канцера дебелог црева, ћелијска линија НСТ-116. IC₅₀ вредности екстраката листова после 24 h и 48 h су приказане на Графикону 12. Најбољу анतिकанцерогену активност је показао метанолни екстракт листова малине са локалитета Голија са IC₅₀/24 h 162.38 и IC₅₀/48 h 95.69 µg mL⁻¹. Са друге стране, екстракт листа са Студене планине није показао анतिकанцерогену активност, док је екстракт листа са Старе планине показао благу анतिकанцерогену активност после 48 h. Битно је напоменути да екстракти листова са Старе и Студене планине имају највишу АОА, што доводи до закључка да су АОА и анतिकанцерогена активност у негативној корелацији (Табела 31).

Boivin и сар. (2007) су дошли до сличних закључака. Они су показали да сок јагоде има веома слабу антиканцерогену активност (15% концентрација од 50 $\mu\text{l mL}^{-1}$), али зато има високе вредности АОА (22,6 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$). Такође су дошли до сазнања да јагоде имају релативно висок антиоксидативни капацитет (14,6 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$). Са друге стране, сок од белих рибизли има најнижи антиоксидативни капацитет (4,4 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$) али је веома успешан инхибитор РС-3 ћелија и умерени инхибитор (50 – 68% инхибиције концентрација од 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$) других канцерогених линија. Метанолни екстракт плодова дивље малине је показао веома ниску антиканцерогену активност (Графикон 13). Bowen-Forbes и сар. (2010) су истраживали антиканцерогену активност неколико екстраката плодова малине, при чему су дошли до закључака да једино етанолни екстракт показује благу антиканцерогену активност, док метанолни екстракт нема антиканцерогене активности, што је у складу са добијеним резултатима. Са друге стране, приказани резултати су у контрадикторности са налазима Seeram и сар. (2006), према којима са порастом концентрације екстраката расте и инхибиција пораста канцерогених ћелија. Према њима IC_{50} за хумани канцер дебелог црева – ћелијска линија НСТ-116 је била 188,00. Друге студије су показале да су малине ефикасне у комбинацији са другим бобичастим воћем, на пример заједно са боровницама заустављају мутације ћелије канцера дојке и грлића материце (Gruenwald, 2009).



Графикон 12. Антикancerогена активност метанолних екстраката листова популација дивље малине (А) IC₅₀/24 h; (Б) IC₅₀/48 h ($\mu\text{g mL}^{-1}$)



Графикон 13. Анतिकанцерогена активност метанолних екстраката плодова популација дивље малине (А) IC₅₀/24 h; (Б) IC₅₀/48 h ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Статистичка зависност између тестираних фитохемијских параметара у метанолним екстрактима листова и плодова и њихове антиканцерогене активности је одређена на бази Pearson-овог коефицијента корелације (Табела 29). Статистички значајна корелација постоји између оних тестираних параметара код којих је $\text{Sig. } P < 0,05$, при чему ове корелације могу бити позитивне и негативне. Позитивна корелација постоји између МТТ 24 h и укупних фенолних једињења ($P\text{-value} = 0,001 < P\text{-critical} = 0,05$), чиме су потврђена сазнања о важности улоге природних полифенола у превенцији канцера (Huang и сар., 2008). Такође, позитивна корелација постоји између АОА и флавоноида ($P\text{-value} = 0,010 < P\text{-critical} = 0,05$). Негативна корелација постоји између МТТ 24 h и АОА ($P\text{-value} = 0,009 < P\text{-critical} = 0,05$), МТТ 24 h и флавоноида ($P\text{-value} = 0,036 < P\text{-critical} = 0,05$), АОА и укупних фенолних једињења ($P\text{-value} = 0,000 < P\text{-critical} = 0,05$). Одређивањем Pearson-овог коефицијента корелације између антиканцерогене активности метанолних екстраката плодова и тестираних фитохемијских параметара пронађено је да корелација не постоји.

Генерално, најбољу биолошку активност (антимикробну и антиканцерогену) је показао екстракт листа који је садржао највише танина и антоцијанина (локалитет Голија). Раније су приказани резултати који указују на антиканцерогену (Kong и сар., 2003) и антимикробну активност (Burdulis и сар., 2009) антоцијанина. Истраживања биолошке активности производа од плодова дивље малине ће бити предмет неких будућих истраживања.

Табела 29. Pearson-ов коефицијент корелације антиканцерогене активности и фитохемијских параметара метанолних екстраката листова и плодова

	МТТ 24 h	Листови АОА (DPPH)	Флавоноиди у екстракту листова	Укупни феноли у екстракту листова
МТТ 24 h		-,882**	-,787*	,950**
Лист АОА(DPPH)	-,882**		,876**	-,973**
Флавоноиди у екстракту листа	-,787*	,876**		-,857*
Укупни феноли у екстракту листа	,950**		-,857*	

**Корелација је значајна на вредности 0,01 (2-tailed).

* Корелација је значајна на вредности 0,05 (2-tailed).

8. Генетичка варијабилност природних популација дивље малине и одабраних сорти гајене малине

Према географском положају сакупљени узорци дивљих популација могу бити груписани у три просторне групе и две групе према надморској висини. Тако у просторну групу 1 (југо-западна група) спадају популације Гоч (П1), Студена планина (П2) и Жељин (П3), у групу 2 (југо-источна група) спадају Озрен (П4) и Стара планина (П5), док у групу 3 (централно југо-западна група) спадају Голија (П6) и Копаоник (П7). У зависности од надморске висине популације Гоч, Студена планина и Озрен спадају у групу 1 (надморска висина испод 1000 m – планински регион), док популације Жељин, Стара планина, Голија и Копаоник спадају у групу 2 (надморска висина изнад 1000 m – субалпийски регион).

Четири комбинације AFLP прајмера су дале укупно 247 полиморфних маркера у сету од 135 индивидуа врсте *R. idaeus*. Просечна пропорција полиморфних маркера (%P) је била слична код свих дивљих популација, са највишом вредношћу у дивљој популацији са простора Студене планине (68,02%), а најнижом код популације са простора Жељина (56,28%). Укупни диверзитет (H_T) је био 0,167, док је просечни диверзитет унутар популација (H_w) био 0,161, а просечни диверзитет међу популацијама ($H_B = 0,006$). Диференцијација међу популацијама је била ниска ($F_{ST} = 0,038$), али статистички високо значајна ($P < 0,0001$). Највећи диверзитет имала је популација са Озрена ($H_E = 0,179$), као и највише приватних маркера ($N_{pr} = 7$) и највиши индекс реткости ($RI = 0,374$). Вредности RI су биле позитивне за популације које се јављају на надморским висинама испод 1000 m, а углавном су биле негативан за популације са надморских висина преко 1000 m (Табела 30).

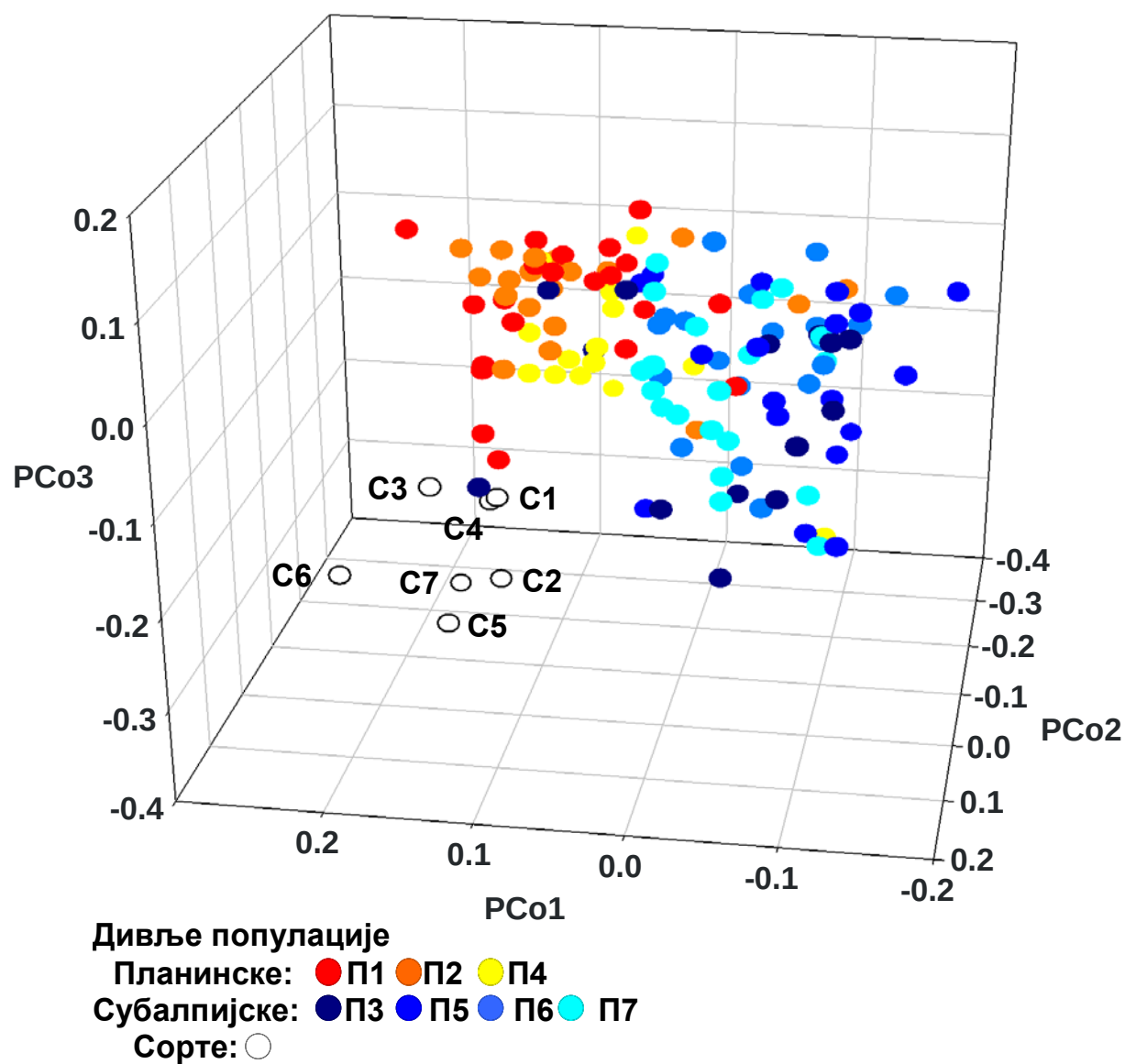
Табела 30. Генетички диверзитет седам дивљих популација са простора Србије и групе сорти на бази AFLP маркера

	Популација	n	%P	N_{pr}	N_{pr}'	I	H_E	RI
П1	Гоч	22	66,40	0	0	0,375	0,159	0,085
П2	Студена планина	19	68,02	0	3	0,390	0,162	0,111
П3	Жељин	15	56,28	0	5	0,365	0,161	-0,330
П4	Озрен	14	63,16	7	9	0,412	0,179	0,374
П5	Стара планина	19	67,21	1	1	0,394	0,161	0,080
П6	Голија	19	58,30	0	1	0,356	0,152	-0,150
П7	Копаоник	20	61,54	0	0	0,360	0,152	-0,170
К	Сорте	7	44,94	2	-	0,360	-	-

n – број јединки; %P – пропорција полиморфних маркера; N_{pr} – број приватних маркера; N_{pr}' – број приватних маркера ако су искључене сорте; I – Шенонов информациони индекс;
 H_E – генетички диверзитет; RI – индекс реткости

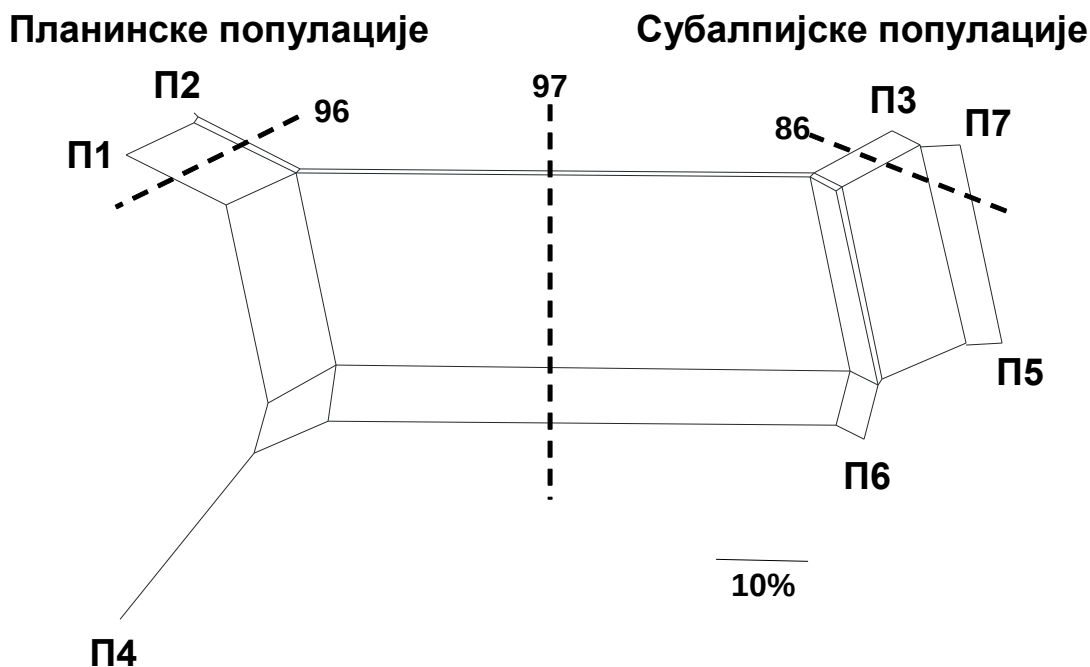
Просечна Dice-ова удаљеност међу јединкама дивљих популација је била 0,422, са распоном од 0,062 и од 0,720. Међу сортама, просечна удаљеност је била 0,463, са минималном дистанцом између сорте „Mekeer“ и „Polka“, и максималном удаљеношћу 0,681 међу сортама „Willamette“ и „Black Jewel“. Поређењем јединки дивљих популација и сорти просечна удаљеност је била 0,544, са минималном удаљеношћу 0,283 између сорте „Mekeer“ и јединки из популације са Старе планине, и максималном удаљеношћу између сорте „Black Jewel“ и јединки из популације са Старе планине. PCoA је показао да се сорте јасно разликују од дивљих популација.

PCoA је рађена на бази Dice-ове матрице удаљености и дала је сопствене вредности за прве три координате веће од 1, објашњавајући 19,71% варијабилности. PCo1 објашњава и раздваја популације које се налазе на надморској висини испод 1000 m од оних које се јављају на висинама изнад 1000 m. PCo2 и PCo3 раздвајају сорте од дивљих популација (Графикон 14).

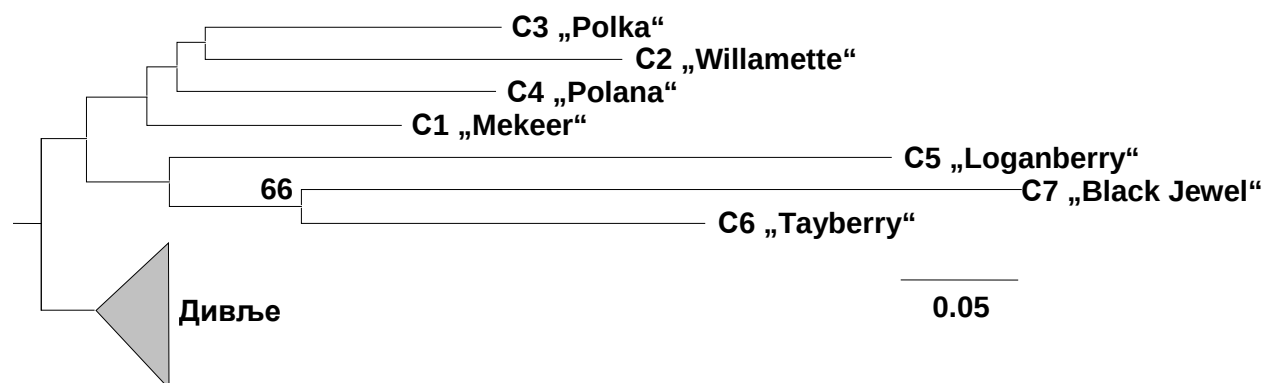


Графикон 14. PCoA на бази Dice-ове матрице удаљености међу јединкама које припадају дивљим популацијама и седам сорти (C1 – „Mekeer“, C2 – „Willamette“, C3 – „Polka“, C4 – „Polana“, C5 – „Loganberry“, C6 – „Tayberry“, C7 – „Black Jewel“)

Просечна Nei-ова генетичка удаљеност је била 0,008, са минимумом од 0,001 између популација са планине Жељин и Копаоник, а максимум од 0,015 је између популација са Озрена и Копаоника. Neighbour-net дијаграм на бази Нејове генетичке удаљености јасно је одвојио популације са надморске висине до 1000 m од оних које се налазе на надморским висинама изнад 1000 m, са Bootstrap подршком од 97% (Графикон 15). Такође, указао је на проток гена између планинских и субалпијских популација између планинских популација са Гоча и Студене планине и субалпијских популација са Жељина и Копаоника, као и између планинске популације са Озрена и субалпијске са Старе планине. Neighbour-joining анализа на бази Dice-ове удаљености за сорте малине (Слика 12) је открила две кладе. Прва клада садржи четири сорте (C1, C2, C3, C4), док друга клада садржи три (C5, C6, C7). Кладе нису подржане високим bootstrap вредностима (<50%).

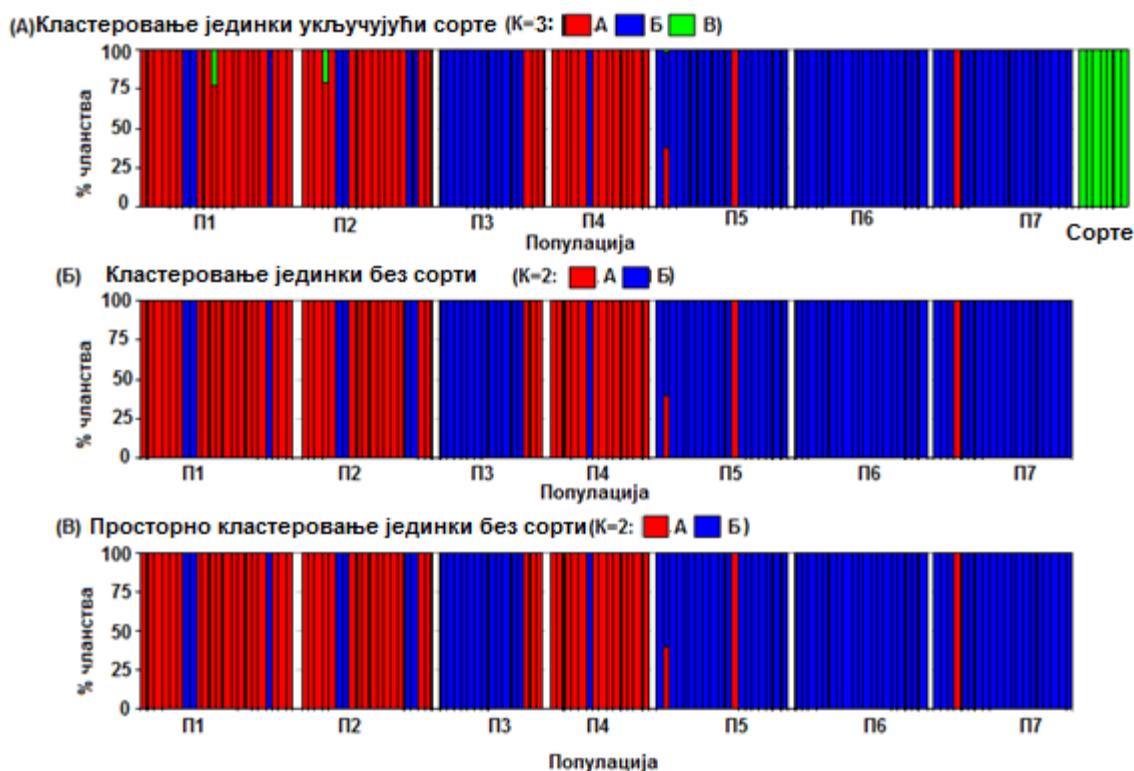


Графикон 15. Neighbor-net дијаграм на бази Nei-ове генетичке удаљености између седам популација дивље малине



Слика 12. Neighbor joining дрво сорти малине подржано од стране јединки дивље малине

Анализа структуре популације коришћењем индивидуалних кластера у BAPS-у ако су сви узорци укључени је показала да је највиша стопа маргиналне вероватноће (-11054,43) установљена код $K = 3$ (Слика 13А) и вероватноћа чланства свих сорти у кластеру В је једнака 1, што указује на јасну одвојеност сорти од дивљих популација. Урађене су додатне анализе без гајених сорти, без географских координата (Слика 13Б) и једна са географским координатама (Слика 13В). Обе анализе су произвеле скоро идентичне резултате. Најбоље партиције (при $K = 2$) су добиле маргиналне вероватноће од -10256,32 и -10364,28. Кластер А је обухватио највише индивидуа које припадају планинским популацијама (Гоч, Студена планина, Озрен), а кластер Б је обухватио индивидуе које припадају субалпијским популацијама (Жељин, Стара планина, Голија, Копаоник). Просечне вероватноће чланства кластера са највећим бројем бодова се крећу од 0,79 (Студена планина у кластеру А у обе анализе) до 1,00 (Голија у кластеру Б у обе анализе).



Слика 13. Генетичка структура популација дивље малине и сорти добијена из Бајесове анализе у BAPS - у: (A) Кластеровање јединки укључујући сорте, (Б) Кластеровање јединки без сорти, (В) Просторно кластеровање јединки без сорти

Анализа молекуларне варијансе (AMOVA) је показала да је највећи молекуларни диверзитет утврђен унутар популација (76,88%), укључујући гајене сорте (Табела 31). Двосмерни AMOVA тест који је укључио гајене сорте је открио да је 16,37% генетичке варијабилности објашњено разликама између дивљих и гајених јединки [$\phi_{ST} = 0,164$; $P(\phi_{ST}) < 0,0001$]. У једносмерном AMOVA тесту између и унутар дивљих популација, међупопулацијаска компонента генетичке варијабилности је била 8,14 % [$\phi_{ST} = 0,081$; $P(\phi_{ST}) < 0,0001$].

Просечна вредност упаривања ϕ_{ST} је била 0,081, све упарене ϕ_{ST} вредности између дивљих популација су биле статистички значајне ($P < 0,05$) осим између популација са Жељина и Копаоника (0,007). Груписањем популација у три просторне групе, компонента генетичке варијансе која се приписује разликама између тих група није статистички значајна [$0,98\%$; $\phi_{ST} = 0,010$; $P(\phi_{ST}) = 0,321$].

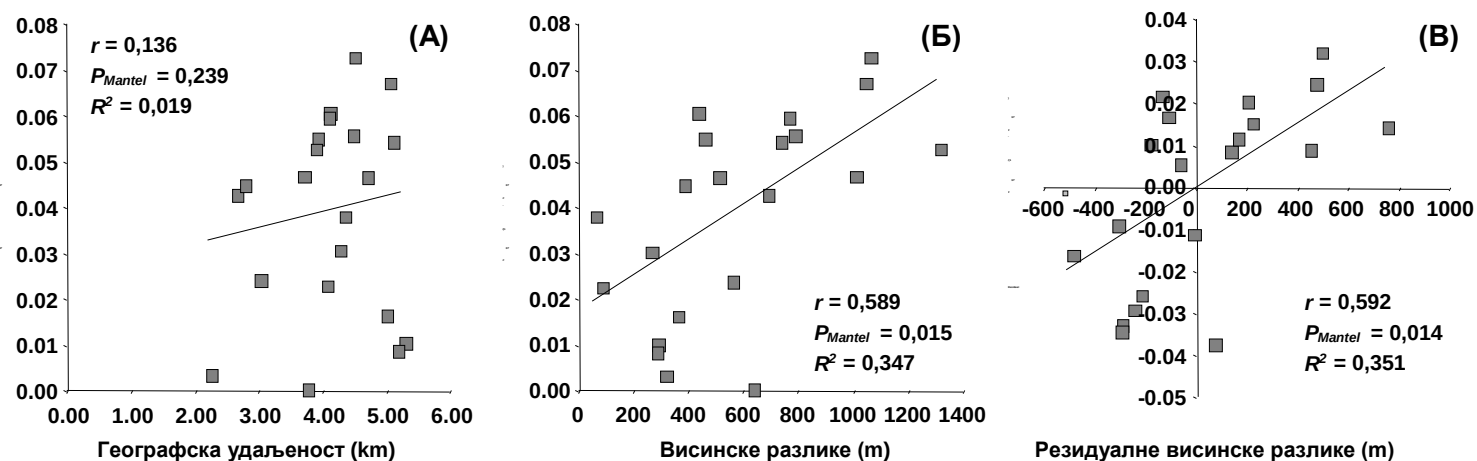
Са друге стране, двосмерна AMOVA која је обухватила анализу између две висинске групе указала је да је међугрупна компонента варијансе статистички значајна [6,33%; $\phi_{ST} = 0,063$; $P(\phi_{ST}) < 0,0001$]. Виши проценат варијације се може приписати разликама између група него разликама унутар популација у висинским групама.

Табела 31. AMOVA анализа за поделу AFLP разноликости малине

Анализа	Извор варијације	df	Компонента варијансе	Проценат варијације	ϕ -statistics	$P(\phi)$
(А)	Дивље vs. Култивисане	1	4,60	16,37	0,164	< 0,0001
	Између популација	6	1,90	6,75	0,081	< 0,0001
	Унутар популација	127	21,61	76,88	0,231	< 0,0001
(Б)	Између дивљих популација	6	1,90	8,14	0,081	< 0,0001
	Унутар популација	121	21,48	91,86		
(В)	Између просторних група	2	0,23	0,98	0,010	0,321
	Између популација	4	1,73	7,38	0,074	< 0,0001
	Унутар популација	121	21,48	91,65	0,084	< 0,0001
(Г)	Између висинских група	1	1,52	6,33	0,063	< 0,0001
	Између популација	5	1,03	4,28	0,046	< 0,0001
	Унутар популација	121	21,48	89,38	0,106	< 0,0001

Корелација између географских растојања [$\ln(\text{km})$] и упарених $F_{ST}/(1-F_{ST})$ односа била је мала ($p = 0,136$) и није значајна према Mantel-овом тесту ($P_{Mantel} = 0,239$) што указује на одсуство типичног обрасца изолације на основу удаљености (IBD) међу популацијама (Слика 14А). Са друге стране, значајна корелација је пронађена између разлика у надморској висини истраживаних локалитета (у метрима) и упарених $F_{ST}/(1-F_{ST})$ односа ($r = 0,589$; $P_{Mantel} = 0,015$), указујући на то да 34,7% генетичке разноликости између популација може бити објашњено разликама у надморској висини (Слика 14Б).

Слични резултати су добијени тестирањем корелације између висинских разлика и упарених $F_{ST}/(1-F_{ST})$ односа, при чему се узимају у обзир географске удаљености ($p = 592$; $P_{Mantel} = 0,014$; $R^2 = 0,351$) у тросмерном Mantel тесту, што потврђује да су разлике у надморским висинама одиграле кључну улогу у структурирању генетичке разноврсности популација малина (Слика 14В).



Слика 14. Изолација на основу удаљености (IBD) и изолација на основу надморске висине (IBA) популација дивље малине са простора Србије. Парцеле једноставних и парцијалних Мантелових тестова који показују односе између (А) географске и генетичке удаљености, (Б) надморске висине и генетских удаљености, и (В) резидуалне надморске висине и генетских удаљености узимајући у обзир географске раздаљине међу седам популација дивље малине

Малина (*Rubus idaeus*) се користи у исхрани и као лековита биљка још од античких времена, познавање генетичког диверзитета може допринети са једне стране програмима селекције и оплемењивања и коришћења овог материјала у сврхе креирања нових и/или побољшаних сорти, а са друге, у унапређењу управљања ресурсима и очувања дивље малине као врсте (Rivers и сар., 2014). Анализа AFLP маркера се показала као погодна за проучавање структуре популације, као и за разјашњавање филогенетских односа на нижим таксономским категоријама (Safer и сар., 2011; Šoštarić и сар., 2012; Peng и сар., 2018). У овој студији је било укључено седам дивљих популација, које се могу поделити у три просторне групе и две висинске групе, као и седам гајених сорти.

Најмања пропорција полиморфних трака је пронађена код сорти, с обзиром да увођење у културу, кроз „синдром припитомљавања“ (Harlan, 1992) као и селекција и генетички дрифт кроз ефекат уског грла (Tanskley and McCouch, 1997), могу довести до губитка приватних алела и смањења генетичког диверзитета. Wright и сар., (2005) су доказали диверзитет полиморфизма једног нуклеотида (SNP) код 774 генска фрагмента у 14 сродних линија кукуруза (*Zea mays* ssp. *mays*), које представљају модеран кукуруз, и 16 линија мексичког кукуруза (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) и пронашли 3463 SNP код обичног кукуруза и 6136 SNP код мексичког кукуруза, што је у складу са синдромом уског грла у току процеса припитомљавања кукуруза. Употреба микросателитних маркера код кајсије (*Prunus armeniaca*) показала је значајно смањење алела и приватних алела, поређењем северно Медитернатских и југозападно Медитернатских региона са Ирано-Кавкаским регионом (Bourguiba и сар., 2012).

Анализа главних компоненти је показала да се сорте јасно разликују од дивљих јединки, јер су осе PCo2 и PCo3 одвојили сорте од дивљих популација. Neighbor joining стабло сорти малине укоренењено јединкама дивље малине је показало две кладе (Слика 12), једна која садржи сорте „Meeker“, „Willamette“, „Polka“ и „Polana“, и друга која садржи „Loganberry“, „Tayberry“ и „Black Jewel“. Одуство високе bootstrap подршке може бити објашњено сложеним педигреима сорти (Dale и сар., 1993; Dossett и сар., 2012). Уколико су сорте укључене у BAPS анализу, сви се заједно групишу у кластер В (Слика 13А). Овакво груписање се може очекивати, с обзиром на то да код већине сорти доминира пет родитељских, „Lloyd George“ и „Pyne’s Royal“ произведени из *R. idaeus*, „Newburgh“ из *R. strigosus* и „Preussen“ и „Cuthbert“ укрштањем *R. idaeus* и *R. strigosus* (Dale и сар., 1993).

Слично груписање сорти и дивљих популација се може видети и код других врста (Shim и Jørgensen, 2000; Racchia и сар., 2003). Проучавање дивље популације су показале сличан ниво диверзитета у различитим популацијама, чак и ако су популације снажно изоловане, оне су и даље сачувале сличне нивое генетичке разноврсности у географском подручју (Wróblewska, 2013). Највиши диверзитет, највише приватних маркера и највиша RI вредност је пронађена у популацији са Озрена. Овакви резултати указују да је ова популација дуже изолована и вероватно са стабилном динамиком током дужег времена, док су остале популације утемељене касније (Michl и сар., 2010; Yu и сар., 2014). Шенонов информациони индекс (I) и генетички диверзитет (H_E) су нижи од просека код популација које припадају висинској групи изнад 1000 m надморске висине, осим популације са Старе планине где су вредности I и H_E више од просека (Табела 31). Сличан тренд је забележен код многих врста са различитом висинском дистрибуцијом (Ohsawa и Ide, 2007). Код врсте *Fagus silvatica* забележено је опадање генетичког диверзитета са надморском висином (Jump и сар., 2006), док код врсте *Quercus crispula* није било значајне изолације на основу удаљености међу популацијама дуж хоризонталне или вертикалне осе.

Анализом главних компоненти оса PCo1 раздвајао планинске популације од субалпијских. Разлика између планинских и субалпијских популација је потврђена и на основу Neighbour-net дијаграма са великом bootstrap подршком, а такође је доказан проток гена између суседних планинских популација, Гоч и Студена планина, као и субалпијских популација Жељин и Копаоник. Такође, уочљив је проток гена између субалпијске популације Голија и планинске популације Озрен. Генетичко раздвајање на основу надморске висине је забележено и код других врста као што је *Sophora davidii* (Li-Li и сар., 2016), где се ово раздвајање може приписати различитим еколошким факторима. Код бројних врста сматра се да различити фактори, као што су висина, фрагментација станишта, локација и величина популације, утичу на генетичку разноврсност унутар популација. Код врсте *Salvia officinalis* (Rešetnik и сар., 2016) анализа SSR маркера указала је на то да је једна од могућих еволуцијских трајекторија, након последњег глацијалног максимума, та да су врсте преживеле у неколико рефугијума који показују истовремену дивергенцију у три генетске групе. SSR анализа 65 узорака врсте *Hordeum vulgare* L. ssp. *hexastichon* var. *nudum* је показао географску диференцијацију на три подгрупе (Feng и сар., 2006).

BAPS анализа без сорти је груписала дивље популације у два кластера. BAPS анализа дивљих популација са или без просторних информација је довела до груписања јединки у два кластера (Слика 13Б и 13В). На основу BAPS анализе откривено је да је генетичка структура дивљих популација повезана са висинским групама, а не са просторним групама. Код *R. idaeus* ова чињеница може бити објашњена разликом у фенологији између различитих надморских висина и отуда мало шанси за проток гена преко полена (Graham и сар., 2003). Раздвајање популација је такође забележено и за врсту *Quercus petrea* са француских Пиринеја, где је надморска висина имала већи утицај на раздвајање популација него просторна удаљеност (Alberto и сар., 2010).

На основу AMOVA анализе је утврђено да се већина генетичког диверзитета налази унутар популација, што је карактеристично за алогамне врсте (de Souza и сар., 2013). Овакав резултат се може објаснити чињеницом да се популације развијају у константним условима животне средине, који се нису мењали од последњег леденог доба пре 10 000 година, а у којима делује стабилизациона селекција која одржава високу варијабилност унутар популација. Између различитих генотипова нема разлике у адаптивној вредности (преживљавање и репродуктивни успех) па се варијабилност одржава. Мала разлика између популација је последица уравнотежених услова животне средине, па иако су популације удаљене не постоје селективни притисци који би фаворизовали међупопулацијско повећање разлика. AMOVA анализа дивљих популација је показала ниску диференцираност популација и да подела између просторних група није била значајна, док је подела између висинских група значајна. Испитивање пуцања пупољака и висине биљака врсте *R. idaeus* са различитих надморских висина у Шкотској указује на то да се они са већих висина разликују од мање изложених популација с обзиром на касније отварање пупољка и низак раст (Jennings, 1964). Graham и сар. (2003) су употребом RAPD маркера за испитивање генетичке разноликости популација дивљих малина дошли до резултата да се станишта генетички различитих дивљих популација могу груписати у планинске, долиненске и субалпийске кластере. Ово такође указује на бољи проток гена између популација на истим надморским висинама. Сличан образац је забележен код других биљних врста. Генетичка структура код врсте *Poa hiemata* на основу шест микросателит маркера је указала на структурирање дуж висинских трасеката (Byars и сар., 2009).

Код *Oryza sativa* AMOVA анализа 48 SSR и десет неповезаних генских локула је показала значајну генетску диференцијацију међу висинским зонама (Cui и сар., 2017). Код популација врста *Fraxinus angustifolia* (Temunović и сар., 2012) и *Tanacetum cinerariifolium* (Grdiša и сар., 2014) са простора Хрватске је доказано да је изолација на основу удаљености и изолација на основу еколошке удаљености допринела генетичкој разноликости међу популацијама. У току истраживања популација дивље малине, на основу Mantel-овог теста, доказано је одсуство изолације на основу удаљености, као и значајно раздвајање популација на основу надморске висине.

Резултати приказани у овој студији су указали на виши диверзитет у дивљим популацијама него код седам испитиваних сорти, указујући на значај конзервације дивљих представника јер они могу бити вредан извор гена за будуће програме оплемењивања, тј за унапређење отпорности на абиотичке и биотичке факторе (Colmer и сар., 2006). На основу највећег броја приватних маркера, генетичког диверзитета и индекса реткости, популација са Озрена, која се налази у централном делу истраживаног подручја, је препозната као најстарија и најдуже изолована од других популација.

ОПШТА ДИСКУСИЈА

Анализом вегетацијских база података и база података о стаништима за подручје Србије, утврђено је да се популације дивље малине јављају у различитим типовима фитоценоза и да је врсту карактерише изражена еколошка пластичност. Заступљена је у различитим типовима вегетације, од зеластих (5 ливадских заједница), преко лишћарских листопадних (преко 200 заједница), до четинарских шума и жбунастих формација (укупно у око 100 заједница где су едификатори четинари). Најмање је бројна у заједницама где су едификатори зеластих биљке, док је најбројнија у буковим заједницама, а такође велику бројност има и у заједницама у којима доминирају јела, смрча и клека. Тако је утврђено да је малина најбројнија у заједницама букве (*Fegetum montanum*, *Aceri heldreichii-Fagetum*, *Quercus-Fagetum*, *Fagetum moesiacaе montanum*). Утврђено је да дивља малина поседује велику еколошку пластичност у смислу ценотичке припадности различитим биљним заједницама и типовима станишта, у широком распону надморских висина (од 675 до 1985 m). Без обзира на релативно велики број различитих биљних заједница у којима је евидентирана, дивља малина није превише честа биљка и не распростире се на великим површинама. Треба рећи да су и многе заједнице које су запажене у анализираним литературним изворима заправо синоними и да је њихов број сигурно значајније мањи него што је представљен. Уз то, бројност јединки је у већем делу ових фитоценоза мала, те је број популација који је узет у нашим истраживањима оправдан, посебно као модел у анализи хетерогених типова података.

Истраживане локалитети припадају двома просторним групама (југозападна и југоисточна Србија) које су јасно удаљене једна од друге и двома висинским групама (локалитети испод и изнад 1000 m). За етноботаничка истраживања разлике међу висинским групама нису релевантне и нису, очекивано, ни дале значајне резултате, па ти подаци нису ни приказани, док су јасне разлике уочене између просторних група што је била и хипотеза, с обзиром на разлике у социо-економским и културолошким карактеристикама становништва на наведеним макролокалитетима. За све остале области истраживања је примењена анализа просторних и висинских група.

Етноботаничко истраживање традиционалне употребе дивље малине је спроведено на девет локалитета који припадају областима југозападне (ЈЗС) и југоисточне Србије (ЈИС). Истраживана подручја се налазе у високопланинским, руралним деловима Србије, који су насељени углавном Србима православне вероисповести. Циљ истраживања је био да се прикупе и анализирају етноботанички подаци за простор Србије, као и да се упореде са већ постојећим подацима за простор Балкана. Анализом одговора добијених у упитницима од 93 испитаника, дошло се до информација о употреби листова, плодова и целих изданака дивље малине у медицинске сврхе, затим у исхрани, али и козметици. Лист дивље малине се користи за лечење и превенцију више обољења/стања (стомачни проблеми, упала простате, анемија, побољшање имунитета, гинеколошка обољења – вагинитис и упала јајника, трудноћа, дојење и упала ока). На простору југозападне Србије лист дивље малине се најчешће користи за лечење стомачних тегоба и упале простате, док се на простору југоисточне Србије углавном користи за превенцију и лечење гинеколошких обољења, као и током трудноће и дојења, па је народни назив за дивљу малину „женска биљака“ наведен од стране испитаника са локалитета у југоисточној Србији (Власина) оправдан управо чињеницом да се користи код „женских“ болести. Употреба плодова је подједнако заступљена на читавом истраживаном подручју. Користе се свежи плодови, али и у облику различитих традиционалних производа (сок, слатко, алкохолна пића), укључујући и неколико врста посластица као што су пите, колачи и торте. На простору југозападне Србије плодови се махом користе за припрему сока (сирупа), али и традиционалног српског производа – слатко, као и за припрему различитих посластица. На простору југоисточне Србије плодови дивље малине се углавном користе за припрему безалкохолних и алкохолних напитака. Допринос спроведених истраживања огледа се у наводима о употреби листа дивље малине у народној медицини, за које нису постојали подаци за подручје Србије, односно Балкана, али и уопште, а тичу се профилаксе и ублажавања симптома код упале простате и упале ока, али и коришћења декокта (чаја) током дојења.

Испитивањем квалитета плодова и традиционалних производа (укупни шећери, органске киселине и витамин Ц) утврђено је да су плодови дивље малине изузетно богати витамином Ц, а да и у производима остаје његова велика количина имајући у виду технологију припреме.

Узимајући у обзир да дивља малина расте без додатка ђубрива, пестицида и других адитива, у поређењу са сортама гајене малине њени плодови, као и производи представљају извор високовредних нутритивних својстава и здраве хране.

Овом студијом обухваћена су и морфоанатомска истраживања. Од морфолошких параметара испитивани су висина и обим жбунова, као и дужина и ширина листова. Највише просечне висине жбунова су забележене код јединки са Гоча и Студене планине. Ове популације се јављају на надморским висинама испод 1000 m. Јединке са Копаоника имају најмању висину жбунова, а оне насељавају станишта која се налазе на близу 2000 m надморске висине. Намеће се закључак да је надморска висина фактор који битно утиче на испољавање одређених морфолошких карактеристика. Ова хипотеза је доказана и статистичким методама, па је потврђено да је надморска висина чинилац који утиче на дискриминацију популација према свим испитиваним морфолошким карактеристикама. Анализом климатских фактора, станиште дивље малине на Копаонику се издвојило према највишој просечној годишњој температури. Станишта на којима се јавља дивља малина на овом локалитету су отворена, са великим бројем сунчаних дана и сви ти фактори заједно су утицали да јединке ове популације имају малу висину. Анатомска анализа листа је обухватала мерење девет анатомских параметара (висина ћелија епидермиса лица и наличја, дебљина листа, дебљина палисадног и сунђерастог ткива, дужина и ширина главног проводног снопића, дужина и ширина проводних снопића) на трајним микроскопским препаратима. Најдебље листове имале су јединке са Голије. Ова популација се издвојила и по осталим анализираним анатомским параметрима: ћелије епидермиса су највише, палисадно и сунђерасто ткиво је код њих најизраженије. Слично као за морфолошке параметре, и овде се надморска висина показала као битан фактор за већину испитиваних карактеристика. Оне јединке које се јављају на већим надморским висинама имају дебље и мање листове, док представници популација са мањих надморских висина имају тање листове. На овакав резултат анатомских испитивања су утицали климатски фактори.

Фитохемијска анализа је обухватила одређивање концентрације секундарних метаболита (укупних фенолних једињења, флавоноида, танина и антоцијанина) и антиоксидативну активност метанолних екстраката листова и плодова дивље малине. Највише укупних фенолних једињења у екстрактима листа је забележено у узорцима са

Студене и Старе планине, као и Гоча. Екстракти листова ових популација су имали и најизраженију антиоксидативну активност. Највише укупних фенолних једињења у екстрактима плодова је забележено код узорак са Старе и Студене планине, али и Голије. С обзиром да су количина укупних фенолих једињења и антиоксидативна активност у корелацији, код ових узорак је забележена и највиша антиоксидативна активност. Генерално, више секундарних метаболита и јача антоксидативна активност је забележена у узорцима листова него плодова, па се може закључити да су наведене компоненте високо специфичне за тип ткива. Биолошка активност (антимикробна и антиканцерогена) је одређивана према неколико бактерија које су веома битне за функционисање дигестивног тракта, као и према канцеру дебелог црева. Резултати су показали да екстракти листова имају антимикробну активност према бактерији *Escherichia coli*, па се лист дивље малине са простора Србије може препоручити као додатак чајним мешавинама за третирање различитих инфекција. Екстракти листова су показали и благу антиканцерогену активност, за разлику од плодова. Приметно је да узорци оних популација које се јављају на вишим надморским висинама, имају више секундарних метаболита и бољу биолошку активност, што је у складу са познатом чињеницом да су биосинтеза и акумулација секундарних метаболита у складу са срединским факторима.

Примењеним етноботаничким методама је утврђено да се на територији Србије лист и плод дивље малине широко користе. У народној медицини се користи лист, док се плод користи у исхрани. Фитохемијске анализе су показале да су и лист и плод богати извори секундарних метаболита са израженом антиоксидативном активношћу. Вредности укупних фенолних једињења су у опсегу од 59,68 до 96,83 mg GA g⁻¹ у екстрактима листа, као и од 24,29 до 38,71 mg GA g⁻¹ у екстрактима плодова. Највише вредности танина и антоцијанина су забележене у екстрактима листова популација из југоисточне Србије, 1,27 mg mL⁻¹ (Стара планина) и 9,00 mg mL⁻¹ (Озрен). Резултати фитохемијских анализа показују да је широка традиционална употреба оправдана, посебно ако се придода и чињеница да су екстракти листова имали добру антимикробну, али и благу антиканцерогену активност. Анализом одговора добијених у току етноботаничких интервјуа утврђено је да се лист дивље малине највише користи за лечење стомачних тегоба, а антимикробна активност екстракта листова је била најбоља против бактерије *Escherichia coli*, чиме је доказана оправданост употребе.

Показало се да су листови јединки које расту на већим надморским висинама богатији секундарним метаболитима, имају бољу антиоксидативну активност, али и да су дебљи од оних који се јављају на мањим висинама.

Истраживања генетичке варијабилности обухватила су и седам најзаступљенијих сорти малине на подручју Србије („Mekeer“; „Willamette“; „Polka“; „Polana“; „Loganberry“; „Tayberry“; „Black Jewel“), како би се утврдила могућа веза и положај у односу на дивљу врсту. Сорте настају дуготрајним процесима селекције (оплемењивања) током којих се врши исцрпљивање генетичке варијабилности и хомозиготизација гена (и то не само оних за које се врши селекција), јер се најчешће врши укрштање у сродству, што има за последицу јасну разлику између сорти и дивљих екотипова. Надморска висина је битан фактор раздвајања и у молекуларном смислу, па се 34,7% генетичког диверзитета може приписати разликама у надморској висини, тако да је она кључан чинилац у структурирању генетичке разноврсности. Највећи молекуларни диверзитет је пронађен унутар дивљих популација (91,68%), док је између популација диверзитет 8,14%. Овакав резултат се може објаснити чињеницом да се популације развијају у константним условима животне средине, који се нису мењали од последњег леденог доба пре 10.000 година, а у којима делује стабилизациона селекција која одржава високу варијабилност унутар популација.

Између различитих генотипова нема разлике у адаптивној вредности (преживљавање и репродуктивни успех) па се варијабилност одржава. Мала разлика између популација је последица уравнотежених услова животне средине, па иако су популације удаљене не постоје селективни притисци који би фаворизовали међупопулацијско повећање разлика. Битно је поменути и да изостаје типичан образац изолације на основу удаљености. Надморска висина је битан чинилац раздвајања популација и у морфоанатомском смислу, па је тако она фактор који условљава морфолошке, али и већину анатомских разлика. Велика еколошка пластичност, у смислу чињенице да се дивља малина јавља у великом распону надморских висина у оквиру различитих фитоценоза и типова вегетације – од зељастих до четинарских, одразила се на испољавање свих анализираних параметара: морфоанатомских, фитохемијских, а што је показано и на нивоу генетичке диференцијације испитиваних популација.

Сагледавањем свих добијених резултата, показало се да су подаци добијени у етноботаничким истраживањима оправдани, јер је доказана антимикробна и антиканцерогена активност екстарката листова дивље малине. Пошто су се нови етноботанички налази односили на употребу листа за лечење упале простате и гинеколошких обољења, нова истраживања екстраката листа би требало усмерити у том правцу, како би се утврдила оправданост употребе. У етноботаничким истраживањима утврђене су статистички значајне разлике између два макролокалитета, које су последица социо-економских и културолошких разлика.

Велика еколошка пластичност дивље малине огледа се и у варирању морфоанатомских (нпр, величина и дебљина листа) и фитохемијских особина, што је у складу са изнетим подацима о присутности ове врсте у великом броју различитих заједница. Разлике у фитохемијском профилу су последица разлика у генетичкој структури популација, али и вероватно, много више као одговор на услове који владају на различитим стаништима на којима су се популације јављају. Јединке са виших надморских висина имају више биоактивних молекула јер обично живе у условима повећаног стреса (у првом реду интензивно UV зрачење). Установљена варијабилност већине испитиваних параметара, од генетичких до фитохемијских, говори у прилог вијабилности и стабилности популација, без обзира на релативно малу бројност јединки у оквиру популација. Статистичка анализа је показала да је много значајније раздвајање на основу надморске висине, него под утицајем просторног раздвајања, што указује на бољи проток гена на сличним надморским висинама. Применом молекуларних маркера као најстарија и најдуже изолована, издвојила се популација са планине Озрен. Ова популација се издвојила и по садржају неких секундарних метаболита, па је тако највише антоцијанина детектовано у екстракту листова који су узети са овог локалитета. Јединке популације са Озрена се издвајају и према неким испитиваним морфоанатомским карактерима. Листови ових индивидуа су дужи и шири у односу на већину других популација, а и неки анатомски параметри су били карактеристични (најтањи листови, мања величина проводних снопића, мања висина епидермиса). Прегледом климатских података, Озрен је планина са најмањом годишњом количином падавина, што је имало утицај на овакве резултате.

Србија је карактеристична као област богате и разноврсне природне баштине, па је то свртстава у једно од најважнијих подручја биодиверзитета. С обзиром да разноврсност биљног генетичког ресурса има тенденцију сталног смањења, потребно је извршити детаљно мапирање станишта дивље малине као значајног природног ресурса, како би се припремиле и предузеле адекватне мере заштите ради њеног очувања (*in situ* и *ex situ* конзервација). Дивљу малину са простора Србије би требало заштити и искорисити као ресурс у процесима селекције и оплемењивања за производњу нових сорти са унапређеним особинама у смислу бољег приноса и снажније отпорности на спољашње факторе. Даља истраживања требало би усмерити и на разлике у појединим значајним биомолекулима и биоактивним једињењима, као на пример елаготанинима и малина кетонима. Било би веома значајно детаљно анализирати ефекте екстракта листова на антитуморску активност и апоптозу ћелија канцера простате, као неких облика гинеколошких тумора. Уз то, требало би проверити утицај појединих компоненти екстракта на феномен лактације, посебно ниво пролактина. Коначно, требало би сагледати могућности унапређења и валоризације традиционалних производа од или са додатком дивље малине, како би се скренула пажња на значај ове врсте.

ЗАКЉУЧЦИ

На основу етноботаничких, морфоанатомских, фитохемијских и молекуларних анализа природних популација дивље малине са подручја Србије донети су следећи закључци:

- ✚ Дивља малина са простора Србије се користи у народној медицини, као и за припрему различитих традиционалних производа.
- ✚ Чај од листова малине се користи за третирање више (9) болести/стања, од којих је најшира употреба за лечење стомачних тегоба и третман анемије.
- ✚ На простору југоисточне Србије чај се широко користи за лечење гинеколошких обољења, што је у вези са етимологијом врсте, тј. наводом о имену „женска биљка“ за дивљу малину на овом подручју.
- ✚ Употреба плода је подједнако заступљена на оба испитивана макролокалитета, али се на простору југозападне Србије више користи за припрему различитих посластица, нарочито баклаве (што је последица утицаја муслиманске религије на овим просторима), док се на простору Југоисточне Србије плод малине више користи за припрему алкохолних пића и традиционалног српског производа „слатко“.
- ✚ Нови подаци о медицинској употреби дивље малине на простору Србије, и Балкана се односе не лечење упале простате, третман очних инфекција, превенцију побачаја, третман гинеколошких обољења, као примена у току дојења за подстицај лактације.
- ✚ Плодови малине су богат извор витамина Ц, органских киселина и шећера, тако да се могу препоручити као здрава храна, посебно због добрих антиоксидативних особина.
- ✚ Дивља малина са простора Србије се може препоручити и као богат извор природних антиоксиданаса, нарочито фенолних једињења.

- ✚ Посебно богати секундарним метаболитима су узорци листова са локалитета на већим надморским висинама који су истовремено показали и најбољу биолошку активност.
- ✚ Листови малине се могу препоручити као додатак чајним мешавинама за лечење различитих инфекција (нарочито за гастроинтестинална обољења), с обзиром да је најјача антимикуробна активност забележена према бактерији *Escherichia coli*.
- ✚ Листови малине показују антиканцерогену активност према канцеру дебелог црева, док плодови малине нису показали активност.
- ✚ На основу упоредне анализе морфолошких особина издвојила се популација са Студене планине, код чијих представника су забележени најдужи и најшири листови, као и највећи обим жбунова.
- ✚ Праћењем анатомских особина издвојила се популација са Голије, код чијих представника су забележене највише вредности свих испитиваних анатомских параметара.
- ✚ Примена AFLP маркера се показала као веома применљива за анализу генетичког диверзитета и структуру дивљих популација, као и сорти малине.
- ✚ Значајно већа варијабилност је забележена код дивљих популација него код анализираних гајених сорти.
- ✚ Популација са Озрена се у односу на остале издвојила као најстарија и најдуже изолована, са највише приватних маркера, као и са највишим генским диверзитетом.
- ✚ Дивљу малину са простора Србије је потребно заштити и искорисити као ресурс у процесима селекције и оплемењивања за производњу нових сорти са унапређеним особинама.

ЛИТЕРАТУРА

- Aberoumand, A., Deokule, S. S. (2008). Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan journal of nutrition*, 7(4), 582-585.
- Ačić, S., Petrović, M., Dajić-Stevanović, Z., Šilc, U. (2012). Vegetation database Grassland vegetation in Serbia. *Biodiversity & Ecology*, 4, 418-418.
- Ačić, S., Šilc, U., Petrović, M., Tomović, G., Dajić-Stevanović, Z. (2015). Classification, ecology and biodiversity of Central Balkan dry grasslands. *Tuexenia*, 35, 329-353.
- Ačić, S. (2018): Sinekološka i fitocenološka studija livadske vegetacije Srbije. Doktorska disertacija.
- Alam, M., Akram, D., Sharmin, E., Zafar, F., Ahmad, S. (2014). Vegetable oil based eco-friendly coating materials: A review article. *Arabian journal of chemistry*, 7(4), 469-479.
- Alberto, F., Niort, J., Derory, J., Lepais, O., Vitalis, R., Galop, D., Kremer, A. (2010). Population differentiation of sessile oak at the altitudinal front of migration in the French Pyrenees. *Molecular ecology*, 19(13), 2626-2639.
- Alice, L.A., Eriksson, T., Eriksen, B., Campbell, C.S. (1997). Intersubgeneric hybridization between a diploid raspberry, *Rubus idaeus*, and a tetraploid blackberry, *R. caesius* (Rosaceae). *American journal of botany*, 84, 171.
- Alice, L.A., Campbell, C.S. (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American journal of botany*, 86(1), 81-97.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*, 84(4), 551-562.

- Amidžić, L., Krivošej, Z. (2001). *Quercus-Paeonietum officinalis-masculae* Amidžić&Krivošej - nova zajednica sladuna i cera sa božurima u Nacionalnom parku "Tara." *Zaštita prirode*, Beograd 52, 15–22.
- Amidžić, L., Krasulja, S., Đorđević, Z., Panjković, B., Ostojić, D., Belij, S., Šehovac, E. (2011). Protected Natural Areas in Serbia. Ministry of Environmental, Mining and Spatial Planing, Institute for Nature Conservation of Serbia, Belgrade.
- Anderson, L.C., Creech, J.B. (1975). Comparative leaf anatomy of *Solidago* and related Asteraceae. *American Journal of Botany*, 62(5), 486-493.
- Arı, S., Temel, M., Kargioğlu, M., Konuk, M. (2015). Ethnobotanical survey of plants used in Afyonkarahisar-Turkey. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 11(1), 84.
- Ashagre, M., Asfaw, Z., Kelbessa, E. (2016). Ethnobotanical study of wild edible plants in Burji District, Segan area zone of southern nations, nationalities and peoples region (SNNPR), Ethiopia. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 12(1), 32.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Ballington, J. R., Luteyn, J. L., Thompson, M. M., Romoleroux, K., Castillo, T. (1993). *Rubus* and vacciniaceous germplasm resources in the Andes of Ecuador. *Plant genetic resources newsletter* (93): 9-15
- Bardenstein, C. (2010). Beyond univocal baklava: deconstructing food-as-ethnicity and the ideology of homeland in Diana Abu Jaber's *The Language of Baklava*. *Journal of Arabian literature*, 41, 160-179.
- Beekwilder, J., Jonker, H., Meesters, P., Hall, R.D., van der Meer, I.M., Ric de Vos, C.H. (2005). Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9), 3313-3320.
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M. A., Bertelli, D. (2004). Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of food science*, 69(3), 164-169.
- Благојевић, Р., Божић, В. (2012). Технологија производње малине.

- Blaženčić, Z. (1978). Biljne zajednice i stanista Stare planine (Plant communities and habitats of the Stara Planina), SANU, Beograd (Serbian Academy of Sciences, Belgrade), 389 pp.
- Bobinaite, R., Viškelis, P., Venskutonis, P. R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food chemistry*, 132, 1495-1501.ž
- Böhm, V., Puspitasari-Nienaber, N.L., Ferruzzi, M.G., Schwartz, S.J. (2002). Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(1), 221-226.
- Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., Beliveau, R. (2007). Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NF κ B by edible berry juice. *Anticancer research*, 27(2), 937-948.
- Bourguiba, H., Audergon, J.M., Krichen, L., Trifi-Farah, N., Mamouni, A., Trabelsi, S., D'Onofrio, C., Asma, B.M., Santoni, S. and Khadari, B. (2012). Loss of genetic diversity as a signature of apricot domestication and diffusion into the Mediterranean Basin. *BMC Plant Biology*, 12, p.49.
- Bowen-Forbes, C.S., Zhang, Y., Nair, M.G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of food composition and analysis*, 23(6), 554-560.
- Bryant, D., Moulton, V. (2004). Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular biology and evolution*, 21(2):255–265.
- Булатовић, С. (1972). У: Јосифовић, М (уредник): Флора Републике Србије, САНУ, Београд, 16-28.
- Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutiene, I., Stackevicene, E., Nikolajevs, L., Janulis, V. (2009). Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta poloniae pharmaceutica*, 66(4), 399-408.
- Byars, S.G., Parsons, Y., Hoffmann, A.A. (2009). Effect of altitude on the genetic structure of an Alpine grass, *Poa hiemata*. *Annals of botany*, 103(6), 885-899.

- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(11), 3426-3431.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free radical biology and medicine*, 22(5), 749-760.
- Čarni, A., Mucina, L. (2015). Validations and Typifications of Some South Europe an Syntaxa. *Hacquetia*, 14(2), 289-299.
- Carović-Stanko, K., Liber, Z., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M., Satovic, Z. (2011). Molecular and chemical characterization of the most widespread *Ocimum* species. *Plant systematics and evolution*, 294(3-4), 253-262.
- Castillo, N.R.F. (2006). Fingerprinting and genetic stability of *Rubus* using molecular markers.
- Castro-Díez, P., Puyravaud, J.P., Cornelissen, J.H.C. (2000). Leaf structure and anatomy as related to leaf mass per area variation in seedlings of a wide range of woody plant species and types. *Oecologia*, 124(4), 476-486.
- Çekiş, Ç., Özgen, M. (2010). Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of food composition and analysis*, 23(6), 540-544.
- Chen, L., Xin, X., Zhang, H., Yuan, Q. (2013). Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties. *Journal of functional foods*, 5, 508-515.
- Clifford, M.N., Scalbert, A. (2000). Ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the science of food and agriculture*, 80(7), 1118-1125.
- Colmer, T.D, Flowers, T.J, Munns, R. (2006). Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of experimental botany* 57, 1059–1078.
- Corander, J., Waldmann, P., Sillanpää, M. J. (2003). Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163(1), 367-374.
- Corander, J., Marttinen, P. (2006). Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular ecology*, 15(10), 2833-2843.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., Tang, J. (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC bioinformatics*, 9(1), 539.

- Cordell, S., Goldstein, G., Mueller-Dombois, D., Webb, D., Vitousek, P.M. (1998). Physiological and morphological variation in *Metrosideros polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient: the role of phenotypic plasticity. *Oecologia*, 113(2), 188-196.
- Cui, D., Tang, C., Li, J., Xinxiang, A., Yu, T., Ma, X., Dai, L. (2017). Genetic structure and isolation by altitude in rice landraces of Yunnan, China revealed by nucleotide and microsatellite marker polymorphisms. *PloS one*, 12(4), e0175731.
- da Silva, F.L., Escribano-Bailón, M.T., Alonso, J.J.P., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT-Food science and technology*, 40(2), 374-382.
- Dajić-Stevanović, Z. D., Petrović, M., Ačić, S. (2014). Ethnobotanical knowledge and traditional use of Plants in Serbia in relation to sustainable rural development. In: Pieroni, A., Quave, C.L. (Eds), *Ethnobotany and Biocultural Diversities in the Balkans*. Springer, New York, NY. pp. 229-252.
- Dajić-Stevanović, Z., Ilić, B. (2005, June). Sustainable development of natural resources of medicinal and aromatic plants in Serbia. In Proceedings of papers of symposium with international participation "Environment for Europe," Belgrade (pp. 5-8).
- Dajić-Stevanović, Z., Peeters, A., Vrbničanin, S., Šoštarić, I., Ačić, S. (2008). Long term grassland vegetation changes: case study Nature Park Stara Planina (Serbia). *Community ecology*, 9(1), 23-31.
- Dajić-Stevanović, Z., Lazarević, D., Petrović, M., Ačić, S., Tomović, G. (2010). Biodiversity of natural grasslands of Serbia: state and prospects of utilization. *Biotechnology in animal husbandry*, 26, 235-247.
- Dajić-Stevanović,
<http://www.amapseec.com/Herbal%20sector%20of%20Serbia%20overview.pdf>
- Dale, A., Moore, P. P., McNicol, R. J., Sjulín, T. M., Burmistrov, L. A. (1993). Genetic diversity of red raspberry varieties throughout the-world. *Journal of the American society for horticultural science*, 118(1), 119-129.
- Daubeney, H. A. (1996). Brambles. *Fruit breeding*. 2, 109-190.

- de Ancos, B., Ibanez, E., Reglero, G., Cano, M.P. (2000). Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 873-879.
- Dei Cas, L., Pagni, F., Fico, G. (2015). Tradition of use on medicinal species in Valfurva (Sondrio, Italy). *Journal of ethnopharmacology*, 163, 113-134.
- Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26, 297-302.
- Dogan, Y., Ugulu, I., Durkan, N. (2013). Wild edible plants sold in the local markets of Izmir, Turkey. *Pakistan journal of botany*, 45(S1), 177-84.
- Dossett, M., Bassil, N.V., Lewers, K.S., Finn, C.E. (2012). Genetic diversity in wild and cultivated black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) evaluated by simple sequence repeat markers. *Genetic resources and crop evolution*, 59, 1849-1865.
- Dujmović Purgar, D., Duralija, B., Voća, S., Vokurka, A., Ercisli, S. (2012). A comparison of fruit chemical characteristics of two wild grown *Rubus* species from different locations of Croatia. *Molecules*, 17(9), 10390-10398.
- Durgo, K., Belščak-Cvitanović, A., Stančić, A., Franekić, J., Komes, D. (2012). The bioactive potential of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves in exhibiting cytotoxic and cytoprotective activity on human laryngeal carcinoma and colon adenocarcinoma. *Journal of medicinal food*, 15(3), 258-268.
- Džamić, M. (1989). Protocols in Biochemistry. Sci. book. Belgrade.
- Ehrich, D. (2006). AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular ecology notes*, 6(3), 603-604.
- Eu, G.S., Chung, B.Y., Bandopadhyay, R., Yoo, N.H., Choi, D.G., Yun, S.J. (2008). Phylogenetic relationships of *Rubus* species revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of crop science and biotechnology*, 11(3944), 4.
- Excoffier, L., Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10, 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, 131, 479-491.

- Fell, K.R., Rowson, J.M. (1960). ANATOMICAL STUDIES IN THE GENUS RUBUS* Part III. The Anatomy of the leaf of *Rubus loganobaccus* LH Bailey. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 12(1), 473-487.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Felsenstein, J. (2004). Inferring phylogenies (Vol. 2). Sunderland, MA: Sinauer associates.
- Feng, Z.Y., Zhang, L.L., Zhang, Y.Z., Ling, H.Q. (2006). Genetic diversity and geographical differentiation of cultivated six-rowed naked barley landraces from the Qinghai-Tibet plateau of China detected by SSR analysis. *Genetic and molecular biology*, 29, 330–338.
- Ferlemi, A.V., Lamari, F.N. (2016). Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants*, 5(2), 17.
- Focke, W. O. (1910). Species Ruborum monographiae generis Rubi prodromus. *Bibliotheca Botanica*, 17, 1-120.
- Focke, W. O. (1914). Species Ruborum monographiae generis Rubi prodromus. *Bibliotheca Botanica*, 17, 1-274.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F. (2011). Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Journal of medicinal plants research*, 5(7), 1128-1133.
- Givnish, T. (1979). On the adaptive significance of leaf form. In *Topics in plant population biology* (pp. 375-407). Palgrave, London.
- Gonuz, A., Özorgucu, B. (1999). An investigation on the morphology, anatomy and ecology of *Origanum onites* L. 1. *Turkish journal of botany*, 23(1), 19-32.
- Graham, J., McNicol, R.J. (1995). An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and applied genetics*, 90(7-8), 1128-1132.
- Graham, J., Marshall, B., Squire, G.R. (2003). Genetic differentiation over a spatial environmental gradient in wild *Rubus ideaus* populations. *New phytologist*, 157(3), 667-675.

- Graham, J., Smith, K., Woodhead, M., Russell, J. (2002). Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species. *Molecular ecology notes*, 2(3), 250-252.
- Grdiša, M., Liber, Z., Radosavljević, I., Carović-Stanko, K., Kolak, I., Satovic, Z. (2014). Genetic diversity and structure of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir./Sch./Bip., Asteraceae) within the Balkan refugium. *PloS one*, 9(8), e105265.
- Gruenwald, J. (2009). Novel botanical ingredients for beverages. *Journal of clinical dermatology*, 27(2), 210–216.
- Gu, Y., Zhao, C.M., Jin, W. Li, W.L. (1993). Evaluation of *Rubus* germplasm resources in China. *Acta horticulturae*, 352, 317-324.
- Gudej, J., Tomczyk, M. (2004). Determination of Flavonoids, Tannins and Ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. *Archives of pharmacal research*, 27(11), 1114-1119.
- Guerrero, J.G., Martinez, J.G., Isasa, M.T. (1998). Mineral nutrient composition of edible wild plants. *Journal of food composition and analysis*, 11(4), 322-328.
- Gülçin, İ., Topal, F., Çakmakçı, R., Bilsel, M., Gören, A.C., Erdogan, U. (2011). Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of food science*, 76(4), C585-C593.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C., Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant breeding*, 118(5), 369-390.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica* 4(1), 9.
- Harborne, J.B., Baxter, H., Moss, G.P. (Eds.). (1999). *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants* (2nd ed.). London: Taylor & Francis.
- Harlan, J.R. (1992). *Crops and man*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America. Second edition. Wisconsin, USA, Madison.
- Haslam, E. (1989). Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. CUP Archive.
- Hassani, S., Shariatpanahi, M., Tavakoli, F., Nili-Ahmadabadi, A., Abdollahi, M. (2015). The changes of bioactive ingredients and antioxidant properties in various berries during jam processing. *International journal of bioscience*, 6, 172–179.

- Hiirsalmi, H., Säkö, J. (1976, July). The nectar raspberry, *Rubus idaeus* x *Rubus arcticus*-a new cultivated plant. In Symposium on Breeding and Machine Harvesting of Rubus and Ribes 60 (pp. 151-158).
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International journal of climatology*, 25(15), 1965-1978.
- Holst, L., Haavik, S., Nordeng, H. (2009). Raspberry leaf—Should it be recommended to pregnant women?. *Complementary therapies in clinical practice*, 15(4), 204-208.
- Horvat, I., Glavač, V., Ellenberg, H. H. (1974). Vegetation südosteuropas.
- Horwitz, W. (1975). Official methods of analysis (Vol. 222). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Hosu, A., Cristea, V.M., Cimpoiu, C. (2014). Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food chemistry*, 150, 113-118.
- Howarth, D.G., Gardner, D.E., Morden, C.W. (1997). Phylogeny of *Rubus* subgenus *Idaeobatus* (Rosaceae) and its implications toward colonization of the Hawaiian Islands. *Systematic botany*, 433-441.
- Huson, D.H., Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23, 254–267.
- Jakšić, P. (Ed.). (2008). Prime Butterfly Areas: A tool for nature conservation in Serbia. Serbia.
- Jarić, S., Popović, Z., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., Mitrović, M., Pavlović, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of ethnopharmacology*, 111(1), 160-175.
- Jarić, S., Mitrović, M., Djurdjević, L., Kostić, O., Gajić, G., Pavlović, D., Pavlović, P. (2011). Phytotherapy in medieval Serbian medicine according to the pharmacological manuscripts of the Chilandar Medical Codex (15–16th centuries). *Journal of ethnopharmacology*, 137, 601-619.

- Jarić, S., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mitrović, M., Kostić, O., Karadžić, B., Pavlović, P. (2015). An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *Journal of ethnopharmacology*, 175, 93-108.
- Jennings, D. L. (1964). Some evidence of population differentiation in *Rubus idaeus* L. *New Phytologist*, 63, 153–157.
- Jennings, D. L. (1988). Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth. *Academic press*.
- Jump, A.S., Hunt, J.M., Martinez-Izquierdo, J.A., Pefluelas, J. (2006). Natural selection and climate change: temperature- linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*. *Molecular ecology*, 15, 3469-348.
- Kadakal, Ç., Duman, T., Ekinci, R. (2017). Thermal degradation kinetics of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in rosehip (*Rosa canina* L) nectar. *Food science and technology*, ahead.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 4076-4082.
- Kähkönen, M. P., Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 628-633.
- Kalkman, C. (2004). Rosaceae. In: Kubitzki, K. (eds): The families and genera of vascular plants, vol. 6, Flowering plants - Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales, pp 343–386. Springer, Berlin.
- Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A., Prior, R.L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(11), 4638-4644.
- Karakashova, L., Stamatovska, V., Babanovska-Milenkovska, F. (2012). The quality properties of raspberry jams with different sweeteners. In Proceedings of the International Symposium for Agriculture and Food, XXXVII Faculty-Economy Meeting, IV Macedonian Symposium for Viticulture and Wine Production, VII Symposium for Vegetables and Flower Production, Skopje, Macedonia (pp. 848-856).
- Keep, E. (1984). Inheritance of fruit colour in a wild Russian red raspberry seedling. *Euphytica*, 33(2), 507-515.

- Keserović, Z., Magazin, N. (2014). Voćarstvo Srbije – stanje i perspektive. Primena podataka Popisa poljoprivrede u analizi stanja poljoprivrede i planiranju agrarne politike u Republici Srbiji. Zbornik radova, str. 192-228.
- Khan M.M., Haileselassie, Y., Navis, M., Cooper, C., Sverremark-Ekström, E., Nilsson, A.S. (2017). Corrigendum: Morphologically distinct *Escherichia coli* bacteriophages differ in their efficacy and ability to stimulate cytokine release *in vitro*. *Frontiers in microbiology*, 7, 2145.
- Kljajić, N., Subić, J., Sredojević, Z. (2017). Profitability of raspberry production on holdings in the territory of Arilje. *Economics of agriculture*, 64(1), 57-68.
- Konczak, I., Zhang, W. (2004). Anthocyanins—more than nature's colours. *BioMed research international*, 2004(5), 239-240.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.
- Konić-Ristić, A., Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Juranic, Z., Menković, N., Stanković, I. (2011). Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food chemistry*, 125(4), 1412-1417.
- Kostecka-Gugała, A., Ledwożyw-Smoleń, I., Augustynowicz, J., Wyżgolik, G., Kruczek, M., Kaszycki, P. (2015). Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe. *Open chemistry*, 13, 1313–1325.
- Kovačević, T., Kicošev, S., Bubalo-Živković, M. (2007). Movement of Goc and podgorina population in the second half of XX and on the begging of XXI century. *Journal of the geographical institute Jovan Cvijic, SASA*, (57), 153-160.
- Kraft, T., Nybom, H., Werlemark, G. (1995). *Rubus vestervicensis* (Rosaceae)—its hybrid origin revealed by DNA fingerprinting. *Nordic journal of botany*, 15(3), 237-242.
- Krivošej, Z., Prodanović, D., Preljević, N., Veljković, B. (2018). *Rubus laciniatus* Willd. (Rosaceae), an introduced species new in the flora of Serbia and the Balkans. *Botanica Serbica*, 42(2).
- Kurtto, A., Weber, H. E., Lampinen, R., Senikov, A. (eds.). (2010). Atlas Florae Europaeae. Distribution of vascular plants in Europe. 15. Rosaceae (*Rubus*), pp. 97, The Committee for Mapping the Flora of Europe & Societas Fennica Vanamo. Helsinki.

- Kuzmanović, N., Šinžar-Sekulić, J., Lakušić, D. (2012). Ecologically determined variation in leaf anatomical traits of *Sesleria rigida* (Poaceae) in Serbia—multivariate morphometric evidence. *Folia geobotanica*, 47(1), 41-57.
- Lakušić, D. (1995). [Guide for flora of National Park Kopaonik [Yugoslavia]].[Serbian].
- Lakušić, D., Blaženčić, J., Randelović, V., Butorac, B., Vukojičić, S., Zlatković, B., ... & Pavićević, D. (2005). Staništa Srbije—Priručnik sa opisima i osnovnim podacima. Inst. za botaniku i bot. bašta „Jevremovac“, Biološki fakultet, Beograd.
- Lam-Himlin, D., Montgomery, E., Torbenson, M. (2012). Non-neoplastic and neoplastic disorders of the appendix. *Journal of gastrointestinal and liver diseases*, 2, 257-296.
- Larsen, M., Poll, L., Callesen, O., Lewis, M. (1991). Relations between the content of aroma compounds and the sensory evaluation of 10 raspberry varieties (*Rubus idaeus* L.). *Acta agriculturae scandinavica*, 41(4), 447-454.
- Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4), 969-978.
- Lauber, K., Wagner, G. (2007). Flora Helvetica. Flore illustrée de Suisse. Belin, Paris.
- Lewontin, R.C. (1972). The apportionment on human diversity. *Evolution Biology* 6, 381-398
- Licata, M., Tuttolomondo, T., Leto, C., Virga, G., Bonsangue, G., Cammalleri, I., Gennaro, M. C., La Bella, S. (2016). A survey of wild plant species for food use in Sicily (Italy)—results of a 3-year study in four Regional Parks. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 12(1), 12.
- Li-Li, Z., Yu, Z., Pu-Chang, W., Tian-Qiong, L., Wen, Z., Juan, C. 2016. Morphological and genetic variations of *Sophora davidii* populations originating from different altitudes in the mountains of southwestern China. *Flora*, 224, 1-6.
- Liu, C. H., Chiu, C. H., Wang, S. W., Cheng, W. (2012). Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish immunology*, 33(4), 699-706.
- Lu, L.T. (1983). Study on the genus *Rubus* of China. *Acta phytotaxonomica sinica*, 21(1), 13-25.
- Lynch, M., Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular ecology*, 3, 91-99.
- Maga, J., Squire, C., Hughes, H. (1992). Bramble dried leaf volatiles. *Food science and human nutrition*, 29, 145-148.

- Mapson, L. W. (1970). Vitamin in fruits. *The biochemistry of fruits and their products*, 1, 369-386.
- Marczal, G. (1963). *Herba hungarica*, II, 345-357 (and all thereferences cited within).
- Marshall, B., Harrison, R.E., Graham, J., McNicol, J.W., Wright, G., Squire, G.R. (2001). Spatial trends of phenotypic diversity between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus*. *New Phytologist*, 151(3), 671-682.
- Marulanda, M. L., López, A. M., Aguilar, S. B. (2007). Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop breeding and applied biotechnology*, 7(3).
- Mazur, S. P., Nes, A., Wold, A. B., Remberg, S. F., Aaby, K. (2014). Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food chemistry*, 160, 233-240.
- Menković, N., Šavikin, K., Zdunić, G., Milosavljević, S., Živković J. (2014). Medicinal Plants in Northern Montenegro: Traditional Knowledge, Quality, and Resources. In: Pieroni, A., Quave, C. L. (Eds), *Ethnobotany and Biocultural Diversities in the Balkans*. Springer New York. pp. 197-228.
- Merken, H. M., Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 577-599.
- Michl, T., Huck, S., Schmitt, T., Liebrich, A., Haase, P., Buedel, B. (2010). The molecular population structure of the tall forb *Cicerbita alpina* (Asteraceae) supports the idea of cryptic glacial refugia in central Europe. *Botanical journal of the linnean society*, 164(2), 142-154.
- Mikulić-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., Veberić, R. (2012). Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of food science*, 77(10), C1064-C1070.
- Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., Milatović, D. (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of food quality*, 34(1), 1-9.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*, 384(3), 240-242.

- Mingsheng, L. J. (1994). Shenyang College of Pharmacy, II, 68-72.
- Mišić, V., Jovanovic-Dunjic, R., Popovic, M., Borisavljevic, Lj., Antic, M., Dinic, A., Danon, J., Moghaddam, M., Omidbiagi, R., Naghavi, M.R. (2011). Evaluation of genetic diversity among Iranian accessions of *Ocimum* spp. using AFLP markers. *Biochemical systematics and ecology*, 39, 619-626.
- Mišić, V., Jovanović-Dunjić, R., Popović, M., Borisavljević, Lj., Antić, M., Dinić, A., Danon, J., Blaženčić, Ž. (1978). Biljne zajednice i staništa Stare planine. Srpska akademija nauka i umetnosti, Posebna izdanja 511, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, 49, 1–389.
- Moore, J. N. (1984). Blackberry breeding [*Rubus*, subgenus *Eubatus*]. *Horticultural Science*.
- Moore, J. N., Skirvin, R. M. (1990). Blackberry managment.[El manejo de la zarzamora]. Small, 214-244.
- Moore, P. P., Daubeney, H. A. (1993). 'Meeker' red raspberry. *Fruit varieties journal*, 47(1), 2-4.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunology methods*, 65(1-2), 55-63.
- Naruhashi, N., Iwatsubo, Y., Peng, C. I. (2002). Chromosome numbers in *Rubus* (Rosaceae) of Taiwan. *Botanical bulletin of academia sinica*, 43.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American naturalist*, 106(949), 283-292.
- Nikolić, M., Milivojević, J., Laposavić, A., Magazin, N. (2007). Perspektivne sorte jagodastih vrsta voćaka. Savetovanje „Perspektivne sorte i podloge voćaka“. Zbornik radova, 47, 39-49.
- Nikolić, M., Ivanović, M., Milenković, S., Milivojević, J., Milutinović, M. (2008). The state and prospects of raspberry production in Serbia. *Acta horticulturae*, 777, 243–250.
- Nikolić, M., Milivojević, D. R., Radivojević, D. (2008). Fruit quality of florican red raspberry cultivars grown in the Belgrade region. *Journal of scientific agricultural research*, 69(247), 63-71.
- Nile, S. H., Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144.

- Ohsawa, T., Ide, Y. (2008). Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global ecology and biogeography*, 17(2), 152-163.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Iwasaki, M., Kubo, M., Orime, T., Yoshizaki, M., Naruhashi, N. (1992). Hydrolysable tannins as chemotaxonomic markers in the Rosaceae. *Phytochemistry*, 31, 3091–3096.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. (1993). Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, 32, 507–521.
- Özgen, M., Serçe, S., Gündüz, K., Yen, F., Kafkas, E., Paydaş, S. (2007). Determining total phenolics and antioxidant activity of selected *Fragaria* genotypes. *Asian journal of chemistry*, 7, 5573-5581.
- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., Diamantidis, G. R. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food chemistry*, 102, 777-783.
- Papp, B., Erzberger, P. (2005). The bryophyte flora of Golija-Studenica biosphere reserve and some adjacent sites (SW Serbia, Serbia-Montenegro). *Studia botanica Hungarica*, 36, 101-116.
- Papp, B., Szurdoki, E., Pantović, J., Sabovljević, M. S. (2013). *Physcomitrium eurystomum* and *Pohlia prolifera*, new mosses in the bryophyte flora of Serbia. *Archives of biological sciences*, 65(2), 703-706.
- Patel, A. V., Rojas-Vera, J., Dacke, C. G. (2004). Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. *Current medicinal chemistry*, 11(11), 1501-1512.
- Pavlović, A. V., Papetti, A., Zagorac, D. Č. D., Gašić, U. M., Mišić, D. M., Tešić, Ž. L., Natić, M. M. (2016). Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia. *Industrial crops and products*, 87, 304-314.
- Peeters, A., Dajić, Z. (2006). Grassland management study for the Stara Planina, Mt. Nature Park. Proposals of biodiversity restoration measures. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management of the Republic of Serbia (Project report).
- Peng, Y.Q., Fan, L.L., Mao, F.Y., Zhao, Y.S., Xu, R., Yin, Y.J., Chen, X., Wan, D.G., Zhang, X.H. (2018). Genetic diversity and population structure of a protected species: *Polygala tenuifolia* Willd. *Comptes rendus biologiques*, 341(3), 152-159.

- Pieroni, A., Soukand, R., Quave, C. L., Hajdari, A., Mustafa, B. (2017). Traditional food uses of wild plants among the Gorani of South Kosovo. *Appetite*, 108, 83-92.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A., Campbell, C.S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant systematics and evolution*, 266(1-2), 5-43.
- Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., Artık, N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of food composition and analysis*, 15(5), 567-575.
- Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C.M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(7), 2686-2693.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määttä-Riihinen, K., Oksman-Caldentey, K. M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of applied microbiology*, 98(4), 991-1000.
- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J. C., Bailleul, F., Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*, 72(1-2):35-42.
- Raccuia, S.A., Mainolfi, A., Mandolino, G., Melilli, M.G. (2004). Genetic diversity in *Cynara cardunculus* revealed by AFLP markers: comparison between cultivars and wild types from Sicily. *Plant breeding*, 123(3), 280-284.
- Rahimmalek, M., Tabatabaei, B.E.S., Arzani, A., Etemadi, N. (2009). Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochemical systematics and ecology*, 37, 354-361.
- Rao, A.V., Snyder, D.M. (2010). Raspberries and human health: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(7), 3871-3883.

- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International journal of food microbiology*, 56(1), 3-12.
- Redžić, S., Ferrier, J. (2014). The use of wild plants for human nutrition during a war: eastern Bosnia (Western Balkans). In Pieroni, A., Quave, C. L. (Eds), *Ethnobotany and Biocultural Diversities in the Balkans*. Springer New York. pp 149-182.
- Rešetnik, I., Baričević, D., Rusu, D. B., Carović-Stanko, K., Chatzopoulou, P., Dajić-Stevanović, Z., ... Jug-Dujaković, M. (2016). Genetic diversity and demographic history of wild and cultivated/naturalised plant populations: evidence from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae). *PloS One*, 11(7), e0159545.
- Ritch-Krc, E. M., Turner, N. J., Towers, G. H. N. (1996). Carrier herbal medicine: an evaluation of the antimicrobial and anticancer activity in some frequently used remedies. *Journal of ethnopharmacology*, 52(3), 151-156.
- Rivers, M. C., Brummitt, N. A., Lughadha, E. N., Meagher, T. R. (2014). Do species conservation assessments capture genetic diversity?. *Global ecology and conservation*, 2, 81-87.
- Robertson, K. R. (1974). The genera of Rosaceae in the southeastern United States. *Journal of the arnold arboretum*, 55(3), 344-401.
- Rohlf, F. (1997). NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.02. Exeter Software, Setauket, New York.
- Rotundo, A., Bounous, G., Benvenuti, S., Vampa, G., Melegari, M., Soragni, F. (1998). Quality and yield of *Ribes* and *Rubus* cultivars grown in Southern Italy hilly locations. *Phytotherapy Research: An international journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives*, 12(S1), S135-S137.
- Rowe, B. (1979). The role of *Escherichia coli* in gastroenteritis. *Clinics in gastroenterology*, 8(3), 625-644.
- Russell, J.R., Fuller, J.D., Macaulay, M., Hatz, B.G., Jahoor, A., Powell, W., Waugh, R. (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and applied genetics*, 95(4), 714-722.

- Ruzin, S.E. (1999). Plant microtechnique and microscopy (Vol. 198). New York: Oxford University Press.
- Ryan, J.J., Coffin, D.E. (1971). Flavonol glucuronides from red raspberry, *Rubus idaeus* (Rosaceae). *Phytochemistry*, 10(7), 1675-1677.
- Safer, S., Tremetsberger, K., Guo, Y.P., Kohl, G., Samuel, M.R., Stuessy, T.F., Stuppner, H. (2011). Phylogenetic relationships in the genus *Leontopodium* (Asteraceae: Gnaphalieae) based on AFLP data. *Botanical journal of the Linnean society*, 165(4), 364-377.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the science of food and agriculture*, 80(7), 1094-1117.
- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., Uylaşer, V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of food science*, 75(4), C328-C335.
- Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321-324.
- Šavikin, K., Zdunić, G., Menković, N., Živković, J., Čujić, N., Tereščenko, M., Bigović, D. (2013). Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district. *Journal of ethnopharmacology*, 146(3), 803-810.
- Schönswetter, P., Tribsch, A. (2005). Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon* 54, 725-732.
- Schulze-Menz, G. K. (1964). Rosales. A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien. II, 193-243.
- Seeram, N.P. (2006). Berries. In *Nutritional Oncology* (Second Edition) (pp. 615-628).
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S., Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(25), 9329-9339.
- Shannon, C.E, Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana: University of Illinois Press

- Shim, S. I., Jørgensen, R.B. (2000). Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. *Theoretical and applied genetics*, 101(1-2), 227-233.
- Siriworn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., Pereira, C. B. (2004). Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8021-8030.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24673-24706.
- Славнић, Ж. (1972). Род *Rubus* L.У: Јосифовић, М., Стјепановић, Л., Јанковић, М. М., Гајић, М., Којић, М., Диклић, (уредници). Флора СР Србије, 4, 16-29.
- Šoštarić, I., Liber, Z., Grdiša, M., Marin, P.D., Stevanović, Z.D., Šatović, Z. (2012). Genetic diversity and relationships among species of the genus *Thymus* L. (section *Serpyllum*). Flora-Morphology, Distribution. *Functional Ecology of Plants*, 207(9), 654-661.
- Sõukand, R., Pieroni, A. (2016). The importance of a border: Medical, veterinary, and wild food ethnobotany of the Hutsuls living on the Romanian and Ukrainian sides of Bukovina. *Journal of ethnopharmacology*, 185, 17-40.
- Sõukand, R., Pieroni, A., Biró, M., Dénes, A., Dogan, Y., Hajdari, A., Kalle, R., Reade, B., Mustafa, B., Nedelcheva, A., Quave, C.L. (2015). An ethnobotanical perspective on traditional fermented plant foods and beverages in Eastern Europe. *Journal of ethnopharmacology*, 170, 284-296.
- de Souza, L.B., Ruas, E.A., Rodrigues, L.A., Ruas, C.F., Ruas, P.M. 2013. AFLP marker analysis revealing genetic structure of the tree *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) in the southern Brazilian Tropical Rainforest. *Genetic and molecular biology*, 36, 533-9.
- Stanković, M.S., Nićiforović, N., Mihailović, V., Topuzović, M., Solujić, S. (2012). Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. *Acta societatis botanicorum Poloniae*, 81(2).

- Stanković, M.S., Petrović, M., Godjevac, D., Stevanović, Z.D. (2015). Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants?. *Journal of arid environments*, 120, 26-32.
- Stanković, M.S., Radić, Z.S., Blanco-Salas, J., Vázquez-Pardo, F. M., Ruiz-Téllez, T. (2017). Screening of selected species from Spanish flora as a source of bioactive substances. *Industrial crops and products*, 95, 493-501.
- Stevanović, V., Stevanović, B. (1985). *Asplenio cuneifolii-Ramondaetum nathaliae*-new chasmophytic community on serpentine rocks in Macedonia. *Bull. Nat. Hist. Mus.*, Belgrade, ser. B, 40, 75-87.
- Stevens, R., Buret, M., Garchery, C., Carretero, Y., Causse, M. (2006). Technique for rapid, small-scale analysis of vitamin C levels in fruit and application to a tomato mutant collection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(17), 6159-6165.
- Sun, J., Kato, I. (2016). Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Genes & Diseases* 3, 130-143.
- Szajdek, A., Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant foods for human nutrition*, 63(4), 147-156.
- Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., Sakata, K. (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 58(10), 1780-1783.
- Takhtajan, A. (1997). Diversity and classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Tamer, C. E. (2012). A Research on raspberry and blackberry marmalades produced from different cultivars. *Journal of food processing and preservation*, 36, 74–80.
- Tanaka, T., Tachibana, H., Nonaka, G., Nishioka, I., Hsu, F.-L., Kohda, H., Tanaka, O. (1993). Tannins and related compounds. CXXII. New dimeric, trimeric and tetrameric ellagitannins, lambertianins A-D, from *Rubus lambertianus* SERINGE. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 41, 1214–1220.
- Tanksley, S.D., McCouch, S.R. (1997). Seed banks and molecular maps: unlooked genetic potential from the wild. *Science*, 277, 1063–1066.

- Temunović, M., Franjić, J., Satovic, Z., Grgurev, M., Frascaria-Lacoste, N., и сар. (2012). Environmental Heterogeneity Explains the Genetic Structure of Continental and Mediterranean Populations of *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Plos One*. 7, e42764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.004276>
- Thompson, M. M., Zhao, C. M. (1993, July). Chromosome numbers of *Rubus* species in Southwest China. In VI International Symposium on *Rubus* and *Ribes*, 352, pp. 493-502.
- Thompson, M. M. (1995). Chromosome numbers of *Rubus* species at the national clonal germplasm repository. *Horticulturae science*, 30(7), 1447-1452.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Cullen, P. J. (2009). Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *LWT-Food science and technology*, 42(3), 700-704.
- Todorović, M., Drobnjaković, M. (2010). Peripheral rural areas in Serbia – the result of unbalanced regional development. *Geographica Timisiensis*, 19(2), 207-219.
- Tomlik-Wyremblewska, A., Van Der Ham, R. W., Kosinski, P. (2004). Pollen morphology of genus *Rubus* L. Part III. Studies on the Malesian species of subgenera *Chamaebatus* L. and *Idaeobatus* L. *Acta societatis botanicorum Poloniae*, 73(3).
- Tosun, M., Ercisli, S., Karlidag, H., Sengul, M. (2009). Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their physicochemical properties. *Journal of food science*, 74(7), C575-C579.
- Ulbricht, C., Catapang, M., Conquer, J., Costa, D., Culwell, S., D'Auria, D., Mintzer, M. (2013). Raspberry Ketone: an evidence-based systematic review by the natural standard research collaboration. *Alternative and complementary therapies*, 19(2), 98-100.
- Vasić, P.S., Dubak, D.V. (2012). Anatomical analysis of red Juniper leaf (*Juniperus oxycedrus*) taken from Kopaonik Mountain, Serbia. *Turkish journal of botany*, 36(5), 473-479.
- Veberić, R., Slatnar, A., Bizjak, J., Stampar, F., Mikulić-Petkovsek, M. (2015). Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT-Food science and technology*, 60(1), 509-517.
- Veda, S., Kamath, A., Platel, K., Begum, K., Srinivasan, K. (2006). Determination of bioaccessibility of β -carotene in vegetables by *in vitro* methods. *Molecular nutrition & Food research*, 50(11), 1047-1052.

- Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M., & Roldán-Ruiz, I. (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular ecology*, 11(1), 139-151.
- Venskutonis, P. R., Dvaranauskaite, A., Labokas, J. (2007). Radical scavenging activity and composition of raspberry (*Rubus idaeus*) leaves from different locations in Lithuania. *Fitoterapia*, 78(2), 162-165.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- Vyas, P., Kalidindi, S., Chibrikova, L., Igamberdiev, A.U., Weber, J.T. (2013). Chemical analysis and effect of blueberry and lingonberry fruits and leaves against glutamate-mediated excitotoxicity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(32), 7769-7776.
- Wang, S. Y., Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 140-146.
- Wang, S.Y., Chen, C.T., Wang, C.Y. (2009). The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food chemistry*, 112(3), 676-684.
- Winkler, M., Tribsch, A., Paun, O., Englisch, T. (2010). Pleistocene distribution range shifts were accompanied by breeding system divergence within *Hornungia alpina* (Brassicaceae) in the Alps. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54, 571–582.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food research international*, 44(1), 217-224.
- Wright, S. I., Bi, I. V., Schroeder, S. G., Yamasaki, M., Doebley, J. F., McMullen, M. D., Gaut, B. S. (2005). The effects of artificial selection on the maize genome. *Science*, 308(5726), 1310-1314.

- Wróblewska, A. (2013). The phylogeographical and population genetic approach to the investigation of the genetic diversity patterns in self-incompatible clonal and polyploid *Linnaea borealis* subsp. *borealis*. *Botanical journal of the Linnean society*, 173(1), 64-76.
- Yu, Y., Fan, Q., Shen, R., Guo, W., Jin, J., Cui, D., Liao, W. (2014). Genetic variability and population structure of *Disanthus cercidifolius* subsp. *longipes* (Hamamelidaceae) based on AFLP analysis. *PloS one*, 9(9), e107769.
- Zarinkamar, F., Tajik, S., Soleimanpour, S. (2011). Effects of altitude on anatomy and concentration of crocin, picrocrocin and safranal in '*Crocus sativus*' L. *Australian journal of crop science*, 5(7), 831.
- Zhivotovsky, L.A. (1999). Estimating population structure in diploids with multilocus DNA markers. *Molecular ecology*, 8, 907-913.
- Zhou, K., Yu, L. (2006). Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *LWT-Food science and technology*, 39(10), 1155-1162.
- Zlatković, B.K., Bogosavljević, S.S., Radivojević, A.R., Pavlović, M.A. (2014). Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison. *Journal of ethnopharmacology*, 151(1), 704-713.
- Zorenc, Z., Veberic, R., Stampar, F., Koron, D., Mikulic-Petkovsek, M. (2017). Thermal stability of primary and secondary metabolites in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) purees. *LWT-Food science and technology*, 76, 79-86.

Коришћени интернети извори:

<https://www.ema.europa.eu/en/committees/committee-herbal-medicinal-products-hmpc>

<http://www.worldclim.org/>

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

<http://www.amapseec.com/Herbal%20sector%20of%20Serbia%20overview.pdf>

<http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/malina>

<https://www.zanimljivedestinacije.info/lepote-srbije/306-park-prirode-golija.html>

ПРИЛОЗИ

Прилог 1. Упитник коришћен у етноботаничким истраживањима.

-
1. Име и презиме.
 2. Пол.
 3. Старост.
 4. Степен образовања.
 5. Главна делатност домаћинства.
 6. Број чланова у домаћинству.
 7. Локални назив за дивљу малину.
 8. Употреба листова дивље малине.
 9. Употреба плодова дивље малине.
 10. Када сакупљају листове и плодове.
 11. За лечење којих болести користе лист и плод дивље малине.
 12. Употреба плодова у исхрани.
 13. Које традиционалне производе праве од плодова малине.
 14. Начин прављења традиционалних производа.
 15. Да ли сакупљају друге шумске производе и које.
-

БИОГРАФИЈА

Бојана П. Вељковић (рођена Радуловић), је рођена 12.10.1986. године у Новом Пазару. Основну школу „Јосиф Панчић“ је завршила у Баљевцу. Средњу медицинску школу, смер педијатријска сестра-техничар је завршила у Краљеву. Школске 2005/2006. године је уписала студије Екологије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, које је завршила 2010. године, одбранивши дипломски рад под насловом „Последице проградације ливадског екосистема у шибљак у Шумарицама на динамику педомезо- и педомакрофауне” са оценом 10 и просечном оценом током студија 8,55. Тиме је стекла звање дипломирани биолог-еколог.

Докторске академске студије биологије је уписала школске 2011/2012. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. Положила је све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 9. Од октобра 2010. године је запослена на Државном универзитету у Новом Пазару – Департману за Биомедицинске науке. Од октобра 2010. године до октобра 2012. године ради као сарадник у настави. Од новембра 2012. године је ангажована као асистент на студијском програму Биологија где реализује вежбе из групе ботаничке предмета.

Antioxidant and Anticancer Properties of Leaf and Fruit Extracts of the Wild Raspberry (*Rubus idaeus* L.)

Bojana VELJKOVIĆ^{1*}, Nataša ĐORĐEVIĆ¹, Zana DOLIĆANIN¹, Braho LIČINA¹, Marina TOPUZOVIĆ², Milan STANKOVIĆ², Nenad ZLATIĆ², Zora DAJIĆ-STEVENOVIĆ³

¹State University of Novi Pazar, Department of Biomedical Sciences, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Serbia; bojana.radulovic@yahoo.com; bradulovic@np.ac.rs (*corresponding author); natasa.djordjevic@gmail.com; zana_dolicanin@yahoo.com; licinabrah@live.com

²University of Kragujevac, Faculty of Sciences, Institute for Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; marina@kg.ac.rs; mstankovic@kg.ac.rs; nzlati@mx.com

³University of Belgrade, Department of Agrobotany, Nemanjina 6, 11080 Zemun-Belgrade, Serbia; dajic@agrif.bg.ac.rs

Abstract

In this study the leaves and fruits of wild raspberry (*Rubus idaeus* L.) populations from the central Balkan region were examined to determine the level of secondary metabolites and related antioxidant activity, as well as biological activity, upon existing ethnobotanical evidence, primarily linked to gastrointestinal disorders. The values obtained for total phenols ranged from 59.68 to 96.83 mg GA g⁻¹ and 24.29 to 38.71 mg GA g⁻¹ in leaf and fruit extracts, respectively. The highest values of tannins and anthocyanins were determined for leaf extracts from a population of east Serbia at a level of 1.27 mg mL⁻¹ and 9.00 mg mL⁻¹. Antioxidant activity was evaluated by measuring the scavenging capacity of the extracts on DPPH. Higher antioxidant activity was detected in the leaf extracts than in the fruit extracts. Leaf and fruit extract were the most effective against *Escherichia coli* (ATCC 8739). Anticancer activity was studied on a human colorectal cancer cell line HCT-116. Leaf extracts exhibited anticancer activity with IC₅₀/24 h 162.38 µg mL⁻¹ and IC₅₀/48 h 95.69 µg mL⁻¹. Wild raspberry leaf and fruit extracts contain numerous secondary metabolites providing marked antioxidant, antimicrobial and anticancer activity.

Keywords: biological activity; methanolic extracts; phytochemical analysis; secondary metabolites

Introduction

Plant secondary metabolites, mainly phenolic compounds, are characterized by strong biological activity. There are four main classes of polyphenols: flavonoids, phenolic acids, lignans, and tannins (Rao and Snyder, 2010), presented in fruits and vegetables, which are linked to particular nutritional and health benefits (Wang and Lin, 2000; Seeram, 2008). These compounds possess a capacity for scavenging of reactive oxygen species (ROS), thus exhibiting an antioxidant activity (Cao *et al.*, 1997; Trivedi *et al.*, 2016). Biological activity of various fruit berries, including raspberries, is attributed to the high content of anthocyanins (e.g. cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-rutinoside, pelargonidin 3-glucoside), flavonols (quercetin, kaempferol), tannins, phenolic acids (e.g. ellagic acid), and lignans (Seeram *et al.*, 2006; Gramza-Michalowska *et al.*, 2017). Composition and concentration of phenolic

compounds in berries and related antioxidant activity and other biological effects, are highly dependent on fruit maturity, agro-environmental conditions and post-harvest technologies (Bobinaite *et al.*, 2012).

The genus *Rubus* is one of the largest in the family Rosaceae with about 700 species, being divided into 12 subgenera of which are only a few species cultivated. *Ideobatus* subgenus includes raspberries, which are widespread in Asia, Europe, Africa and North America. This subgenus is comprised of approximately 200 species (Marulanda *et al.*, 2007). Modern raspberry cultivars are derived from the European red raspberry (*R. idaeus* L.), North American red raspberry (*R. strigosus* Michx.), the black raspberry (*R. occidentalis* L.) and the purple raspberries (*R. neglectus* Peck) that are hybrids between red and black raspberries (Castillo, 2006). Most of commercial varieties are hybrids developed by breeding of the wild raspberries (Çekiç and Özgen, 2010).

Received: 14 May 2018. Received in revised form: 04 Jul 2018. Accepted: 07 Jul 2018. Published online: 17 Jul 2018.

In press - Online First. Article has been peer reviewed, accepted for publication and published online without pagination. It will receive pagination when the issue will be ready for publishing as a complete number (Volume 47, Issue 1, 2019). The article is searchable and citable by Digital Object Identifier (DOI). DOI number will become active after the article will be included in the complete issue.

Phytochemical and Antioxidant Properties of Fresh Fruits and Some Traditional Products of Wild Grown Raspberry (*Rubus idaeus* L.)

Bojana VELJKOVIĆ^{1*}, Violeta JAKOVLJEVIĆ¹, Milan STANKOVIĆ²,
Zora DAJIĆ-STEVENOVIĆ³

¹State University of Novi Pazar, Department of Biomedical Sciences, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Serbia; bojana.radulovic@yahoo.com (*corresponding author); jakovljevicvioleta@gmail.com

²University of Kragujevac, Faculty of Sciences, Institute for Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; mstankovic@kg.ac.rs

³University of Belgrade, Department of Agrobotany, Nemanjina 6, 11080 Zemun-Belgrade, Serbia; dajic@agrif.bg.ac.rs

Abstract

The current study investigated and compared phytochemical and antioxidant activity of fresh fruit and some traditional products of *Rubus idaeus* grown in mountain region of Serbia. The total organic acid, total sugar content, total phenolics, flavonoids, tannins, anthocyanins and vitamin C were evaluated. The antioxidant activities were evaluated using two antioxidant systems 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). The fresh fruit contained highest amount of vitamin C (46.62 mg AA g⁻¹) and total organic acids (882.22 mg CA g⁻¹). The sweet preserve had highest content of total phenolics (200.83 mg GA g⁻¹), flavonoids (12.85 mg RU g⁻¹) and tannins (39.11 mg g⁻¹). The juice had the highest total anthocyanin content (107.22 µg mL⁻¹) and total sugar content (25 °Brix). The best antioxidant activity in ABTS assay had juice (IC₅₀ = 4.87 µmol TE g⁻¹), followed by sweet preserve (IC₅₀ = 5.14 µmol TE g⁻¹), almost identical to standard gallic acid. In the DPPH free radical scavenging assay, sweet fruit preserve showed significant better antioxidant activity (IC₅₀ = 41.27 µg mL⁻¹) compared to juice (IC₅₀ = 106.07 µg mL⁻¹) and fresh fruit (IC₅₀ = 294.79 µg mL⁻¹). Our results indicated promising perspectives for usage of *R. idaeus* fresh fruits and traditional products studied with considerable levels of vitamin C, bioactive compounds and antioxidant activity.

Keywords: antioxidant activity; fruit; juice; phytochemical; sweet preserve

Introduction

The *Rubus idaeus* L. (red raspberry) together with about 750 species of the *Rubus* genus belongs to Rosaceae family (Alice and Campbell, 1999). The wild raspberry is a perennial shrub with a height of between 100 cm and 150 cm. The stem is erect, cylindrical, and greyish, with a number of small thorns on the surface. The leaves are pinnate of 5-7 leaflets or sometimes 3, glabrous on the surface and very hairy on the abaxial side. The terminal leaflet is oblong or ovate and shallowly lobed, whereas stipules are fibrous or hairy. The cyme inflorescences are made of flowers that are usually lying down, composed of narrow white, glabrous and whitish petals. The fruit is pale pink or light orange (Tatić, 1972). In Serbia, the wild

raspberry can usually be found on slopes, fires, spawns and spurs of beech and other forests, near streams and rivers, at an altitude of 600 to 1200 meters. Raspberry plant requires a lot of light and moisture.

The fruits have been used in traditional and alternative medicine for a long time to cure wounds, colic, diarrhea, and renal illnesses (Zhang *et al.*, 2011). In addition, the red raspberry is an economically important berry crop that contains many phenolic compounds with potential health benefits. raspberry can be used in fresh or frozen as well as for processing: juice, syrup, wine, natural liqueur, compote, sweet, jam, ice cream, candied fruit, raspberry powder and pulp (Pritts, 2003). The fruits are sweet and sour, very tasty, aromatic and easily digestible. Raspberry is a "honey plant" which contains 77.4 - 90.9% of water, 9.1 - 22.6% of total dry matter, 8.0 - 13.0% soluble matter. Total sugars have 3.4 - 6.9%, of which glucose is 1.1 - 3.3%, fructose is 1.3 - 3.4%

Received: 22 Dec 2018. Received in revised form: 18 Feb 2019. Accepted: 25 Feb 2019. Published online: 10 Apr 2019.

In press - Online First. Article has been peer reviewed, accepted for publication and published online without pagination. It will receive pagination when the issue will be ready for publishing as a complete number (Volume 47, Issue 3, 2019). The article is searchable and citable by Digital Object Identifier (DOI). DOI number will become active after the article will be included in the complete issue.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, БОЈАНА ВЕЉКОВИЋ, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

ЕТНОБОТАНИЧКА, МОРФОАНАТОМСКА, ФИТОХЕМИЈСКА И
ГЕНЕТИЧКА СТУДИЈА ПОПУЛАЦИЈА ДИВЉЕ МАЛИНЕ
(Rubus idaeus L.) НА ПОДРУЧЈУ СРБИЈЕ

која је одбрањена на ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКОМ ФАКУЛТЕТУ

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У КРАГУЈЕВЦУ, 24.6.2019. године,


БОЈАНА ВЕЉКОВИЋ
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, БОЈАНА ВЕЉКОВИЋ,



дозвољавам



не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**ЕТНОБОТАНИЧКА, МОРФОАНАТОМСКА, ФИТОХЕМИЈСКА И
ГЕНЕТИЧКА СТУДИЈА ПОПУЛАЦИЈА ДИВЉЕ МАЛИНЕ
(*Rubus idaeus* L.) НА ПОДРУЧЈУ СРБИЈЕ**

која је одбрањена на ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКОМ ФАКУЛТЕТУ

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође



дозвољавам



не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у КРАГУЈЕВЦУ, 24.6.2019. године,

БОЈАНА ВЕЉКОВИЋ

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>