

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

**Sanja Kovačić**

**SRODSTVENI ODNOSI I KOROLOGIJA  
IZOFILNIH I HETEROFILNIH ZVONČIĆA  
(*Campanula* L., *Campanulaceae*)  
PRIMORSKIH DINARIDA**

**Doktorska disertacija**

predložena Biološkom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog stupnja  
doktora prirodnih znanosti (biologije)

Obranjena u Zagrebu, 27. siječnja 2006.

Ova disertacija izrađena je pod vodstvom doc. dr. Tonija Nikolića i doc. dr. Zlatka Libera u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog studija pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## SADRŽAJ

Temeljna dokumentacijska kartica .....(VI)			
<i>Basic Documentation Card</i> .....(VII)			
<b>1.</b>	<b>Uvod.....</b>		<b>1</b>
1.1	Red i porodica zvončića .....		1
1.2	Rod zvončića ( <i>Campanula</i> L.).....		3
		<i>Subgeneričke podjele roda Campanula</i> .....	4
1.3	Područje istraživanja i istraživane vrste.....		6
<b>2.</b>	<b>Cilj istraživanja.....</b>		<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>Materijal i metode.....</b>		<b>12</b>
3.1	Materijal.....		12
		<i>Biljni materijal za morfometrijsku analizu</i> .....	13
		<i>Biljni materijal za DNA analizu</i> .....	14
		<i>Uzgoj i pohrana materijala</i> .....	15
3.2	Metode analize materijala.....		16
		<i>Biometrijska istraživanja</i> .....	16
		<i>Molekularna istraživanja</i> .....	17
3.3	Obrada podataka.....		20
		<i>Univarijatna obrada morfometrijskih podataka</i> .....	20
		Ovisnost mjerenih svojstava cvijeta o nezavisnim varijablama staništa..	20
		Deskriptivni statistički pokazatelji.....	20
		Distribucija podataka.....	21
		Univarijatna (Kruskal-Wallis) analiza varijanci .....	22
		<i>Multivarijatna obrada morfometrijskih podataka</i> .....	22
		Diskriminantna analiza.....	22
		Kanonička i korelacijska analiza.....	23
		Analiza glavnih komponenata.....	23
		Metode grupiranja podataka ( <i>Cluster</i> analiza).....	24
		<i>Filogenetička obrada molekularnih podataka</i> .....	24
		Analiza parsimonije.....	24
		Metoda najbližeg susjeda.....	25

<b>4.</b>	<b>Rezultati.....</b>	<b>26</b>
4.1	Usporedbena morfometrijska analiza.....	26
	<i>Univarijatna obrada morfometrijskih podataka.....</i>	26
	Ovisnost mjerenih svojstava cvijeta o nezavisnim varijablama staništa..	26
	Deskriptivna statistička analiza s distribucijom podataka.....	28
	Kruskal-Wallis ANOVA .....	45
	<i>Multivarijatna obrada morfometrijskih podataka.....</i>	45
	Diskriminantna analiza.....	45
	Kanonička i korelacijska analiza.....	46
	Analiza glavnih komponenata.....	50
	Metode grupiranja podataka ( <i>Cluster</i> analiza).....	53
4.2	Analiza materijala za molekularna istraživanja.....	55
	<i>Raznolikost restrikcijskih fragmenata kloroplastne trnT-trnF regije.....</i>	55
	<i>Filogenetička obrada molekularnih podataka.....</i>	57
	Analiza parsimonije.....	57
	Metoda najbližeg susjeda.....	58
<b>5.</b>	<b>Rasprava.....</b>	<b>61</b>
5.1	Usporedna morfometrija cvjetova i moguća srodnost zvončića primorskih Dinarida.....	61
	<i>Jednakolisni zvončići srodstvenog kruga Garganicae.....</i>	63
	<i>Raznolisni zvončići srodstvenog kruga Rotundifolia.....</i>	64
	<i>Prijelazne svojte: «izofiloidni» ili «heterofiloidni» zvončići?.....</i>	66
5.2	Evolucija morfoloških karakteristika cvijeta roda <i>Campanula</i> .....	71
5.3	Filogenetski odnosi jednakolisnih i raznolisnih zvončića primorskih Dinarida.....	73
5.4	Korologija i biogeografija jednakolisnih i raznolisnih zvončića primorskih Dinarida s osvrtom na geološku prošlost zapadnog Balkana i okojadranskog područja.....	77
5.5	Starost i mogući razvitak okojadranske flore s osvrtom na rod <i>Campanula</i> .....	81
<b>6.</b>	<b>Zaključci.....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>86</b>
	<b>Popis priloga u originalnom radu.....</b>	<b>102</b>

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Doktorska disertacija

### **SRODSTVENI ODNOSI I KOROLOGIJA IZOFILNIH I HETEROFILNIH ZVONČICA (*Campanula* L., Campanulaceae) PRIMORSKIH DINARIDA**

Sanja Kovačić

Botanički zavod s Botaničkim vrtom Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu – Botanički vrt, Trg Marka Marulića 9, 10000 Zagreb

Doktorska disertacija iz područja je taksonomije endemičnih razvojnih linija roda *Campanula* (Garganicae, Rotundifolia, Waldsteiniana, Pyramidalis): rješava se taksonomski status pojedinih svojti, njihovi međusobni odnosi i srodnost s ostalim skupinama roda rasprostranjenih priobalnim planinama Jadranskog mora. Primijenjene su metode komparativne morfometrije te molekularna RFLP metoda na geografski, kvalitativno i kvantitativno prikladnom uzorku. Istraživanje je obuhvatilo 15 endemičnih svojti roda *Campanula*, većinom rasprostranjenim primorskim Dinaridima, među kojima dominiraju Učka i Velebit. U središtu interesa su «izofiloidne» vrste zvončica: istarski stenoendem *C. tommasiniana* (isključivo na masivu Učke), velebitski endem *C. waldsteiniana* (velebitski masiv) i ilirsko-balkanski endem *C. pyramidalis*, te njihovi odnosi sa (steno)endemičnim pripadnicima većih i bolje istraženih razvojnih linija Garganicae i Rotundifolia. Rezultati daju nov taksonomski pogled na endemične vrste zvončica istočne obale Jadrana (i šire), te ukazuju na moguću srodnost vrsta i promjene areala prije i nakon posljednjeg ledenog doba.

(102 stranice, 34 slike, 20 tablica, 177 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Botaničkoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb

Ključne riječi: *Campanula* / Dinaridi / Heterophylla / Isophylla / morfometrija / Pyramidalis / RFLP / Waldsteiniana

Mentor: Toni Nikolić, docent (suvoditelj: Zlatko Liber, docent)

Ocjenjivači: dr.sc. Zlatko Liber, dr.sc. Toni Nikolić, dr.sc. Mihaela Britvec

Rad prihvaćen: 11. siječnja 2006.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doctoral Thesis

### **RELATIONSHIPS AND CHOROLOGY OF ISOPHYLLOUS AND HETEROPHYLLOUS BLUEBELLS (*Campanula* L., Campanulaceae) IN ADRIATIC DINARIDS**

Sanja Kovačić

Botanical Div. and Botanical Garden, Department of Biology, Faculty of Science,  
University of Zagreb – Botanical Garden, Trg Marka Marulića 9, 10000 Zagreb

Doctoral thesis deals with relationships and evolution of endemic *Campanula* lineages (Waldsteiniana, Pyramidalis, Rotundifolia and Garganica). Taxonomic status of several taxa is solved, their mutual relations and kinship with other lineages dispersed across the mountains along the Adriatic Sea. Methods of comparative morphometry and RFLP method are used on the geographic, qualitative and quantitative suitable sample: 15 endemic *Campanula* taxa, mostly inhabiting Učka and Velebit Mountains. In focus are «isophylloid» species and endemics *Campanula tommasiniana*, *C. waldsteiniana* and *C. pyramidalis*, and their relations with (steno)endemic taxa of larger and better known lineages Garganicae and Rotundifolia. Results are giving a new perspective of the *Campanula* genus origin and evolution in the eastern Adriatic coastal mountains (and broader), depicting the possible relations among lineages and distribution changes through the history.

(102 pages, 34 figures, 20 tables, 177 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Botanical library, Department of Biology, Faculty of Science,  
University of Zagreb – Trg Marka Marulića 20/II, HR-10000 Zagreb, CROATIA

Keywords: *Campanula* / Dinarids / Heterophylla / Isophylla / morphometrics /  
Pyramidalis / RFLP / Waldsteiniana

Supervisor: Toni Nikolić, assistant professor  
(Co-supervisor: Zlatko Liber, assistant professor)

Reviewers: dr.sc. Zlatko Liber, dr.sc. Toni Nikolić, dr.sc. Mihaela Britvec

Thesis accepted: January 11th, 2006

# 1. UVOD

## 1.1 Red i porodica zvončića

Red i porodica zvončića još se uvijek klasifikacijski shvaćaju u ponešto različitom opsegu, ovisno o gledištima pojedinih autora (Dahlgren 1980, Cronquist 1988, Taktadžan 1991, Thorne 1992). Prema rezultatima najnovijih, mahom molekularnih istraživanja, zvončići pripadaju redu Asterales (podred Euasteridae II, prema *Angiosperm Phylogeny Group* (APG) 1998, 2002) s trikolpatnim polenom, no većina stručnjaka za porodicu (npr. Lammers 1992 i osobni kontakt, Eddie i sur. 2003 i osobni kontakt) i dalje smatra da red zvončića (Campanulales) zaslužuje izdvojen status. U najnovije doba uz klasične taksonomske metode koje se zasnivaju na morfologiji i anatomiji, te palinologiji, embriologiji, citologiji, ultrastrukturi i kemizmu, molekularna istraživanja (npr. usporedba kloroplastnih *rbcL*-sekvenci) daju sasvim nove poglede na vjerojatnost srodstava između biljnih porodica unutar redova - neki od njih su i prilično kontroverzni. Primjerice, prema Lammersu (1992), redu Campanulales pripada ukupno 12 porodica, među ostalima i Asteraceae, te manje porodice razdvojene iz (nat)porodice *Campanulaceae s.l.* (*Cyphiaceae*, *Campanulaceae s.s.* i *Lobeliaceae*). Molekularna filogenija ukazuje i na to da se 12 porodica reda Campanulales dijeli na dvije temeljne razvojne grane («asteridnu» i «kampanuloidnu»; Lammers 1992, Spichiger i Savolainen 1997). Starost čitave skupine zvončića može se samo pretpostavljati temeljem vrlo oskudnih fosilnih i polenskih ostataka njihovih najbližih srodnika<sup>1</sup>. Nema izravnih fosilnih dokaza je li se ijedna skupina biljaka reda Campanulales pojavila na Zemlji prije perioda oligocena (prije oko 41 milijun godina – preuzeto iz Park i sur. u priprav.), a najprihvaćenije teorije pretpostavljaju da su se pra-zvončići počeli razvijati u ranom tercijaru, za raspadanja Gondvane (Eddie 1998), kad su se i Lobelioideae (-aceae) odvojile od *Campanuloideae* (-aceae s.s.). Usprkos velikoj brojnosti i raznolikosti (više od 1200 rodova i nešto manje od 22.000 vrsta), red Campanulales je ipak u usporedbi s drugim redovima kritosjemenjača relativno homogena skupina biljaka. Porodica zvončića (*Campanulaceae s.l.*) rasprostranjena je čitavim planetom, s 90 rodova i više od 2000 vrsta (Eddie 1998, Watson i Dallwitz 2000, Judd i sur. 2002). No, po mišljenju vodećih stručnjaka za porodicu (Lammers 1992, Eddie i sur. 2003), porodicu *Campanulaceae* ipak treba shvaćati u puno užem smislu, s ne više od 46 rodova i do 950 vrsta.

<sup>1</sup> Unutar čitavog reda Campanulales do danas su pronađeni fosilni ostaci tek jednog predstavnika porodice Asteraceae (Kamerun) i jednog Goodeniaceae (u baltičkom jantaru) i to oba iz razdoblja tercijara (Mildenhall 1980, Benton 1993).

Najnovija molekularna istraživanja potvrđuju da je porodica i u najširem smislu po svemu sudeći monofiletskog postanka (Eddie 1998, Eddie i sur. 2003), no danas ne postoji živući rod, niti njegovi fosilni tragovi, koji bi se mogao smatrati pretkom ostalima. Većina se stručnjaka slaže da je postanak (nat)porodice zvončića vezan uz već formirane kontinente: njihova najnovija istraživanja (Hong 1995, Oestreich i sur. 2000, Cosner i sur. 1994, Eddie i sur. 2003) nagoviještaju da bi pradomovina (nat)porodice mogla biti negdje na prostoru današnje istočne Azije.

Tradicionalno široko shvaćanje porodice *Campanulaceae* (de Candolle 1830, Schönland u Engler i Prantl 1889, Taktadžan 1991) rezultiralo je divovskom heterogenom organizacijom koja je na razini nižoj od porodice bez sumnje polifiletička. Prve i najjednostavnije podjele porodice (De Candolle 1830, Boissier 1875) temeljile su se na načinu otvaranja tobolca (vršno ili bazalno, zaklopcima ili porama), na morfologiji čaške (ne/postojanje dvostrukih zubaca čaške), a kasnije i na tipu otvora (apertura) polenskih zrnaca (poratni, kolporatni ili kolpatno-kolporatni tip) rodova porodice zvončića. Dugo se smatralo (Fedorov 1957, Gadella 1964) kako te najstarije podjele nisu «prirodne», no danas se čini da i najmodernije molekularne metode potvrđuju veliku sistematsku vrijednost upravo tih karakteristika, ostavljajući morfologiju cvijeta i polenskih zrnaca, građu cvata, karakteristike i mehanizme otvaranja plodova, uz broj kromosoma i geografsku rasprostranjenost svojti, najvažnijima u razgraničavanju rodova i vrsta. Mnogobrojni su autori tijekom stoljeća na različite načine pokušavali urediti porodicu *Campanulaceae s.l.* ne bi li doprinjeli boljem razumijevanju te skupine (od de Candolle 1830, Bentham u Bentham i Hooker 1876, Schönland u Engler i Prantl 1889; do Dunbar 1975 i 1984, Dunbar i Wallentinus 1976, Šuljkina 1978 i 1979, Avetisjan 1986, Kolakovski 1980, 1986, 1987, 1994, Šuljkina i sur. 2003). Iako je do danas objavljeno tek nekoliko molekularnih filogenetskih studija temeljenih na pojedinim pripadnicima porodice *Campanulaceae* (Cosner i sur. 1994, 2004, Eddie i sur. 2003) glavni unutarporodični odnosi nisu se promijenili. Dosadašnji rezultati tih istraživanja ponovo upućuju na postojanje osnovne dihotomije porodice, koje Eddie (2003) naziva svezama («alliance»): kolpatno-kolporatnoj svezi pripadaju tzv. «platikodonoidi», a poratnoj «valenbergioidi» i «kampanuloidi». Ipak, veze između pojedinačnih razvojnih linija visoko srodnih rodova unutar porodice *Campanulaceae* još su uvijek neobjašnjene.

## 1.2 Rod zvončica (*Campanula* L.)

Ime *Campanula* Linne je (1737. u *Philosophia Botanica*, str. 142) preuzeo od Tourneforta), od lat. *campana* = zvono i *-ula* = deminutiv (hrv. zvončić, zvončika, zvonček; ne «zvonce» = *Edraianthus*). Vrste toga roda najčešće su (polu)uspravne, rozetaste ili jastučaste trajnice, rjeđe dvogodišnje ili jednogodišnje zeljaste biljke. Listovi su nasuprotni, sjedeći ili s peteljkom, cjeloviti ili nazubljeni, ponekad razdijeljeni. Cvatovi su grozdasti ili metličasti, ponekad klasasti, a rjeđe glavičasti ili su pak cvjetovi pojedinačni. Vjenčić je peterozrakast, redovito sastavljen od pet djelomično sraslih latica s pet slobodnih režnjeva, okruglast, zvončast ili ljevkast i gotovo isključivo modre boje, no sve vrste mogu imati i bijelocvjetne, a rjeđe i ružičaste forme (npr. *C. walsteiniana* f. *alba* i *C. tommasiniana* f. *rosea* – Prilog 3, sl. 4 i 5), vrlo cijenjene u hortikulturi (Lewis i Lynch 1998, Eddie 2000). Rod *Campanula* je redovito protandričan, alogaman ili djelomice autogaman, s prašničkim nitima široko trokutaste baze. Polenova zrnca uvijek su binuklearna, poratna, najčešće okrugla ili malo izdužena. Samooprašivanje se kod *Campanula* vrlo rijetko pojavljuje: entomofilija je pravilo s vrlo malo izuzetaka (Bielawska 1973). Plodnica je podrasla, najčešće s tri (rjeđe pet) lokula, koliko je i režnjeva stigme. Placentacija je aksilarna. Plod je jajast ili zavojit tobolac, često s jasno naglašenim «ljestvicama» (lignificirane žile), a otvara se s tri postrane pore ili zaliska (rjeđe pet pora ili tobolac nepravilno puca). Sjemenke su najčešće sjajne, eliptične, vanjskom teksturom vrlo raznolike (Prilog 4) i rasprostranjuju se vjetrom.

Stručnjaci se danas ne slažu ni oko broja vrsta i nižih sistematskih jedinica uključenih u opseg roda *Campanula*: raspravlja se s 350 do 450 vrsta zvončica te barem još toliko podvrsta i nižih svojti (Contandriopoulos 1984, Ančev 1994, Watson i Dallwitz 2000). Nove se svojte još uvijek opisuju (npr. Brullo 1993, Lucchese 1993, Hartvig 1998, Kovanda 1999), a temeljem istraživanja neke i mijenjaju status (Lakušić i Conti 2004). Zvončići su školski primjer orografski, edafski i mikroklimatski visoko specijaliziranih biljaka, karakteriziranih zapanjujućom raznovrsnošću. Najuže shvaćeni, zvončići naseljavaju različita staništa (stepska, šumska, pustinjska, stjenovita, pješćana) toplog i suptropskog područja Sjeverne polutke, ali je varijabilnost bez sumnje najveća na višim nadmorskim visinama, tj. u planinskim područjima. Najvažnija središta naknadnog razvitka zvončica svakako su u planinama Kavkaza, Balkanskog poluotoka i Anatolije (Kolakovski 1987), gdje se nalazi i najveći

broj endemičnih vrsta, kao i malih rodova (*Edraianthus*, *Symphyandra* i *Adenophora* te *Phyteuma* i *Jasione*) bliskih rodu *Campanula*. Formiranjem Dinarida i Jadranskog mora u današnjem obliku prekida se kontinuiranost populacija pra-zvončića jugoistočne Europe na dva velika poluotoka, Apeninskom i Balkanskom, gdje se tijekom mnogih tisuća godina razvijaju novi i jedinstveni oblici. U Europi danas raste oko 200 vrsta roda *Campanula* (Fedorov i Kovanda 1976), a na Sredozemlju oko 250 (Geslot 1984): najvećim brojem vrsta prednjači Turska (više od 150), a slijede Egejski otoci, planine Balkanskog poluotoka<sup>2</sup> i Pirineji.

### **Subgeneričke podjele roda *Campanula***

U preglednom članku Kovačić (2004) prikupila sam najznačajniju literaturu o istraživanjima roda *Campanula* na području jugoistočne Europe, gdje su prikazani i najznačajniji pogledi na subgenerička razgraničenja vrsta toga područja. Kako još od de Candollea (1830) nema monografije porodice niti roda<sup>3</sup>, sve današnje klasifikacije zvončića temeljene su na ograničenom (lokalnom) uzorku i stajalištima pojedinih autora, a objavljuju se u lokalnim Florama i preglednim člancima. Podjele roda na sekcije - kao što su one najpoznatije Fedorova (1957), Gabelle (1964) ili Damboldta (1978) - uglavnom se smatraju umjetnima, dok su podjele na subsekcije, serije, komplekse ili agregate (npr. Damboldt 1965ab, Kovanda 1970b, 1977; Geslot 1984) većinom bliže evolucijskom slijedu razvoja svojti. Ovdje ću spomenuti nekoliko najpoznatijih subgeneričkih podjela roda *Campanula*, koje (barem djelomično) obuhvaćaju i vrste rasprostranjene na prostoru Dinarida.

Prva podjela roda *Campanula* potječe od de Candollea (1830), koji ga je podijelio u dvije sekcije obzirom na to imaju li (sect. *Medium* A.DC.) ili nemaju (sect. *Eucodon* A.DC., kasnije sect. *Campanula* s.s.) nastavke između zubaca čaške. Mada je to i danas važno svojstvo u svim determinacijskim ključevima, u de Candolleovo doba još

---

<sup>2</sup> Još Turrill (1929) primjećuje da je rod *Campanula* po veličini peti na Balkanu: iza *Centaurea*, *Silene*, *Dianthus* i *Trifolium*.

<sup>3</sup> Hortikulturne monografije, kao što su one često citiranog Crooka (1951) ili Lewisa i Lynch (1998), ne pretendiraju ničemu iznad pregleda zanimljivih vrsta i mogućnosti njihova uzgoja. Opsežna, no lokalno ograničena istraživanja kao što su ona Kovande (1970ab, 1977), Shetlera (1982) ili Berninija i sur. (2002) od velike su vrijednosti, no također ne daju cjelovit pristup rodu. Prema osobnim kontaktima, u pripremi je nova monografija porodice koju priprema T. Lammers, te revizija roda W.M.M. Eddieja.

nije bilo poznato da postoje vrste kod kojih građa zubaca čaške nije stalno svojstvo i da nije izravno povezano s drugim važnim morfološkim karakteristikama, kao što je način otvaranja tobolca (Eddie i sur. 2003). Boissier (1875) je po otkriću mnogobrojnih novih vrsta veću taksonomsku važnost dao načinu otvaranja tobolca (porama ili zaklopcima, bazalno, postrano ili vršno), te je također opisao dvije temeljne sekcije: *Rapunculus* Boiss. i *Medium* (A. DC.) Boiss. (kasnije sekcija *Campanula*). Većina sustava - kojih je tijekom stoljeća bilo mnogo, uključujući i Schönlandov (1889) - slijedila je tu Boissierovu temeljnu podjelu, a iako se u međuvremenu više puta na različite načine mijenjao položaj rodova i vrsta, većina se lokalnih Flora (tako i Flora Europea) i do danas drži Boissierovog načela. Tako je Fedorov u Flori SSSR-a (1957) prihvatio osnovne Boissierove sekcije, koje dalje dijeli u mnogobrojne podsekcije i serije, što nastavljaju i kasniji autori, npr. Damboldt (1978) u Flori Turske. U Florama se također još slijede i pogledi Nymana (1878-1882), koji je podijelio rod *Campanula* u tri skupine: *Media* (=subsekcija *Quinqueloculares* Boiss.), *Campanulastra* (=subsect. *Triloculares* Boiss.) i *Rapunculi* (=subsect. *Rapunculus* Boiss.)<sup>4</sup>.

Na području citologije prvi je Sugiura (1942), usprkos brojnim pogrešnim brojenjima proizašlim prvenstveno iz pogrešnih determinacija vrsta, uvidio važnost broja kromosoma u opisivanju srodnih grupa. Diploidija, česta reliktnost, recentna intra- i interspecijska hibridizacija za kojom slijedi formiranje poliploidnih kariotipova (sve do četiri stupnja ploidije) glavni su evolucijski trendovi kod *Campanula* (Ančev 1994), na koje je ukazao još Gadella (1964), koji utvrđuje da su de Candolleove sekcije citološki ujednačenije od Boissierovih, te daje svoje viđenje najvažnijih karakteristika za taksonomiju roda, uočivši da vrste unutar svake od njegovih serija obično pokazuju veliku morfološku sličnost<sup>5</sup>. Gadella (1964) je reklasificirao rod temeljem morfoloških, citoloških i genetičkih podataka, istražujući ogromnu varijabilnost vrsta citološkim metodama i pokusima uzgoja provedenim u jednakim uvjetima. Contandriopoulos (1984) je temeljem Gadellinih rezultata zaključila kako je u izučavanju filogenije *Campanula* neophodno uzeti u obzir sve: citologiju, morfologiju, životni ciklus i geografsku distribuciju, što podržava i Eddie (u Eddie i Ingrouille 1999, Eddie i sur. 2003).

---

<sup>4</sup> I najmodernija molekularna istraživanja (Eddie i sur. 2003) uvelike potvrđuju te prve i najjednostavnije klasifikacije roda.

<sup>5</sup> Neke vrste s vršnim i bazalnim otvaranjem tobolca mogu se križati, kao i neke s nastavcima između zubica čaške s onima bez. I neke vrste koje, po Fedorovu, pripadaju različitim serijama, također se mogu križati, dok (uz iznimke vrsta s  $n = 15$  i  $n = 17$ -serija) u načelu nije moguće križati vrste koje pripadaju različitim serijama.

Rapunkuloidna skupina zvončića (sekc. *Rapunculus s.l.*) općenito se smatra primitivnijom zbog svojih morfoloških karakteristika, šire rasprostranjenosti i puno veće raznovrsnosti, od brojnijih i odvedenijih svojiti sekcije *Campanula*. Prvi "pravi" zvončići sekcije *Campanula*, s dvostrukim nastavcima čaške i bazalnim otvaranjem tobolca (kojima pripadaju i linije jednakolisnih i raznolisnih zvončića), vjerojatno su se pojavili krajem tercijara (Park i sur. u priprav.). U Europi, evolucija sekcije *Campanula* dodatno je pospješena u kvartaru alpskom orogenezom i ledenim dobima, kad se formiraju nove barijere, razdvajajući nekad kontinuirana područja rasprostranjenosti ranih vrsta (Blondel i Aronson 1999, Johnson 2002, Willis i McElwain 2002) i omogućujući razvitak novih svojiti. No, kako je današnja klasifikacija načinjena mahom prema morfološkim i citološkim kriterijima, usporedna istraživanja koja uključuju i rezultate raznovrsnih molekularnih metoda tek nagoviještaju promjene u shvaćanju veza među južnoeuropskim zvončićima (Frizzi i Tammara 1991, Eddie i sur. 2003, Kovačić i sur. 2003, Park i sur. u priprav.). Ovdje treba spomenuti da će te promjene, jednom kad istraživanja budu dovršena, biti i dalekosežnija: i na drugim kontinentima, naime, rastu pojedine izolirane i vjerojatno vrslo stare vrste roda *Campanula* izoliranih areala, naoko veoma nalik «izofiloidnoj» skupini zvončića jugoistočne Europe, kao što su *C. acutiloba* («azijska «*C. garganica*» iz Irana, kako je zove Crook 1951) ili *C. piperi* (država Washington, SAD – Prilog 3, sl. 9 (ljubaznošću dr. Tone Wrabera)).

### 1.3 Područje istraživanja i istraživane vrste

Već prvi istraživači jugoistočne Europe (npr. Waldstein-Wartemberg i Kitaibel 1799-1812, Neilreich 1868, 1869; Schlosser i Vukotinović 1869, Nyman 1878-1882, Tanfani 1888, Visiani 1847; Welden 1830, Borbàs 1883, Beck-Managetta 1901, Adamović 1909, 1911, 1929; Hegi 1915-1916, Javorka 1924-1925, Fiori 1927, Turrill 1929, Hayek 1931) zamjećuju visoku endemičnost zapadnobalkanske flore i vegetacije. I većina modernih autora (npr. Aronson i Blondel 1999, Hofrichter 2002, Greuter 2003, Heywood 2003, Stevanović i sur. 2003) prepoznaje jedinstvenost zapadnobalkanskog i okojadranskog područja, koje čini sjeverni dio istočnosredozemne biogeografske regije (Quezel 1985). Balkanski i Apeninski poluotok visoko su srodni u sastavu flore i vegetacije (Pignatti 1982, Junikka i Uotila

2002), pa i u vrstama roda *Campanula* (Damboldt 1965a, Frizzi i sur. 1987, Bernini i sur. 2002), noseći velik udio raznovrsnosti i endemičnosti roda u popisu flora Europe i Sredozemlja (Fedorov i Kovanda 1976, Geslot 1984).

Uže područje ovoga istraživanja obuhvaća istočnojadransko, planinsko područje Dinarida (tzv. primorski, vanjski ili obalni Dinaridi). Planinski sustav Dinarida smatra se jugoistočnim dijelom istočnih Alpa, preko Julijskih Alpa vezanim sa središnjim masivom. Dinarske planine su duge oko 650 km, a pružaju se usporedno s jadranskom obalom u smjeru sjeverozapad-jugoistok, od Trsta i južne Slovenije do Albanije. Omeđene su morem (zapad) i rijekama: Sočom i Savom (sjever), Drinom (jug), Kolubarom, Ibrom i Sitnicom (istok). Vanjski ili primorski Dinaridi pružaju se od furlanske nizine (sjeverna Italija) do Skadarskog jezera i depresije (granica Bivše jugoslavenske republike Makedonije te Albanije), a počivaju na jadransko-dinaridskoj karbonatnoj platformi. U tom su dijelu i dva najbolje izražena genetička središta diferencijacije endemičnih vrsta u Hrvatskoj: Velebit i Biokovo (Trinajstić 1992). Priobalni dio primorskih Dinarida pruža se duž hrvatske dalmatinske obale, grubo omeđen lancem priobalnih planina republika bivše Jugoslavije: od slovenskog Snežnika, preko hrvatskih planina Ćićarije i Učke, Gorskoga kotara, Velike kapele, Velebita, Dinare, Mosora, Biokova, do konavoskih planina, zatim hercegovačkih planina Čvrsnice, Veleža i Bjelašnice, završavajući Orjenom, Lovćenom i Rumijom u Crnoj Gori. Ta je regija zapadnog Balkana iznimno bogata raznovrsnim biljnim svojstama, gdje su najznačajniji istraživači lokalnih flora 20. stoljeća opisali i brojne vrste roda *Campanula* (Adamović 1909, Hayek 1931, Rohlena 1941-1942, Beck-Managetta i sur. 1950-1983, Horvat i sur. 1974, Mayer 1952, Pulević 2005). Značajan broj vrsta koje nastanjuju opisani prostor istočne obale Jadrana i primorskih Dinarida je endemičan, reliktna, polimorfna, visoko varijabilan i jedinstven u evolucijskim trendovima i odvijajućim procesima diferencijacije: upravo ovdje je rasprostranjen i najveći dio najzanimljivijih zvončića Balkana.

Okojadranski zvončići dijele morfološke karakteristike i slične vegetacijske okolnosti krških područja mediteransko-montane regije: većinom su heliofitski hazmofiti pukotina planinskih stijena, točila i kamenjarskih travnjaka. Citoloska istraživanja okojadranskih svojiti zvončića ukazala su i na visoku srodnost u broju i obliku kromosoma (Sugiura 1942, Gutermann 1961, Merxmüller i Damboldt 1962, Böcher 1960, 1963; Gadella 1964, Podlech i Damboldt 1964, Damboldt 1965ab, 1968; Lovašen-Eberhardt 1971, Geslot 1980, Nurmi 1987, Phitos i Kamari 1988), pokazujući

da su zvončići tog prostora primarno diploidi ( $2n=34$ ), vrlo često endemi i/ili relikti stješnjeni na malene prostore, a posve iznimno vrste široke rasprostranjenosti (*C. trachelium*) ili «invazivci» (*C. rapunculoides*). Prema posljednjim podacima (Kovačić 2004), flora okojadranskog prostora, uključujući šire zapadnobalkansko područje, broji barem 65 vrsta i 19 podvrsta roda *Campanula*, što svakako nije konačno: mnoge “male vrste” uključene su u kompleksnije, neke opet u opseg drugih rodova, a ni istraživači lokalnih flora ne koriste jednake kriterije ni literaturu pri određivanju vrsta, te se tako navedene brojke ne trebaju smatrati konačnima, već tek okvirnima. Visok postotak endemičnosti zapadnobalkanskog i okojadranskog područja obuhvaća 63 svojte zvončića (75%, Kovačić 2004) urođene ovoj regiji, od kojih su mnogi steno- ili subendemi.

Ozbiljni problemi u razgraničavanju svojti unutar roda *Campanula* doveli su u drugoj polovici 20. stoljeća do istraživanja taksonomskih problema manjih, srodnijih i geografski bliskijih skupina zvončića (npr. Carlström 1986, Kovanda i Ančev 1989, Runemark i Phitos 1996, Eddie i Ingrouille 1999, Oganessian 2001, Saez i Aldasoro 2003). Sustavna usporedna istraživanja zapadnobalkanskih i istočnojadranskih zvončića s istočnobalkanskima, srednjoeuropskima i apeninskima nisu provedena, a potencijalno su vrlo zanimljiva i mogu dati mnoge odgovore danas nepoznate taksonomske i fitogeografske srodnosti vrsta.

Skupina endemičnih zvončića primorskih Dinarida koja se klasično smatra dijelom izofilnih («jednakolisnih») zvončića (**Isophylla** *sensu* Damboldt 1965a) su pripadnici skupine **Garganicae** (*garganica-clade sensu* Park i sur. u priprav.). Vrste toga srodstvenog kruga (Prilog 1), koje su u užem interesu ove disertacije, karakterizirane su jednakom građom relativno velikih listova (bazalni bubrežasti do srcasti, nazubljeni, na dugačkim peteljka; stablični srcasti do jajasti, s jasnim peteljka), čaškama bez nastavaka među zupcima, uspravnim tobolcima s bazalnim porama (rjeđe nepravilno pucaju), te okruglastim do jajastim sjemenkama s jasno hrptastom sjemenom lupinom (Damboldt 1965a, Park i sur. u priprav.; Prilog 1, Sl. 1). Sve su vrste izofilnih zvončića (osim hrvatskih *C. fenestrellata* ssp. *fenestrellata* i ssp. *istriaca* - Prilog 1, sl. 2 i 5) jasno disjunktne distribucije u okojadranskom prostoru, alopatričke i zatvorene u male, često kompaktne areale). Prema Damboldtu (1965a), skupina *Isophylla* dijeli se u pretežito prekojadransku podskupinu “garganica” (*C. fenestrellata* s.l., *C. garganica* s.l., *C. elatines*, *C. elatinoides*, *C. portenschlagiana*, *C. poscharskyana* - Prilog 1, sl. 1-6) i tirensku podskupinu “fragilis” (*C. fragilis* s.l., *C.*

*isophylla* - Prilog 1, sl. 7). Ta je podjela bila poduprta postojanjem dva osnovna broja kromosoma:  $2n=34$  ("garganica") i  $2n=32$  ("fragilis"), bez zabilježene poliploidije. Trinajstić (u Lovašen-Eberhardt i Trinajstić 1978) prepoznaje te podskupine kao serije *Garganicae* i *Fragiles*, a dodatno, temeljem dlakavosti listova i veličine polenskih zrnaca izdvaja vrste *C. elatines* i *C. elatinoides* u zasebnu seriju *Elatines*, ostavljajući seriju *Garganicae* strogo okojadranske distribucije.

Damboldt (1965a) je također smatrao i da su njegove *Isophyllae* paralelna razvojna linija s heterofilnim («raznolisnim») zvončićima subsekcije **Heterophylla** (Witasek) Fedorov (Prilog 2). Ta je velika skupina rasprostranjena gotovo čitavom umjerenom zonom Sjeverne polutke (s nekoliko svojti u arktičkom pojasu), a na dinarskom je prostoru okupljena oko okruglolisnog zvončića (*C. rotundifolia* s.l., kompleks ili agregat **Rotundifolia** s. Geslot 1984) s više od 50 «malih» svojti. Te su svojte temeljno karakterizirane dvovrsnom građom listova (bazalni na dugačkim peteljkama, bubrežasti, srcasti, ili rombični, nazubljeni, pilasti ili jednostavni – Prilog 2, sl. 8; stabljični listovi najčešće sjedeći (vrlo rijetko na peteljkama), lancestasti, linealni do gotovo nitasti, sa zupcima ili bez njih), čaškama bez nastavaka, uspravnim ili visećim tobolcima s bazalnim porama, te okruglastim do jajastim i najčešće glatkim sjemenkama (Kovanda 1970ab, 1977; Geslot 1984). Vrste skupine *Rotundifolia* Kovanda (1970a) je podijelio u serije, no gotovo je posve sigurno da su te podjele najvećim dijelom umjetne. Sve svojte agregata *Rotundifolia* imaju  $n=17$  (česta poliploidija!), većina ih se smatra vrlo mladima, a često se i preklapaju staništima (simpatrija). Na prostoru dinarskih planina postoji više endemičnih i dobro izoliranih svojti okruglolisnih zvončića, vrlo malenih (*Campanula justiniana*, *C. carnica*, te *C. cespitosa* i *C. hercegovina* – Prilog 2, sl. 1 i 5) ili tek nešto većih areala (*C. marchesettii*, *C. witasekiana* – Prilog 2, sl. 3 i 6), kao i neke heterofilne vrste koje vjerojatno (Geslot 1984) ne pripadaju srodstvenom krugu *C. rotundifolia* u smislu Kovande (npr. *C. pulla*, *C. zoysii* te *C. cochleariifolia* – Prilog 2, sl. 4).

**Agregat Waldsteiniana** (*sensu* Geslot 1984; Prilog 3, sl. 4 i 5), kojem je dosad posvećen samo jedan temeljitiji rad (Damboldt 1965b) i nekoliko preliminarnih izvješća (Kovačić i Nikolić 2004, Kovačić i Surina 2005, Liber i sur. 2005), Damboldt je izdvojio iz grupe *Isophylla* (1965ab) primijetivši da se razlikuje od izofilnih vrsta, te donekle slični i heterofilnima. Ta se mala skupina sastoji od samo dva visokosrodna, geografski jasno odijeljena i morfološki vrlo različita prava vikarijanta (skizoendemi u smislu Favarger i Contandriopoulos 1961): *Campanula waldsteiniana* i *C. tommasiniana*.

Prva pripada ilirskom flornom elementu heliofilne vegetacije planinskih stijena, točila i livada, koje Horvatić naziva ilirsko-balkanskim endemičnim biljkama (prema Trinajstiću 1992). Raste pretežno u pukotinama vapnenačkih stijena na Velebitu, Velikoj Kapeli i Goljoj Plješivici, s nekoliko lokaliteta u Bosni i Hercegovini (Ilica, Osječnica, Ljubična–Vjetrenica) te u Sloveniji (Snežnik), na visinama između 700 i 1650 m. *Campanula tommasiniana* nastanjuje pak samo masiv Učke u Istri i stoga se može smatrati istarskim stenoendemom u punom smislu. Vrsta je to pukotina stijena otvorenih staništa, ali i pretplaninskih bukovih šuma mediteransko-montanog pojasa na visinama do 1400 m, koja se jasno razlikuje od drugih vrsta roda jedinstvenom cjevastom građom čaške. Opće morfološke karakteristike dviju vrsta agregata *Waldsteiniana* veoma su slične prije cvatnje (bazalni listovi u rozetama sitni i okruglasti, listovi stabljike lancetasti i nazubljeni, uspravan rast u busenovima isključivo iz pukotina stijena), a donekle se mogu povezati i s okruglolisnom vrstom *C. hercegovina*. No, iznimno je zanimljivo da se Waldsteinov i Tommasinijev zvončić uvelike razlikuju građom vjenčića, što je gotovo jedinstveno među zvončićima uopće (Damboldt 1965b).

Još je nekoliko vrsta zvončića tijekom desetljeća dovedeno u kontekst s opisanom jezgrom dinarskih endemičnih razvojnih linija (usp. Wohlfahrt u Koch 1902, Fiori 1927, Hayek 1931, Crook 1951, Pignatti 1982, Kolakovski 1992ab), u prvom redu vrste agregata *Pyramidalis* (Geslot 1984) uglavnom okojadranske distribucije (*C. pyramidalis*, *C. versicolor* i *C. secundiflora* - Prilog 3, sl. 1, 2 i 3-ljubaznošću mr. Bojana Zlatkovića). Izolirane vrste kao što su *C. sartorii* (endem egejskog otočića Androsa), *C. morettiana* (Dolomiti; Prilog 3, sl. 8), *C. raineri* (istočna Insubria; Prilog 3, sl. 7) i *C. arvatica* s.l. (incl. *C. adsurgens*, sjeverozapadna Španjolska), od kojih se posljednje dvije još svrstavaju u klasičnu Sekciju *Rapunculus* (usp. Fedorov i Kovanda 1976), morfološki donekle nalikuju «izofiloidima». Prastara vrsta (paleoendem) karpatskog masiva *C. carpatica* (Prilog 3, sl. 6), te endem istočnih Alpa *C. zoysii*, također «rapunkuloidi» kojima se tobolac otvara pri vrhu i čaška nema nastavaka, vjerojatno su bliski srodstvenim krugovima izofilnih i heterofilnih zvončića. No, sve te morfološki i ekološki «slične» vrste treba uključiti i u molekularna istraživanja, kako bi se dobila jasnija slika njihove međusobne srodnosti.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Kako je razvrstavanje u vrste i niže sistematske jedinice unutar roda *Campanula* još uvijek jako problematično, smatra se ispravnim za uzorak izabrati manje prirodne skupine slične rasprostranjenosti i podvrći ih multidisciplinarnoj reviziji (Eddie i sur. 2003, Gutermann usmeni kontakt). U središtu ove disertacije tako se našlo nekoliko, većinom endemičnih (Fedorov i Kovanda 1976, Geslot 1984), razvojnih linija i vrsta zvončića primorskih Dinarida, koji su neriješenim i nejasnim srodstvom vezani i s apeninskim i balkanskim, ali i srednjoeuropskim vrstama. Temeljni zadatak istraživanja jest razjasniti srodstvene i taksonomske odnose te moguću filogeniju 15-tak vrsta izofilnih («jednakolisnih»), heterofilnih («raznolisnih») i «izofiloidnih» («prijelaznih») svojti zvončića s prostora primorskih Dinarida, temeljem dviju metoda: usporedbenom morfometrijom cvjetova i istraživanjem polimorfizma restrikcijskih fragmenata (RFLP) kloroplastne *trnT-trnF* DNA regije, uz prikladnu statističku i filogenetičku obradu podataka.

Komparacijom dobivenih rezultata s drugim metodama koje se usporedno provode ili su u pripremi na istom ili sličnom uzorku zvončića (sekvenciranje kratkih transkribirajućih razmaknica nuklearne DNA (ITS), izoenzimi, palinologija, citologija, fenologija, ekologija, uzgoj u kulturi tkiva) nadam se u konačnici dobiti cjelovitiju sliku evolucije i sistematskog položaja istraživanih skupina dinarskih zvončića unutar roda *Campanula* i porodice *Campanulaceae*.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Materijal

Uzorci vrsta i populacija roda *Campanula* za ovo istraživanje prikupljeni su u razdoblju pune vegetacije u sezonama od 2001. do 2004. godine, većinom na lokalitetima duž prostora prirodne rasprostranjenosti vrsta<sup>6</sup>. Manji dio uzorka potječe iz sjemenki ili reznica prikupljenih na prirodnim staništima ili dobivenih razmjennom s drugim botaničkim vrtovima (putem publikacija *Delectus Seminum*). Primjerke vrsta s nehrvatskih područja Dinarida (Slovenija, Bosna i Hercegovina, Srbija i Crna Gora, Makedonija), te s Apeninskog poluotoka (Italija) prikupili su ili ustupili lokalni stručnjaci. Zbog nemogućnosti pristupa biljnom materijalu u svim oblicima potrebnim za ovo istraživanje uzorci za morfometrijsku i molekularnu analizu nisu mogli biti potpuno ujednačeni.

Sve su hrvatske vrste prikupljane na njihovim prirodnim staništima prema podacima iz literature unešenim u Bazu podataka hrvatske flore (*Flora Croatica Database*, Botanički zavod-PMF i FER-ZPM, 2005). Vrste roda *Campanula* na terenu sam određivala u razdoblju pune vegetacije primjenom determinacijskih ključeva (npr. Fedorov i Kovanda 1976, Domac 1994, Buzas 1998, Bernini i sur. 2002) te po nekoliko jedinki herbarizirala kako bi se mogle i naknadno provjeriti (*vaucher*). Terenski herbarij sa svim pripadajućim podacima vezanim uz ovo istraživanje pohranjen je u Botaničkom vrtu PMF-a u Zagrebu. Sva su staništa u Hrvatskoj fotografirana i na fotografijama označene jedinice s kojih su uzeti uzorci (listovi i cvjetovi), kako bi se moglo pratiti napredovanje i vijabilnost populacije. Zabilježene su geografske koordinate i nadmorska visina, a po mogućnosti i ostale ekološke karakteristike vezane uz stanište (tip vegetacije i tla, osunčanost), a podaci unešeni u Bazu hrvatske flore (*Flora Croatica Database*, Botanički zavod-PMF i FER-ZPM, 2005).

Podaci o prikupljenom materijalu nalaze se u tablici u Prilogu 5.

---

<sup>6</sup> Velik dio materijala prikupljen je na zaštićenim područjima prirode, unutar Nacionalnih parkova Sjeverni Velebit, Paklenica i Risnjak, Parkova prirode Biokovo, Učka i Velebit prema dozvolama Državne uprave za zaštitu prirode za skupljanje na zaštićenim područjima prirode u RH (broj 531-06/1DS-01-2/3 i 531-06/1-DS-02-2), te Parka prirode Blidinje (planine Čvrsnica i Čabulja, BiH), dozvolom Uprave Parka.

## Biljni materijal za morfometrijsku analizu

Usporedbena morfometrijska analiza usmjerena je na cvjetove zvončića agregata (u smislu Geslota 1984) *Waldsteiniana* (*Campanula waldsteiniana*, *C. tommasiniana*) i *Pyramidalis* (*C. pyramidalis*) s jedne strane, te na (većinom endemične) heterofilne vrste primorskih *Dinarida* iz velikog agregata *Rotundifolia* s druge strane, koje dosada nisu podrobnije istraživane, a Damboldt (1965b) je naglasio njihovu moguću srodnost. Iz jednakolisne skupine zvončića izabrala sam dvije slabije poznate vrste serije *Garganicae* (u smislu Trinajstića 1978): *C. debarensis* (Makedonija) i *C. reatina* (središnja Italija; Prilog 1, sl. 3), koje Damboldt nije uspio prikupiti (usp. 1965ab) ili ih tada nije poznao (vrstu *C. reatina* Lucchese je opisao 1993.). U svojim klasičnim radovima Damboldt (1965ab) je obradio morfologiju cvijeta endemičnih izofilnih zvončića, te istu usporedio i s morfologijom cvijeta zvončića agregata *Waldsteiniana*, što mu je dalo povoda za konačno izdvajanje zvončića agregata *Waldsteiniana* iz grupe *Isophylla*. Damboldt je razmatrao oblik i položaj čaške za vrijeme i nakon cvjetanja, oblik vjenčića, stupanj srastanja latica i širinu slobodnih dijelova latica (režnjeva) pri bazi, te dužinu prašnica i prašničkih niti, pa sam i ja uglavnom slijedila te osobine, uz dodatak nekih novih (Eddie i Ingrouille 1999). Materijal za morfometrijsku analizu sastojao se tako od ukupno 410 uzoraka (cvjetova) prikupljenih unutar 33 populacije koje pripadaju u 14 vrsta roda *Campanula* iz skupina *Waldsteiniana*, *Pyramidalis*, *Rotundifolia* i *Garganicae*. U geografskom pogledu uzorci potječu sa 27 lokaliteta na području prirodne rasprostranjenosti vrsta (Sl. 3.1 i Prilog 5). Kad je to bilo moguće, vrste uključene u ovo istraživanje predstavljene su i uzorkom populacije s nalazišta prvog opisa vrste («loc. cl.» u Prilogu 5), a lokaliteti uzorkovanja raspoređeni tako da čine presjek (transekt) kroz cjeloviti areal svojite. Na žalost, to ni za hrvatske endeme nije uvijek bilo moguće, jer neki, npr. *C. waldsteiniana* ili *C. velebitica* (Prilog 2, sl. 2) i nemaju jasan *locus classicus* («in rupibus Croatiae»), dok *C. tommasiniana* gotovo i nema «areal», već samo nekoliko lokaliteta na masivu Učke. Uzorci cvjetova za morfometrijsku analizu prikupljeni su u vrijeme kad su cvjetovi već potpuno razvijeni (ovisno o vrsti, od kraja lipnja do kraja rujna), s pretpostavkom da su dosegli konačnu veličinu i oblik. Cvjetovi većine populacija na terenu su sabirani u tekući medij: bočice s mješavinom 70%-tnog etanola (85%), formalina (10%) i octene kiseline (5%), tzv. «FOA»-otopina prema recepturi Tomlinsona (u Nikolić 1996). Toj se metodi pristupilo temeljem iskustava starijih

istraživača (Damboldt 1965, Eddie i Ingrouille 1999), prema kojima su specifične karakteristike cvijeta jako važne u determinaciji vrste gube i postaju neprepoznatljive klasičnim herbariziranjem. Na žalost, većinu vrsta sakupljenih (ljubaznošću kolega) izvan prostora Hrvatske nije bilo moguće transportirati drugačije nego u obliku herbarskog materijala, te je stoga pet populacija uključeno u morfometrijsko istraživanje prethodno herbarizirano, kao što je naznačeno u Prilogu 5. Usporedbena morfometrija cvjetova tako u konačnici obuhvaća tri izofiloidne vrste (dvije agregata *Waldsteiniana*, jednu *Pyramidalis*), devet heterofilnih i dvije izofilne.

Prvobitna namjera bila je u svakoj populaciji uzeti uzorke s po 20 odraslih i sasvim zdravih jedinki (po dva sasvim rascvjetana cvijeta), međusobno dovoljno udaljenih da se može pretpostaviti kako ne predstavljaju klonsku populaciju, kako bi uzorak bio ujednačen. Međutim, s obzirom na to da su pojedine populacije bile vrlo malobrojne, te su kao takve i zaštićene u sklopu nacionalnih parkova ili parkova prirode, od tog sam pravila povremeno morala i odstupati. Tako je najmanja populacija zastupljena sa samo dvije jedinke (dva cvijeta), a dvije najveće s po 24 cvijeta, te ukupni uzorak za morfometrijsku analizu nije mogao biti ujednačen. U svakom slučaju, populacija se pri uzorkovanju nastojala što manje oštećivati, odnosno uzimalo se samo onoliko uzoraka (cvijet, list, bazalne reznice) koliko ne šteti daljnjem životu jedinke, a samo je do pet primjeraka po populaciji herbarizirano (*voucher*).

### **Biljni materijal za DNA analizu**

U središtu DNA istraživanja našle su se ukupno 23 vrste (tablica u Prilogu 5) zvončića iz ciljnog područja primorskih Dinarida, ali i šire, koje predstavljaju nekoliko evolucijskih linija roda *Campanula*. DNA analiza usmjerena je na zvončiće «izofiloidnih» agregata (u smislu Geslota 1984) *Waldsteiniana* (*Campanula waldsteiniana*, *C. tommasiniana*) i *Pyramidalis* (*C. pyramidalis*), izofilne vrste serije (u smislu Trinajstića 1978) *Garganicae*, te izbor heterofilnih vrsta iz agregata *Rotundifolia* (uglavnom ovisno o dostupnosti materijala) primorskih Dinarida i srednje Europe. Kao kontrolna uključena je vrsta *Edraiantus tenuifolius*.

Ukupne stanične DNA izolirane su iz lisnih tkiva istraživanih svojti. Do 100 mg odraslih i sasvim zdravih listova s iste biljke odstranjeno je pincetom i pohranjeno u plastičnu vrećicu ili u silika-gel (samo kad je terensko istraživanje bilo višednevno), ako je bilo moguće na prirodnom lokalitetu, kad i cvjetovi za morfološka mjerenja.

Listovi za DNA-izolaciju prikupljeni su većim dijelom na prirodnim staništima, a manjim naknadno, s biljaka uzgojenih iz reznica ili sjemenki skupljenih na prirodnim staništima (DNA izolirana iz herbarskog materijala zbog svoje se degradiranosti pokazala nepogodnom za RFLP analizu kloroplastne DNA).

### **Uzgoj i pohrana materijala**

Za vrijeme skupljanja biljnog materijala za potrebe morfometrijskih i DNA analiza na svakom sam lokalitetu s po nekoliko zdravih i dobro razvijenih biljaka prema načelima vrtlarstva uzela i po nekoliko bazalnih reznica, koje su zakorjenjivane u Botaničkom vrtu PMF-a. Pri uzgoju zvončića iz sjemenki i reznica skupljenih na prirodnim lokalitetima, te iz sjemenki dobivenih razmjenom s drugim botaničkim vrtovima putem publikacija *Delectus Seminum* (Prilog 5), primijenjene su klasične hortikulture tehnike iz specijalizirane literature (Crook 1951, Lewis i Lynch 1998, Eddie 2000).

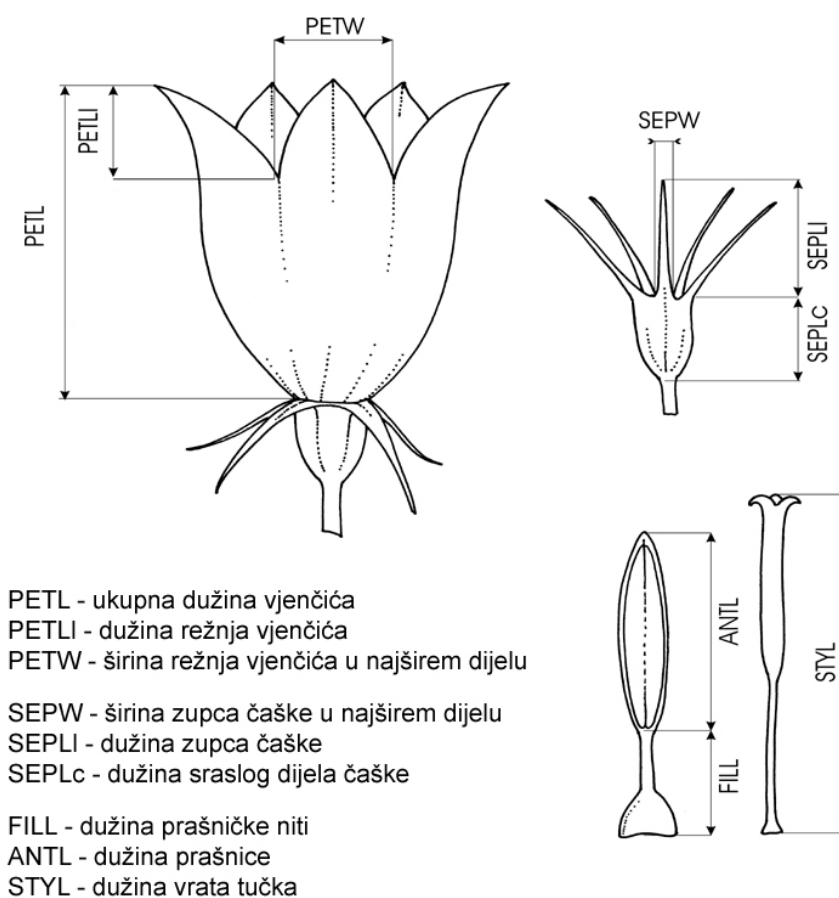
Sve biljke uzete s prirodnih staništa, uzgojene iz sjemenki/reznica skupljenih na prirodnim staništima ili dobivene razmjenom s drugim botaničkim vrtovima nalaze se u uzgoju Botaničkog vrta PMF-a u Zagrebu ili mojoj privatnoj zbirci. Tako je do danas sastavljena živa zbirka zvončića koja predstavlja stalni izvor materijala za daljnja istraživanja, te bazu za praćenje fenologije vrsta u kontroliranim uvjetima.

Ogledni (*voucher*) primjerci istraživanog materijala (klasično herbarizirani ili uloženi u FOA otopinu) pohranjeni su u Botaničkom vrtu PMF-a u Zagrebu.

## 3.2. Metode analize materijala

### **BIOMETRIJSKA ISTRAŽIVANJA – usporedbena morfometrija cvjetova**

Prilikom biometrijskih istraživanja svaki je sabrani cvijet zvončica izvađen iz FOA otopine, ispran u destiliranoj vodi (herbarski uzorci cvjetova šest populacija nakratko su prokuhani u destiliranoj vodi kako bi poprimili što pravilniji oblik), skalpelom prerezan između dva režnja vjenčića do baze čaške i uklopljen u glicerol između dvije predmetnice. Svi preparati skanirani su u identičnim uvjetima i s istim povećanjem i spremljeni u računalnom .jpg-formatu. Snimke su uređene (podešena transparentnost) u Adobe 6.0 računalnom programu i jedna po jedna prenošene u *image-analyser* program za mjerenje Carnoy 2.0 Laboratorija za biljnu sistematiku Leuven (2004). Nakon skaniranja svi su secirani uzorci izvađeni iz glicerola, kratko isprani u etanolu i vraćeni u bočice s FOA otopinom.



**Slika 3.2.** Mjerena morfološka svojstva cvjetova roda *Campanula*.

Devet mjerenih kvantitativnih morfoloških osobina (Sl. 3.2) svakoga cvijeta zabilježeno je u milimetrima i preneseno u program Excell 2002, u kojemu su naknadno provjerene i uređene u stupce prikladne za obradu programom STATISTICA 7.1 (StatSoft 2005). Kvantitativne mjerene osobine cvjetova prilagođene su prema literaturnim podacima, prvenstveno Damboldta (1965ab) te Eddieja i Ingrouillea (1999).

## **MOLEKULARNA ISTRAŽIVANJA – analiza raznolikosti restrikcijskih fragmenata kloroplastne *trnT-trnF* regije (RFLP *trnT-trnF* cpDNA)**

### **Izolacija ukupne stanične DNA**

Ukupne stanične DNA izolirane su iz 100-150 mg svježeg ili 30-50 mg silika-gel osušenog lisnog tkiva upotrebom DNeasy® Plant Mini DNA izolacijskog kompleta (Qiagen®) na sljedeći način:

1. Lisno tkivo smješteno je u 1,5 ml epruvetu, preliveno tekućim dušikom te usitnjeno uz pomoć plastičnog tučka koji svojim oblikom potpuno pristaje dnu epruvete (Sigma).
2. Dodano je 400 µl AP1 pufera (otopina detergenata i proteinaze) i 4 µl Rnaze A.
3. Dobiveni homogenat inkubiran je 10 minuta na 65°C uz povremeno miješanje (liziranje stanica).
4. Dodano je 130 µl AP2 pufera te je epruveta smještena 5 min na -20°C (taloženje denaturiranih proteina).
5. Sadržaj epruvete je centrifugiran 7,5 min na x g.
6. Gornji vodeni sloj (sadrži DNA molekule) je prebačen na QIAshredder Mini Spin kolonu te filtriran centrifugiranjem na x g 4 min.
7. 450 µl filtrata prebačeno je u novu 1,5 ml epruvetu te je dodano 675 µl AP3 otopine (AP3 otopina omogućava selektivno vezanje isključivo DNA molekula na silika-membranu unutar Dneasy Mini Spin kolone).
8. Nakon što je sadržaj epruvete izmiješan prevrtanjem epruvete, nanesen je na Dneasy Mini Spin kolonu te centrifugiran 1 min na x g (vezanje DNA molekula na silika-membranu).
9. Nakon što je filtrat prebačen na Dneasy Mini Spin kolonu dodano je 500 µl AW otopine (glavni sastojak je 70% etanol) te je centrifugirana 1 min na x g (ispiranje DNA molekula vezanih na silika-koloni).
10. Postupak u koraku 9 ponovljen je još jednom.
11. Dneasy Spin kolona je ostavljena otvorena 5 min na sobnoj temperaturi kako bi ispario sav etanol.
12. Dneasy Mini Spin kolona je smještena u čistu 1,5 ml epruvetu te je na silika-membranu dodano 100 µl AE otopine (vodena otopina TRIS-a koja održava pH iznad 8, što je nužno za sprječavanje degradacije DNA kroz duži vremenski period),

13. Nakon centrifugiranja 1 min na 16000 x g otopina DNA skupljena je kao filtrat prosječne koncentracije od 200 ng DNA / $\mu$ l,
14. Kvaliteta i koncentracija izolirane DNA provjerena je na 1% gelu agaroze.

### **Umnožavanje kloroplastne *trnT-trnF* regije lančanom reakcijom polimerazom**

Umnožavanje kloroplastne *trnT-trnF* regije odvijalo se u ukupnom volumenu od 100  $\mu$ l u uređaju GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems®). Svaka reakcijska otopina sadržavala je sljedeće:

- PCR pufer (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl pH 8,3) / Eppendorf®/
- 200 ng DNA
- 100  $\mu$ M svakog od četiri deoksinukleotid trifosfata – dATP, dCTP, dGTP, dTTP /Eppendorf®/
- 0,36  $\mu$ M svake *trnT-trnF* početnice (početnica A 5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3'; početnica F 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3')
- 2,5 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>
- 3 jedinice Taq DNA Polymerase /Eppendorf®/
- steriliziranu deioniziranu vodu do ukupnog volumena od 100  $\mu$ l.

Reakcija umnožavanja DNA odvijala se prema sljedećem programu:

- 94°C 5 min (1 ciklus)
- 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 2 min (35 ciklusa)
- 72°C 10 min (1 ciklus).

### **Restriksijska razgradnja kloroplastne *trnT-trnF* regije**

Restriksijska razgradnja svake umnožene kloroplastne *trnT-trnF* regije provedena je odvojeno s ukupno osam restriksijskih enzima: *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*, *RsaI*, *MaeI*, *TaqI* i *Tru9I* (Roche). Ukupna reakcijska otopina bila je 20  $\mu$ l, a sadržavala je:

- 2  $\mu$ l 10 x restriksijskog pufera
- 0,4  $\mu$ l restriksijskog enzima
- 5,6  $\mu$ l sterilizirane deionizirane vode
- 12  $\mu$ l produkta lančane reakcije polimerazom (*trnT-trnF* kloroplastna regija).

Pripremljene otopine inkubirane su dva sata na 37°C (*AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*, *RsaI*, *MaeI*) ili na 65°C (*TaqI* i *Tru9I*).

## Elektroforeza u gelu agaroze

Elektroforeza u gelu agaroze upotrijebljena je kako bi se odredila kvaliteta izolacije i koncentracija izolirane DNA te kako bi se razdvojili RFLP produkti. Kako bi se omogućilo nanošenje DNA u jažice i praćenje kretanja fragmenata kroz gel, dobivenim produktima je prije elektroforeze dodan pufer za nanošenje (30% saharoza, 0,25% brom-fenolno modrilo, 0,25% ksilen-cijanolo - Sambrook i sur. 1989).

Elektroforeza ukupne stanične DNA provedena je u 0,8% gelu agaroze, u 0,5 x TBE puferu (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8) kroz 1 sat pri 100 V (Sambrook i sur. 1989). Kako bi se odredila koncentracija i kvaliteta izolirane DNA, u istoj elektroforezi su kao standardne DNA korištene DNA bakteriofaga (Boehringer Mannheim) u koncentracijama 50, 100 i 250 ng/μl (Snowdon i Langsdorf 1998).

Za detekciju fragmenata DNA dobivenih umnožavanjem *trnT-trnF* kloroplastne regije i DNA fragmenata dobivenih RFLP metodom korištena je elektroforeza u 1,4% gelu agaroze. Ta elektroforeza je također provedena u 0,5 x TBE puferu i pri naponu od 100 V, dok brom-fenolno modrilo nije prošlo 10 cm kroz gel. Kao DNA standardi za određivanje veličine DNA fragmenata na gelu agaroze upotrijebljeni su DNA veličinski standard VII (Roche) raspona od 359 do 8576 bp i veličinski standard IX (Roche) raspona od 50 do 1300 bp. DNA fragmenti su bojani etidij bromidom koji se specifično veže na nukleinske kiseline interkalirajući se između dušičnih baza. Bojanje je provedeno tako da je gel uronjen u otopinu etidij bromida u 0,5 x TBE puferu (5 μg/ml) te je tako ostavljen kroz 25 minuta. Gel je zatim ispran vodom i stavljen pod ultraljubičasto svjetlo transiluminatora (Sigma® T-2202) gdje je fotografiran.

### **3.3 Obrada podataka**

#### **UNIVARIJATNA OBRADA MORFOMETRIJSKIH PODATAKA**

Statička obrada morfometrijskih podataka obavljena je računalno, uporabom paketa Statistica 7.1 (StatSoft 2005). Sve korištene metode provedene su korištenjem standardnih algoritama (Conover 1980, Everitt 1981, Legendre i Legendre 1998, Sokal i Rohlf 1989, Quinn i Keough 2002).

##### **Ovisnost mjerenih svojstava cvijeta o nezavisnim varijablama staništa**

Mogući utjecaj vremena sabiranja (konzerviranja) uzoraka mjeren je koreliranjem srednjih vrijednosti mjerenih osobina s relativnim vremenskim slijedom sabiranja primjenom Pearsonovog koeficijenta korelacije (Legendre i Legendre 1998). Naime, može se pretpostaviti da prirodna sezonska, tj. razvojna varijabilost mjerenih osobina utječe na njihovo taksonomsko značenje starenjem cvjetova i smanjivanjem (sušenjem) cvjetnih dijelova. Provjereno je stoga postojanje izravne veze između datuma sabiranja i srednjih vrijednosti osobina cvijeta.

Pearsonovim korelacijskim koeficijentom procijenjena je i ovisnost mjerenih svojstava cvijeta s geografskim položajem nalazišta, kako bi se utvrdilo postoji li njihova uzajamna veza. Geografski podaci o točnom položaju lokaliteta na kojima su prikupljeni uzorci (istočne dužine,  $E$ , i sjeverne širine,  $N$ ) dani su u obliku Gauss-Krügerovih koordinata. Za hrvatske lokalitete korišteni su podaci dobiveni GPS-uređajem na samom terenu ili koordinatne mreže zemljovida u mjerilu 1:25.000, a za lokalitete izvan Hrvatske pravokutne koordinatne točke približno su određene s karata mjerila 1:100.000.

##### **Deskriptivni statistički pokazatelji**

Za sve mjerene osobine cvjetova izračunati su standardni statistički pokazatelji (Conover 1980, Sokal i Rohlf 1989). Popis svih u ovom istraživanju računatih parametrijskih i neparametrijskih statističkih pokazatelja za svaku mjerenu varijablu cvijeta prikazan je u Tablici 3.1.

**Tablica 3.1.** Parametrijski i neparametrijski statistički pokazatelji izračunavani pojedinačno za svaku mjerenu varijablu cvijeta.

	<b>Oznaka varijable</b>	<b>Opis varijable</b>
Parametrijski pokazatelji	N	Veličina ukupnog uzorka
	$\bar{x}$	Aritmetička sredina (srednja vrijednost), <i>mm</i>
	$\Sigma$	Suma vrijednosti, <i>mm</i>
	Conf (-95%)	Interval povjerljivosti na -95%, <i>mm</i>
	Conf (95%)	Interval povjerljivost na 95%, <i>mm</i>
	G	Geometrijska sredina (srednja vrijednost), <i>mm</i>
	H	Harmonijska sredina (srednja vrijednost), <i>mm</i>
	CV	Koeficijent varijabilnosti, %
	Min	Najmanja izmjerena vrijednost, <i>mm</i>
	Max	Najveća izmjerena vrijednost, <i>mm</i>
	SD	Standardna devijacija, <i>mm</i>
	SE	Standardna pogreška (greška standardne devijacije)
	Kurt.	Koeficijent spljoštenosti krivulje, <i>kurtosis</i>
	$S_k$	Greška koeficijenta spljoštenosti krivulje
	Skew.	Koeficijent iskošenosti krivulje, <i>skewness</i>
$S_{sk}$	Greška koeficijenta iskošenosti krivulje	
Neparametrijski pokazatelji	$S^2$	Varijanca (ovisi o $N$ i $x$ )
	C	Median (mjera središnje tendencije uzorka)
	Mo	Mod (vrijednost koja se u uzorku najčešće pojavljuje)
	F(Mo)	Frekvencija pojavljivanja moda u uzorku
	Q1	Donji kvartil, 25-ti percentil ili .25-ti kvantil
	Q3	Gornji kvartil, 75-ti percentil ili .75-ti kvantil
	R (Q3-Q1)	Raspon kvartila (širina raspona oko medijana koja uključuje 50% slučajeva)
	R	Ukupni raspon
	$X_p$ (10)	Percentil na 10
	$X_p$ (90)	Percentil na 90

### Distribucija podataka

Usporedno s rezultatima deskriptivne analize za svako pojedino mjereno svojstvo načinjeni su i neparametrijski testovi (Kolmogorov-Smirnov i  $\chi^2$ ) kojima se na razini od 5% ( $p \geq 0,05$ ) dokazalo slijedi li realna raspodjela učestalosti (distribucija frekvencija) rezultata mjerenja ciljnih varijabli normalnu (uobičajenu, očekivanu) krivulju učestalosti. Ovisno o statističkoj značajnosti toga testa u daljoj su analizi korišteni parametrijski ili neparametrijski pokazatelji (Conover 1980, Sokal i Rohlf 1989).

### **Univarijatna analiza varijanci (Kruskal-Wallis ANOVA)**

Analiza varijanci korištena je za procjenu individualne i populacijske varijabilosti uzorka temeljem određenih mjerenih svojstava cvjetova. U ovom je istraživanju statistička značajnost razlika između većeg broja grupa (svojni ili populacija) obzirom na jednu varijablu (osobinu cvijeta) testirana korištenjem neparametrijske ili Kruskal-Wallisove analize varijanci (Conover 1980), koja se standardno koristi kad se istraživana svojstva ne pokazuju normalno distribuiranim.

Za grafički prikaz rezultata unutar svake skupine (populacije) korišteni su *Box & Whisker*-dijagrami koji prikazuju srednju vrijednost, standardnu pogrešku, te standardnu devijaciju pojedinih mjerenih svojstava unutar populacija.

## **MULTIVARIJATNA OBRADA MORFOMETRIJSKIH PODATAKA**

### **Diskriminantna analiza**

Diskriminantna analiza provodi se kad su skupine jasno definirane, tj. već prije analize (*a priori*) poznate, te se za njima "ne traga". Tom je metodom u ovom istraživanju ispitana struktura razlika među populacijama uz procjenu njihovog položaja u diskriminacijskom prostoru (Legendre i Legendre 1998, Quinn i Keough 2002), čime je utvrđeno koje se (nezavisne) mjerene varijable mogu najbolje iskoristiti za razlikovanje dviju ili više prirodnih skupina primjeraka (populacija, vrsta, rodova). U analizu su uključene sve mjerene varijable, a ne samo one koje su se na temelju preliminarnih testiranja pokazale "signifikantnima". Kao prirodne skupine uzeti su svi primjerci cvjetova koji su uporabom determinacijskih ključeva određeni kao pripadnici iste vrste (zavisna ili grupirajuća varijabla), tako da ulazna matrica podataka nije sadržavala nedostajuće podatke (*missing values*) nego je uključila sve mjerene varijable. Podaci podrijetlom iz univarijatne statističke analize ukazali su na postojanje razlikovnih (diskriminantnih) varijabli, te smo primijenili «korak unaprijed» (*forward stepwise*) podproceduru «korak po korak» (*stepwise*) diskriminacijske procedure. Tom su metodom prvo izračunati Wilks' Lambda koeficijenti, kojima je izražen statistički značaj snage razlikovanja u modelu. Vrijednost Wilks' Lambda varira od 1,0 (nema razlikovnog značenja) do 0,0 (savršeno razlikovanje), ukazujući na mogućnost razlikovanja prirodnih, unaprijed odabranih skupina.

Vrijednost Wilks' Lambda koeficijenta izražen je i putem standardne  $F$ -vrijednosti, koja je obrnuto proporcionalna od Wilks' Lambda koeficijenta, te je razlikovna snaga varijable to veća što je  $F$ -vrijednost veća.

### **Kanonička i korelacijska analiza**

Za daljnji uvid u odnose varijabli i vrsta roda *Campanula* provedena je kanonička i korelacijska analiza (Legendre i Legendre 1998, Quinn i Keough 2002), temeljena na izračunu ukupnog broja mjerenih varijabli «manje jedna», čime je dobiven određen broj nezavisnih, ortogonalnih diskriminacijskih funkcija od kojih svaka daljnja doprinosi razlikovanju vrsta sve manje i manje. Za potrebe razumijevanja doprinosa svake značajke cvijeta u diskriminaciji duž kanoničkih osi, izračunati su koeficijenti svih kanoničkih osi i svih varijabli, a matrica je standardizirana kako bi skale različitih mjernih svojstava bile usporedive. Nakon što je utvrđeno koje osobine i u kojoj mjeri doprinose razlikovanju vrsta duž pojedinih kanoničkih osi, izračunom kanoničkih srednjih vrijednosti (*canonical means*) ustanovljena je priroda te diskriminacije za svaku os. Vjerojatnost pripadnosti određenog primjerka određenoj vrsti pretpostavljena je na temelju rezultata diskriminacijske analize (*post hoc* ili *a-posteriori* klasifikacija), tj. primjerci su klasificirani onoj vrsti kojoj su se na temelju osobina cvijeta pokazali najbližima, te je tako otkrivena i nepreciznost *a priori* determinacije vrsta. U grafičkom prikazu, svaka vrsta predstavljena je centroidom, aritmetičkom sredinom pojedine varijable u  $n$ -dimenzionalnom prostoru (gdje je  $n$ =broj varijabli), a udaljenost svakog primjerka do centroida svake vrste izračunata je Mahalanobisovim koeficijentom udaljenosti.

### **Analiza glavnih komponenata (PCA)**

U ovoj je disertaciji PCA metoda korištena kao klasifikacijska tehnika, kako bi se utvrdila grupiranja vrsta ili populacija s obzirom na mjerene varijable cvjetova (Legendre i Legendre 1998, Quinn i Keough 2002). Analiza glavnih komponenata primijenjena je na sve podatke, prethodno standardizirane  $z$ -score metodom, kako bi se utvrdilo postojanje prirodnih skupina istraživanih uzoraka, tj. kako bi ih se klasificiralo. Izračunato je ukupno devet PC-osi (koliko je i mjerenih varijabli) i njihovih *eigen*-vrijednosti koje reprezentiraju raspon varijabilnosti (*proportion of variance*) kanoničkih varijabli na koje se odnose. Rezultati su prikazani i grafički, *scatter*-dijagramom parova PC-osi u 2D-prostoru.

### **Metode grupiranja podataka (*Cluster* analiza)**

*Cluster* analiza korištena je za utvrđivanje biološke udaljenosti među prvobitno neklasificiranim objektima (Everitt 1981, Legendre i Legendre 1998, Quinn i Keough 2002), u ovom slučaju populacijama. Korištena je UPGMA aglomerativna hijerarhijska metoda, kojom se istovremeno samo jedna operacijska taksonomska jedinica grupiranja (*Operational Taxonomic Unit*, OTU) pripaja drugoj. Ulazna informacija je Euklidska matrica udaljenosti, a krajnji rezultat prikazan je dendrogramom. Primjenom UPGMA metode biološke udaljenosti između objekata (populacija) procijenjene su kao prosječne Euklidske udaljenosti između svih parova OTU-a u dva različita klastera višedimenzionalnog prostora.

### **FILOGENETIČKA OBRADA MOLEKULARNIH PODATAKA**

Filogenetička obrada molekularnih podataka izvršena je računalno, korištenjem programskog paketa PAUP 4.0b10 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony; Swofford 1993). Vrsta *Edraianthus tenuifolius* odabrana je kao kontrolna (*out-group*).

### **Analiza parsimonije (*Parsimony analysis*)**

Prilikom analize parsimonije kao ulazni set podataka korištena je binarna matrica dobivena prevođenjem restrikcijskih fragmenata, tako da je postojanje restrikcijskog mjesta kodirano s 1, a nepostojanje s 0 (Swofford 1993). Korištena je MULPARS opcija s jednostavnim "Stepwise" i "Tree Bisection Reconnection" (TBR) dodavanjem grana. Izračunate informativne karakteristike rezultirale su određenim brojem jednako parsimoničnih stabala (*equally parsimonious trees*). Iz «najparsimoničnijih» (*most parsimonious trees*) među njima generiran je konačno jedan kladogram (*50%-majority-rule consensus tree*) korištenjem CONTREE komande. *Bootstrap*-vrijednosti [BS], koje ukazuju na vjerojatnost filogenetičke srodnosti određenih grana, izračunate su korištenjem BOOTSTRAP komande.

### **Metoda najbližeg susjeda (*Neighbour-joining tree*, NJ)**

Kao dodatak analizi parsimonije korištena je Metoda najbližeg susjeda.

Binarna matrica podataka upotrijebljena je za izračunavanje genetske udaljenosti između OTU-a primjenom Nei i Li koeficijenta (Nei i Li 1979). Dobivena matrica genetskih udaljenosti obrađena je metodom najbližeg susjeda (*neighbour-joining tree*, NJ - Swofford 1993), a rezultat prikazan filogenetskim stablom.

## 4. REZULTATI

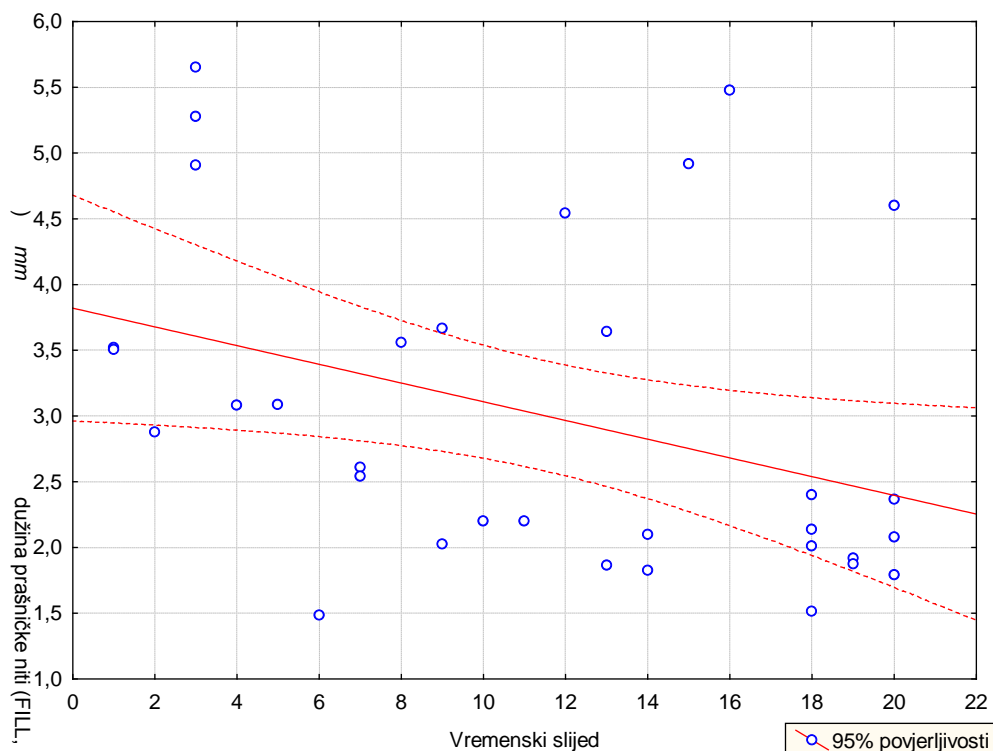
### 4.1. Rezultati usporedbenih morfometrijskih analiza

#### UNIVARIJATNA OBRADA MORFOMETRIJSKIH PODATAKA

##### Ovisnost mjerenih svojstava cvijeta o nezavisnim varijablama staništa

##### Ovisnost mjerenih svojstava cvijeta s vremenskim slijedom sabiranja uzoraka

Korelacije mjerenih varijabli cvijeta s vremenskim slijedom sabiranja prikazane su u Tablici 4.1. Za većinu mjerenih osobina korelacije nisu značajne, tj. vrijeme sabiranja uzorka nije utjecalo na izmjerene vrijednosti. Izuzetak čini dužina prašničke niti (FILL) kod koje je uočena mala statistički značajna negativna korelacija ( $\alpha=0,05$ , Sl. 4.1). No, kako se i ta značajnost gubi uz primjenu nešto strožeg kriterija (već na  $\alpha=0,02$ ), možemo zaključiti da vrijeme skupljanja uzoraka nije značajno utjecalo na mjerene varijable cvjetova, tj. različito vrijeme skupljanja biljnog materijala (stupanj zrelosti (starost) cvijeta), ne utječe značajnije na biometrijske rezultate istraživanih populacija.



**Slika 4.1.** Korelacija vremenskog slijeda sabiranja uzoraka s dužinom prašničkih niti (FILL;  $r=0,37$ )

**Tablica 4.1.** Korelacije vremenskog slijeda i mjerenih varijabli cvijeta: korelacija za FILL značajna je na  $\alpha \geq 0,05$ .

Varijabla	SEPLI	SEPLc	SEPW	PETL	PETLI	PETW	STYL	ANTL	FILL
Vremenski slijed	0,10	-0,23	0,02	0,05	-0,04	-0,03	0,04	0,16	<b>-0,37</b>

#### Ovisnost mjerenih svojstava cvijeta o geografskom položaju

Devet mjerenih varijabli cvjetova roda *Campanula* stavljeno je i u prostorni kontekst. Tri mjerena svojstva (SEPW, PETLI i ANTL) pokazala su statistički značajnu korelaciju s geografskim položajem lokaliteta sabiranja: redovito negativnu s geografskom širinom, a pozitivnu s geografskom dužinom (Tab. 4.2), prikazanima u obliku Gauss-Krügerovih koordinata (x koor, y koor).

**Tablica 4.2.** Korelacija mjerenih svojstava cvijeta ukupnog uzoraka s Gauss-Krügerovim koordinatama nalazišta.  $\alpha=0,05^1$ ,  $\alpha=0,03^2$ ,  $\alpha=0,01^3$

Mjereno svojstvo	Koordinata nalazišta	
	x koor	y koor
SEPLI	-0,08	0,21
<b>SEPW</b>	<b>-0,66</b> <sup>123</sup>	<b>0,68</b> <sup>123</sup>
PETL	0,00	0,15
<b>PETLI</b>	<b>-0,53</b> <sup>123</sup>	<b>0,47</b> <sup>12</sup>
PETW	-0,30	0,28
STYL	-0,21	0,30
<b>ANTL</b>	<b>-0,46</b> <sup>12</sup>	<b>0,43</b> <sup>1</sup>
FILL	-0,37	0,34
SEPLc	-0,29	0,27

Značajnu pozitivnu korelaciju s geografskim položajem ( $r=0,68$ ) pokazuje širina zubaca čaške (SEPW) u odnosu na geografsku dužinu (y koor;  $\alpha=0,05$ ,  $0,03$ ,  $0,01$ ). I korelacija istoga svojstva s geografskom širinom (x koor) gotovo je jednako visoka, ali negativna ( $r=-0,66$ ), što znači da širina zubaca čaške u najširem dijelu najviše ovisi o geografskom položaju: zupci čaške su to širi što populacija živi na manjim (južnijim) geografskim širinama i većim (zapadnijim) dužinama. Značajnu negativnu korelaciju ( $r=-0,53$ ) s geografskom širinom (x koor;  $\alpha=0,05$ ,  $0,03$ ,  $0,01$ ), pokazuje i svojstvo

dužine reznjeva vjenčića (PETLI). Korelacija dužine reznjeva s geografskom dužinom (y koor) nešto je manje značajna ( $\alpha=0,05$ ,  $\alpha=0,03$ ;  $r=0,47$ ), no opet prati isti trend: slobodni reznjevi vjenčića to su duži što vrste roda *Campanula* rastu na manjim geografskim širinama i većim dužinama. Korelacije dužine prašnica (ANTL) s geografskim koordinatama lokaliteta također su manje značajne (za geografsku širinu  $\alpha=0,05$ ,  $\alpha=0,03$  uz  $r=-0,46$ , a za dužinu  $\alpha=0,05$  uz  $r=0,43$ ). U nešto manjoj mjeri, tako su i prašnice roda *Campanula* duže što istraživane populacije rastu južnije i zapadnije.

Treba naglasiti i da na ovisnost navedenih varijabli o koordinatama staništa jako utječu populacije *C. pyramidalis*, znatno većih cvjetova i sabrane naj-sjeverozapadnije. No, cvjetovi *C. pyramidalis* bit će jednostavno najveći bez obzira na to gdje su sabrani, a i ta vrsta cvate najkasnije od svih istraživanih, stoga je analiza u ovom dijelu ponovljena i bez populacija vrste *C. pyramidalis*. Međutim, ni ti rezultati nisu dali značajnijih korelacija već na razini značajnosti od  $\alpha=0,03$ . Drugim riječima, geografski položaj lokaliteta sabiranja uzorka ne utječe značajnije na biometrijske rezultate istraživanih populacija, s vrstom *C. pyramidalis* ili bez nje.

### **Deskriptivna statistička analiza s distribucijom podataka**

Originalne izmjere devet varijabli cvjetova zvončića na cjelokupnom uzorku, bez obzira na vrstu i populaciju (ukupno 410 cvjetova) prikazane su u Prilogu 6. Ukupni rezultati deskriptivne statistike po populacijama i mjerenim varijablama prikazani su u Prilogu 7. Izračunati parametrijski i neparametrijski deskriptivni statistički pokazatelji za cijeli uzorak i sve varijable prikazani su u Prilogu 8.

Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa normalnosti distribucije dani su u Tablici 4.3 i otkrivaju da tri varijable (SEPW, PETLI i ANTL) pokazuju značajno odstupanje od normalne distribucije. U daljnjem tekstu (str. 30-44) za svaku pojedinu mjerenu varijablu po istraživanim populacijama prikazane su u obliku *Box & Whisker*-dijagrama srednje vrijednosti ( $\bar{x}$ ) i pripadajuće standardne devijacije (SD) sa standardnim pogreškama (SE). Ti rezultati zorno prikazuju međusobni odnos srednjih vrijednosti pojedinih populacija, njihovu varijabilnost, te ukupan raspon mjerenih osobina. Razdiobe učestalosti (distribucije frekvencija) sa superponiranom krivuljom očekivane normalne razdiobe prikazane su u obliku histograma također iza svakog mjenog svojstva.

**Tablica 4.3** Rezultati neparametrijskih testova za utvrđivanje normalnosti distribucije frekvencija za devet mjerenih varijabli u čitavom uzorku

varijabla	Kolmogorov-Smirnov test		X <sup>2</sup> -test	df	p	distribucija
	d	p				
SEPL	0,09664	n.s.	2,62535	2	0,2691	normalna
SEPLc	0,1161	n.s.	3,51901	2	0,17213	normalna
SEPW	0,22348	< 0,1	13,48679	1	0,00024	Značajno odstupanje!
PETL	0,08844	n.s.	0,58237	1	0,44539	normalna
PETLI	0,19974	< 0,15	17,6137	2	0,00015	Značajno odstupanje!
PETW	0,10399	n.s.	2,58178	1	0,1081	normalna
STYL	0,09443	n.s.	0,61418	1	0,43322	normalna
ANTL	0,18145	< 0,2	2,10571	2	0,34894	Značajno odstupanje!
FILL	0,17162	n.s.	2,61105	1	0,10612	normalna

## DUŽINA ZUBACA ČAŠKE (SEPLI)

Prosječna dužina zubaca čaške u ukupnom uzorku iznosi 3,56 mm, krećući se u rasponu od 1 mm pa do gotovo 1 cm, tako da je koeficijent varijabilnosti (CV) za to svojstvo vrlo visok (47%), čemu najviše doprinose dvije istraživane populacije vrste *C. pyramidalis*, te jedna populacija vrste *C. rotundifolia* s.l. (Prilog 8). Na *Box & Whisker* dijagramu (sl. 4.2) vidi se izdvajanje izofilnih i izofiloidnih vrsta zupcima čaške kraćim od 3 mm, od heterofilnih vrsta s duljim zupcima.

Najkraće zupce čaške (između 1,5 i 2,5 mm) imaju populacije *C. waldsteiniana* (s lokaliteta Alaginac i Buljma), te talijanski subendem *C. reatina*. Malene zupce ima i *C. tommasiniana* te dvije sjeverne populacije *C. pyramidalis* (Prilog 6), koje zajedno s obje populacije *C. rotundifolia* s.l. imaju i jako velik raspon dužina zubaca, od gotovo 1 cm. Najduži zupci čaške, od gotovo 8 mm, zabilježeni su u populaciji *C. velebitica* sa Zavižana, te kod vrste *C. jordanovii*, dok je dužina zubaca čaške ostalih populacija većinom između 3,5 i 4,5 (6,5) mm. Na Sl. 4.2 može se također zamijetiti i određena sličnost populacija heterofilnih zvončića (dužina zubaca kreće se između 2,5 i 4,5 mm), koje su redom manje varijabilne (s malim rasponom standardne devijacije). Populacije *C. justiniana* međusobno su gotovo identične, a njima se priključuje i vrsta *C. marchesettii*. Izrazitom varijabilnošću ističe se populacija *C. pyramidalis* s Pelješca (više od 2 mm), te *C. albanica* iz Makedonije i *C. velebitica* s Buljme. Te tri populacije najviše utječu na visok koeficijent varijabilnosti dužine zubaca čaške u uzorku, odmah iza širine zubaca čaške.

Usprkos tome što koeficijenti spljoštenosti (*kurtosis*) i iskošenosti krivulje (*skewness*) iznose oko 1, odnosno -1, prema rezultatima Kolmogorov-Smirnov testa (Tab. 4.3) odstupanja od normalne raspodjele dužina zubaca čaške nisu značajna (sl. 4.3).

Mod učestalosti je multipli, kao i kod svih drugih mjerenih svojstava.



## ŠIRINA ZUBACA ČAŠKE (SEPW)

Širina zubaca čaške u najširem dijelu (pri bazi) u ukupnom uzorku iznosi 0,82 mm (Prilog 8), na što najviše utječe samo jedna mjerena populacija, *C. pyramidalis* s Pelješca (gotovo trostruko širi zupci čaške od većine ostalih vrsta). Koeficijent varijabilnosti vrlo je visok (84%), čemu opet najviše doprinosi ista populacija *C. pyramidalis*, dok su ostale 32 populacije (relativno) slabo varijabilne (Prilog 8). Širina zubaca čaške tako je daleko najvarijabilnije svojstvo od svih mjerenih: raspon varijabilnosti kreće se od 0,06 mm (izmjereno u populaciji *C. waldsteiniana* s Buljme) do čak 5,24 mm (pelješka populacija *C. pyramidalis*). Gledajući po vrstama i populacijama, najuže zupce čaške ima vrsta *C. justiniana*, a zupce uže od pola milimetra imaju i populacije vrsta *C. rotundifolia*, *C. tommasiniana* i *C. debarensis*. Širinom zubaca čaške prosječno većom od 3 mm izrazito odstupa vrsta *C. pyramidalis* s Pelješca, što je u velikom neskladu s ostalim mjerenim populacijama, pa i iste vrste. Populacije vrste *C. pyramidalis*, doduše, imaju najšire zupce čaške uopće, što se vidi u Prilogu 6, kao i na dijagramu (sl. 4.4), ali su kod svih ostalih populacija osim pelješke te vrijednosti manje od 2 mm. Na istom se dijagramu može zamijetiti i da zupce šire od 1 mm ima još samo vrsta *C. jordanovii*, dok ostale mjerene vrste i populacije imaju (znatno) uže zupce i većinom vrlo malu varijabilnost toga svojstva.

Visoke vrijednosti ukazuju na iznimno veliku spljoštenost (12,49) i skošenost (asimetričnost, 3,19) krivulje distribucije učestalosti spram pravilne, te je i analiza primjenom Kolmogorov-Smirnov i  $\chi^2$  testova (Tab. 4.3) pokazala značajno odstupanje od normalne raspodjele, što se može vidjeti na pripadajućem histogramu (sl. 4.5).

## DUŽINA sraslog dijela ČAŠKE (SEPLc)

Prosječna dužina sraslog (sinsepalnog) dijela čaške u ukupnom uzorku iznosi 2,31 mm, a kreće se od 1,16 mm pa do 6,74 mm. Koeficijent varijabilnosti (CV) za to svojstvo iznosi relativno malih 26,75% (pripadajuća standardna devijacija (SD) najmanja je od svih mjerenih varijabli: iznosi samo 0,62 mm - Prilog 8). Kao što je uočljivo na dijagramu (sl. 4.6), prema svojstvu dužine sraslog dijela čaške (bez zubaca) ne izdvajaju se jasno bliske populacije ni vrste. Najduže čaške imaju tri populacije vrste *C. pyramidalis*, od kojih dvije i vrlo velik raspon varijabilnosti (SD) kao i standardne pogreške (SE).



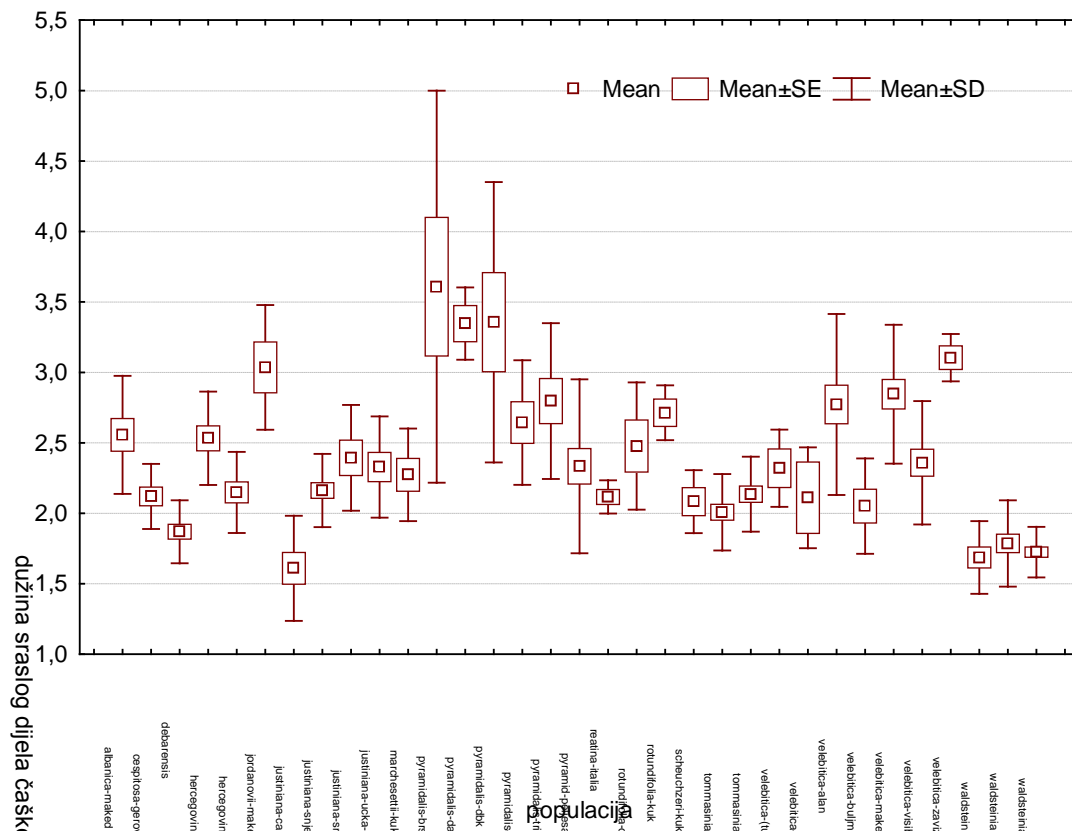
Prema svojstvu dužine sraslog dijela čaške u ukupnom uzorku ponešto se ističe *C. jordanovii* sa čaškom dugom 3 mm, te bliska *C. velebitica* sa Zavižana. Jasnije su izdvojene populacije vrste *C. waldstainiana* svojim kratkim čaškama, a čaške manje od 2 mm imaju i *C. debarensis* te *C. justiniana* (iz sjene). Čaške dužina između 2 i 2,5 mm imaju većinom sve ostale heterofilne populacije. Koeficijent spljoštenosti krivulje iznosi 7,07 i ukazuje na veću spljoštenost krivulje spram normalne, dok koeficijent skošenosti krivulje iznosi 1,69 i ukazuje na veću desnu asimetričnost od uobičajene (sl. 4.7). Prema rezultatima Kolmogorov-Smirnov testa (Tab. 4.3) ta odstupanja ipak nisu značajna, pa se raspodjela učestalosti za dužinu sraslog dijela čaške može smatrati uobičajenom.

### **DUŽINA slobodnog REŽNJA VJENČICA (PETLI)**

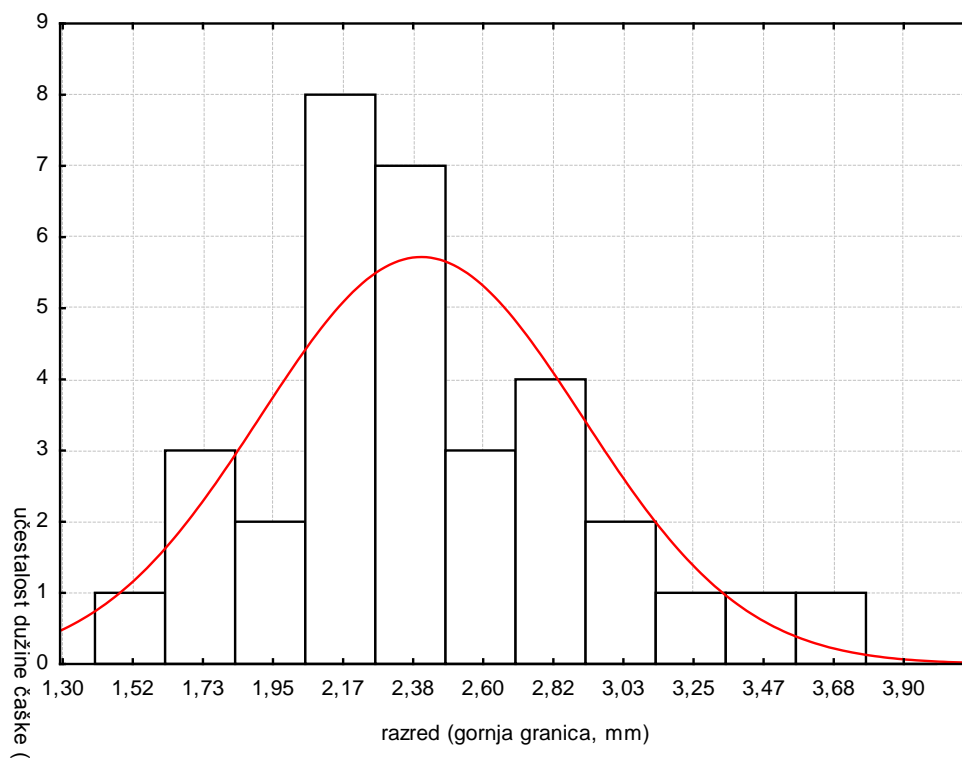
Dužina slobodnog (nesraslog) dijela vjenčića važno je dijagnostičko svojstvo, koje se u ukupnom uzorku kreće od 1,6 do 15 mm, sa srednjom vrijednošću ( $\bar{x}$ ) od 5,49 mm. Koeficijent varijabilnosti (CV=45,63%) ponovo je relativno visok, ukazujući na značajnu varijabilnost uzorka (Prilog 8).

Na *Box & Whisker*-dijagramu (sl. 4.8) ističe se izdvajanje populacija vrste *C. pyramidalis* od svih drugih, dužinama režnjeva između 8 (Karlobag) i 12 mm (Brseč). Režnjeve duže od 6 mm imaju još samo *C. waldsteiniana* sa Zavižana i *C. hercegovina* sa Čvrsnice, dok većina ostalih populacija ima režnjeve vjenčića dužine između 5 i 6 mm, a najkraće *C. cespitosa*, *C. tommasiniana* i dio populacija *C. velebitica*.

Koeficijent spljoštenosti krivulje iznosi 1,367 i ukazuje na veću spljoštenost krivulje od uobičajene, dok koeficijent skošenosti krivulje iznosi 1,179, ukazujući na desnu asimetričnost krivulje. Analiza distribucija učestalosti rezultata temeljem Kolmogorov-Smirnov testa (Tab. 4.3) pokazala je značajno odstupanje od normalne raspodjele (sl. 4.9).



Slika 4.6 Box & Whisker dijagram za dužinu sraslog dijela čaške (SEPLc) po populacijama



Slika 4.7 Razdioba učestalosti dužina čaške (N=410) sa superponiranom krivuljom očekivane normalne razdiobe





## ŠIRINA REŽNJA VJENČICA (PETW)

Deskriptivni pokazatelji procjenjuju prosječnu širinu režnja vjenčića u najširem dijelu (PETW) u ukupnom uzorku na 4 mm, s rasponom izmjerenih vrijednosti između 0,7 i 9,24 mm. Koeficijent varijabilnosti od 40% može se smatrati relativno visokim (Prilog 8). Dijagram širina režnja vjenčića (sl. 4.10) po populacijama pokazuje da najuže režnjeve ima vrsta *C. debarensis* (1,37 mm), a još je samo kod populacije vrste *C. rotundifolia* s.l. s Kuka režanj vjenčića pri bazi uži od 2 mm. Relativno uske režnjeve (uže od 3 mm) ima i vrsta *C. velebitica* s Visibabe, te obje populacije vrste *C. tommasiniana*. Populacije oko *C. justiniana* smjestile su se iznad 5 mm, a *C. velebitica* iznad 3 mm. Najveće vrijednosti, iznad 6 mm, zabilježene su kod populacija vrste *C. pyramidalis*. Uočljive su relativno velike varijabilnosti i standardne pogreške kod velikog broja populacija.

Raspodjela učestalosti ove varijable u uzorku (sl. 4.11) s vrijednosti koeficijenta spljoštenosti od -0,45 vrlo je pravilna (koeficijent skošenosti također je vrlo malen), te Kolmogorov-Smirnov test (Tab. 4.3) pokazuje da je širina režnja vjenčića normalno distribuirano svojstvo.

## DUŽINA VJENČICA (PETL)

Prosječna dužina vjenčića mjerenih zvončića u ukupnom uzorku iznosi 12,72 mm i kreće se od 3 mm (*C. debarensis*) do gotovo 23 mm (*C. pyramidalis* iz Brseča), no koeficijent varijabilnosti za to svojstvo relativno je malen (27%). Zbog najveće varijance među svim mjerenim svojstvima (11,85 mm) i raspon varijabilnosti (SD) je najveći i iznosi 3,44 mm (Prilog 8). Izrazito malene (kratke) vjenčiće, prosječno duge tek 5,5 mm, ima vrsta *C. debarensis*, za kojom slijede populacije vrste *C. waldsteiniana* s cvjetovima dužine između 7,5 i 9 mm, te vrlo malom varijabilnošću toga svojstva i duga izofilna vrsta, *C. reatina*, s vjenčićima dugim oko 9 mm. Samo brsečka populacija vrste *C. pyramidalis* te *C. rotundifolia* s.l. s Čvrstice imaju vjenčiće duže od 18 mm, uz relativno veliku varijabilnost ovoga svojstva (sl. 4.12).

Raspodjela učestalosti rezultata u uzorku (sl. 4.13) s malenim vrijednostima koeficijenta spljoštenosti i skošenosti krivulje vrlo je pravilna, pa Kolmogorov-Smirnov test (Tab. 4.3) dokazuje normalnu distribuciju učestalosti.



## DUŽINA VRATA TUČKA (STYL)

Srednja dužina vratova tučaka u ukupnom uzorku iznosi 11,230 mm, a to svojstvo ujedno ima i najmanji koeficijent varijabilnosti (CV) od svih mjenjenih, manji od 25% (Prilog 8). Prosječno najduži vratovi tučaka, od gotovo 17 mm, zabilježeni su kod populacije vrste *C. pyramidalis* s Brseča, koja ujedno ima i najveći raspon varijabilnosti (SD=3,05 mm, sl. 4.14). Za čitav su centimetar kraći vratovi tučkova zavižanske populacije *C. velebitica* (7 mm), koji se podosta razlikuju i od ostalih populacija iste vrste. Razmjerno kratke vratove (kraće od 9 mm) ima i agregat *C. waldsteiniana* - *C. tommasiniana*, te izofilna vrsta *C. debarensis*. Zanimljivo je primijetiti da se dvije populacije vrste *C. hercegovina* s različitih lokaliteta i nadmorskih visina podosta međusobno razlikuju prema dužini tučaka, baš kao i populacije vrsta *C. rotundifolia* i *C. velebitica*. Populacija vrste *C. justiniana* s Čabranke se razlikuje od ostalih iste vrste, a čini se sličnom populaciji vrste *C. cespitosa* iz Gerova. Jednako su tako slične i populacije različitih primorskih vrsta: *C. justiniana*, *C. marchesettii* (Kuk) i *C. justiniana* (Učka).

Koeficijenti spljoštenosti i skošenosti krivulje distribucije učestalosti su maleni, pa testovi značajnosti odstupanja od normalne distribucije nisu značajni. Raspodjela učestalosti rezultata u uzorku (sl. 4.15) vrlo je pravilna.

## DUŽINA PRAŠNICA (ANTL)

Srednja vrijednost dužine prašnica u uzorku iznosi 4,15 mm, a u ukupnom uzorku se kreće između 1,351 i 9,341 mm. Koeficijent varijabilnosti (CV) za to svojstvo iznosi gotovo 45% (Prilog 8). Na *Box & Whisker*-dijagramu (sl. 4.16) možemo vidjeti izdvajanje nekoliko skupina populacija. Temeljem prikazanih podataka, populacije vrste *C. pyramidalis* jasno se izdvajaju daleko najvećim i prilično ujednačenim (između 7 i 8,2 mm) dužinama prašnica. Mali uzorak vrste *C. rotundifolia* s.l. s Čvrsnice usamljen je između 6 i 7 mm, s relativno velikim rasponom varijabilnosti (SD=1,23 mm). Dok su populacije vrste *C. velebitica* uglavnom «razbijene», populacije vrste *C. waldsteiniana* pokazuju priličnu međusobnu sličnost, pa su tako i zavižanske populacije vrsta *C. velebitica* i *C. waldsteiniana* bliskih dužina prašnica. Dvije populacije vrste *C. tommasiniana* također su sličnih dužina prašnica, s malim standardnim devijacijama i greškama.



Velik dio heterofilnih populacija nalazi se u istom rasponu vrijednosti dužina prašnica: sve populacije *C. justiniana* (osim one s Čabranke, koja je bliža makednonskim vrstama *C. jordanovii* i *C. albanica*), zajedno s vrstama *C. marchesettii* i *C. scheuchzeri*. Dvije populacije vrste *C. hercegovina* ponovno se međusobno razlikuju temeljem mjerenih dužina prašnica. Koeficijent spljoštenosti krivulje iznosi -0,04 i ukazuje na gotovo normalnu spljoštenost krivulje, no koeficijent skošenosti krivulje iznosi 0,926 i ukazuje na značajnu lijevu asimetričnost. Dužina prašnica tako je treće mjereno svojstvo cvijeta zvončića za koje je analiza distribucije učestalosti pojavljivanja rezultata u uzorku temeljem neparametrijskih testova pokazala značajno odstupanje od normalne (sl. 4.17).

#### **DUŽINA PRAŠNIČKIH NITI (FILL)**

Dužina prašničkih niti (filamenata) također se smatra važnim dijagnostičkim svojstvom, a u ukupnom uzorku iznosi prosječno 2,95 mm (Prilog 8).

Koeficijent varijabilnosti za to svojstvo je 44,44%; najmanja izmjerena vrijednost iznosi 0,9, a najveća 6,656 mm. Slično kao i kod svojstva dužine prašnica, prema dužini prašničkih niti (sl. 4.18) formiralo se nekoliko dobro odijeljenih grupa istraživanih populacija. Jasno se izdvajaju populacije vrste *C. pyramidalis*, kojima se priključuje i sjenovita populacija vrste *C. tommasiniana*. Skupinu s prašničkim nitima dugim između 3 i 4 mm čine različite heterofilne populacije (*C. albanica*, *C. cespitosa*, *C. velebitica*). Najveću standardnu grešku ( $SE=0,81$ ) ima populacija vrste *C. velebitica* s Visibabe, no taj je podatak diskutabilan zbog vrlo malog uzorka (samo dva cvijeta).

Neparametrijski testovi normalnosti nisu pokazali značajnije odstupanje od uobičajene distribucije frekvencija (sl. 4.19).





## Rezultati Kruskal-Wallisove univarijatne analize varijanci

Neparametrijska univarijatna analiza varijanci (Kruskal-Wallis ANOVA) provedena je na cjelokupnom uzorku od 33 populacije (410 uzoraka) za svih devet mjerenih varijabli. U Tablici 4.4 prikazani su rezultati zbrojeva raspona mjerenih varijabli. Rezultati su visoko značajni ( $p=0,005$ ) za sve varijable ( $H(n=24) \gg \chi^2 0,005$ ), što govori da se populacije međusobno značajno razlikuju po svim mjerenim osobinama cvjetova.

**Tablica 4.4** Kruskal-Wallis ANOVA po zavisnim varijablama (mjerenim svojstvima cvjetova). Nezavisna varijabla: populacija; Kruskal-Wallis test:  $H(32, N = 410)$ ;  $p = 0,005$ ; Med = Median test;  $\chi^2 = Chi-Square$  test ( $df=32$ ).

Var	SEPLI	SEPLc	SEPW	PETL	PETLI	PETW	STYL	ANTL	FILL
H	298,198	236,595	308,309	287,280	324,080	295,082	328,301	352,346	324,774
Med	3,360	2,197	0,630	12,888	5,089	4,073	11,091	3,503	2,645
$\chi^2$	263,139	166,289	224,278	193,249	231,534	237,495	291,605	315,232	267,915

## MULTIVARIJATNA OBRADA MORFOMETRIJSKIH PODATAKA

### Diskriminantna analiza

Kako su rezultati univarijatne neparametrijske analize (Kruskal-Wallis) nedvojbeno ukazali na postojanje razlikovnih (diskriminantnih) varijabli, u svrhu utvrđivanja njihovog značaja u determinaciji vrsta provedena je diskriminantna analiza. Kao prirodna skupina (zavisna ili grupirajuća varijabla) uzete su vrste zvončića određene uporabom standardnih determinacijskih ključeva. Rezultati su prikazani u Tablici 4.5, gdje je vidljivo da je Wilks' Lambda uvijek  $<1$  ( $1$ =nema razlikovnog značenja,  $0$ =savršeno razlikovanje), tj. sve izmjerene varijable cvijeta imaju stanoviti razlikovni potencijal.

**Tablica 4.5** Cjelovita tablica rezultata diskriminantne analize: broj varijabli u modelu = 9; zavisna varijabla = svojta (14 vrsta); Wilks' Lambda: 0,00194; approx.  $F(117,2913) = 32,516$ ;  $p < 0,0000$

var	Wilks'	Partial	F	p-level	Toler.	1-Toler.
FILL	0,005058	0,383986	<b>47,88096</b>	0,000000	0,848748	0,151252
PETLI	0,005020	0,386888	<b>47,29809</b>	0,000000	0,405521	0,594479
ANTL	0,004130	0,470193	<b>33,63024</b>	0,000000	0,633454	0,366546
PETL	0,004117	0,471762	<b>33,41916</b>	0,000000	0,317709	0,682291
STYL	0,002929	0,662973	15,17251	0,000000	0,418417	0,581583
SEPLI	0,002655	0,731418	10,95975	0,000000	0,695678	0,304322
PETW	0,002574	0,754437	9,71465	0,000000	0,546401	0,453599
SEPW	0,002534	0,766317	9,10136	0,000000	0,659360	0,340640
SEPLc	0,002322	0,836274	5,84331	0,000000	0,803752	0,196249

Parcijalni Wilks' Lambda koeficijent (jedinstveni doprinos svake pojedine varijable, Tab. 4.5, stupac 2) je jednak samom Wilks' Lambda koeficijentu. Najveća  $F$ -vrijednost dobivena je za dužinu prašnica (ANTL), te *forward stepwise* analiza započinje s tom varijablom. U daljnjih devet koraka (koliko je i mjerenih svojstava cvijeta) varijable su uključivane redom, prema svojoj za svaki korak nanovo računatoj  $F$  (tj. parcijalnoj Wilks' Lambda) vrijednosti (nakon ANTL slijedi FILL, pa PETLI, i td.). Kao što se vidi, vrijednost parcijalnog Wilks' Lambda koeficijenta (odnosno  $F$ -vrijednosti) ukazuje da ukupnom razlikovanju mjerenih vrsta roda *Campanula* u najvećoj mjeri doprinose dužina prašničkih niti (FILL) i dužina slobodnih režnjeva vjenčića vjenčića (PETLI), te dalje redom dužine prašnica (ANTL), ukupna dužina vjenčića (PETL), dužina vrata tučka (STYL), dužina zubaca čaške (SEPLI), širina baze režnjeva vjenčića (PETW), i širina baze zubaca čaške (SEPW). Najslabije razlikovno svojstvo je dužina sinsepalnog dijela čaške (SEPLc).

### Kanonička i korelacijska analiza

Tijekom kanoničke i korelacijske analize izračunato je osam (9-1) nezavisnih, ortogonalnih diskriminacijskih funkcija.

Najprije je računato jesu li diskriminantne funkcije (roots, osi) statistički značajne (Tab. 4.6). Prvi redak Tablice 4.6 sadrži test značajnosti za sve kanoničke osi, drugi statističku značajnost nakon uklanjanja prve osi, treći nakon uklanjanja druge osi, itd.

Osi 1-6 imaju  $\alpha \leq 0,05$ , što znači da možemo doći do najmanje šest tumačenja kako pojedine mjerene osobine razlikuju pojedine vrste.

**Tablica 4.6** *Chi-Square* testovi s uklanjanjem sukcesivnih diskriminantnih funkcija.

	Eigen-values	Canonical	Wilks'	Chi-Sqr.	df	p-level
0	10,30235	0,954737	0,001942	2481,987	117	0,000000
1	3,93298	0,892907	0,021950	1518,046	96	0,000000
2	2,18089	0,828023	0,108280	883,658	77	0,000000
3	0,53458	0,590218	0,344425	423,687	60	0,000000
4	0,45690	0,560010	0,528549	253,454	45	0,000000
5	0,18251	0,392863	0,770043	103,870	32	0,000000
6	0,06909	0,254206	0,910583	37,234	21	0,015823
7	0,01987	0,139576	0,973491	10,680	12	0,556562
8	0,00722	0,084660	0,992833	2,859	5	0,721668

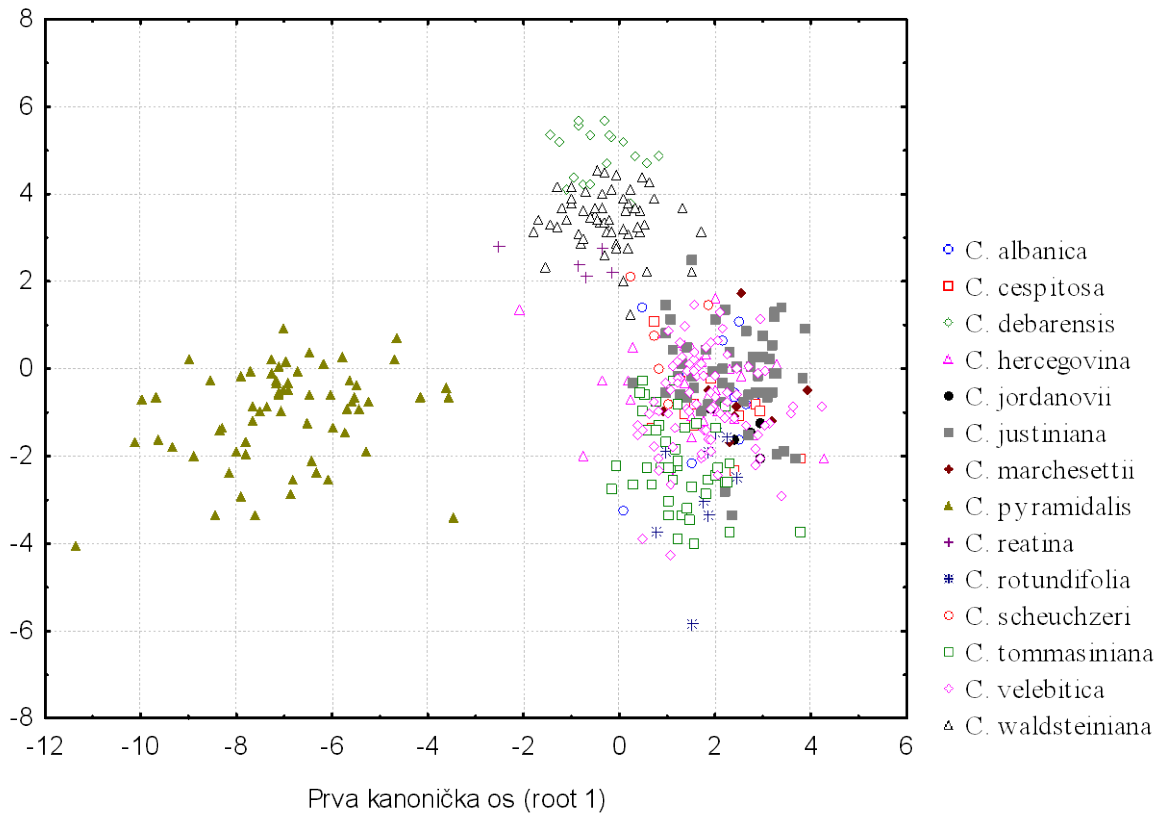
Za potrebe razumijevanja doprinosa svake značajke cvijeta u diskriminaciji duž kanoničkih osi, izračunati su koeficijenti svih kanoničkih osi i svih varijabli. Matrica je standardizirana kako bi skale različitih mjernih svojstava bile usporedive, što je prikazano u Prilogu 9. Utjecaj prve i druge kanoničke osi u najvećoj su mjeri uvjetovani istim dvjema varijablama: dužinom simpetalnog vjenčića (PETL) i dužinom zubaca vjenčića (PETLI). Utjecaj treće kanoničke osi u najvećoj je mjeri uvjetovan dužinom vrata tučka (STYL) i prašničkih niti (FILL).

Nakon što je utvrđeno koja svojstva cvijeta i u kojoj mjeri doprinose razlikovanju vrsta duž pojedinih kanoničkih osi, u idućem je koraku bilo ustanoviti prirodu te diskriminacije za svaku os izračunom kanoničkih srednjih vrijednosti (*canonical means*) po pojedinim *a priori* determiniranim vrstama, kao što se vidi u u Prilogu 10. Ista tablica sadrži i *eigen*-vrijednost, te kumulativni udio rastumačene varijabilnosti za svaku os. Može se vidjeti da prva os sadrži 58% objašnjene varijabilnost, zajedno s drugom 80%, a prve tri osi sadrže ukupno 92% objašnjene varijabilnosti. Očito je, nadalje, da značenje osi opada prema ostalima (4 do 9). Prva diskriminacijska os (*root 1*) u daleko najvećoj mjeri razlikuje vrstu *C. pyramidalis* (Sl. 4.20 i 4.21), a potom u manjoj mjeri vrste *C. jordanovii*, *C. marchesettii* te *C. justiniana*. Druga diskriminacijska funkcija (*root 2*) u najvećoj mjeri razlikuje vrste *C. debarensis* i *C. waldsteiniana*, a potom *C. rotundifolia*, iako sukladno *eigen*-vrijednostima i kumulativnoj varijabilnosti te osi znatno manje nego što je to slučaj za prvu os (Sl.

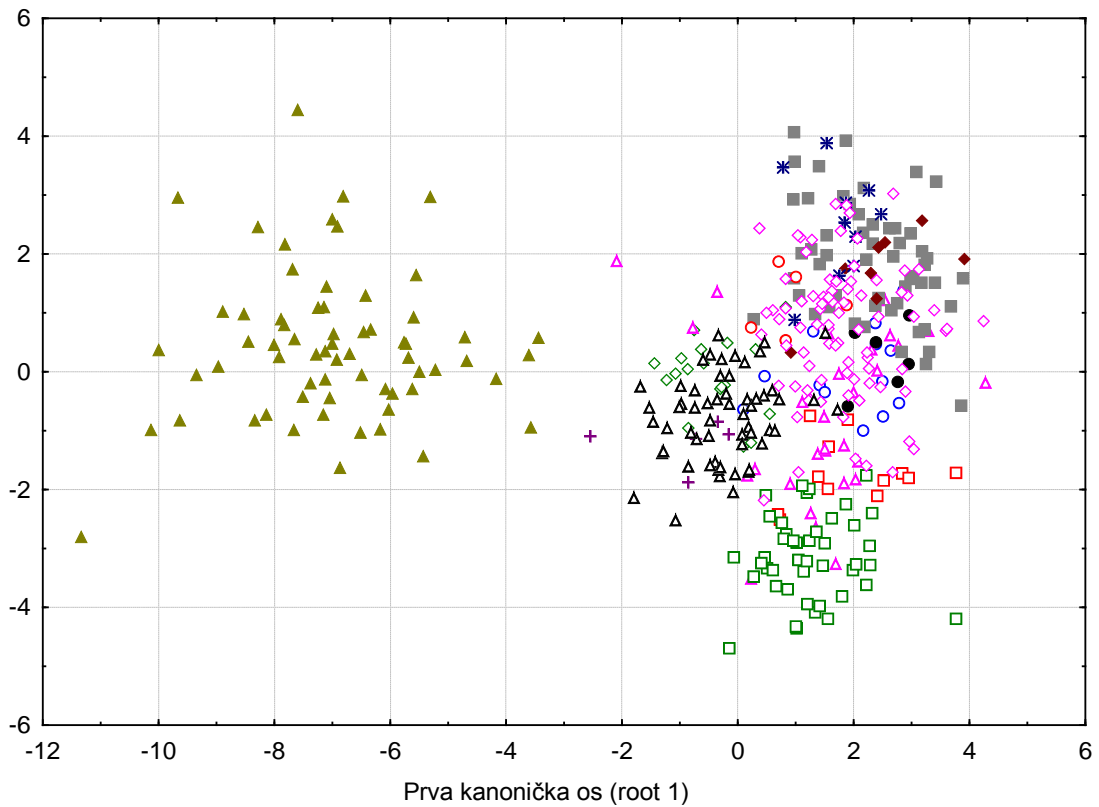
4.20). Treća diskriminacijska os (*root 3*) u najvećoj mjeri razlikuje vrste *C. tommasiniana* i *C. rotundifolia* (Sl. 4.21). Vrsta *Campanula pyramidalis* razlikuje se duž prve kanoničke osi od svih ostalih vrsta u analizi, prvenstveno pozitivnim koeficijentom za dužinu čitavog vjenčića (PETL) i negativnim koeficijentom za dužinu režnjeva vjenčića (PETLI), te u manjoj mjeri negativnim koeficijentom za dužinu prašničkih niti (FILL). Drugim riječima, što je vjenčić kraći, a duži njegovi režnjevi i prašničke niti, to je manje vjerojatno da primjerak pripada vrsti *C. pyramidalis* (odnosno u manjoj mjeri i vrstama *C. jordanovii*, *C. marchesettii* i *C. justiniana*).

Druga kanonička os u najvećoj mjeri doprinosi razlikovanju vrsta *C. debarensis* i *C. waldsteiniana* od svih ostalih (Prilog 10), negativnim koeficijentom za dužinu čitavog vjenčića (PETL) i pozitivnim koeficijentom za dužinu režnjeva vjenčića (PETLI), te u manjoj mjeri negativnim koeficijentom za dužinu prašnica (ANTL). Drugim riječima, što je vjenčić duži, a kraći njegovi režnjevi i prašničke niti, manje je vjerojatno da primjerak pripada vrstama *C. debarensis* i *C. waldsteiniana*. Duž treće kanoničke osi najviše se razlikuju vrste vrste *C. tommasiniana* i *C. rotundifolia* pozitivnim koeficijentom za dužinu vrata tučka (STLY), te negativnim koeficijentima za dužinu vjenčića (PETL) i filamanata (FILL) (Prilog 9). Diskriminacijska snaga, međutim, znatno je manja nego za prve dvije osi.

Sukladno *eigen*-vrijednostima i kumulativnoj varijabilnosti pojedinih osi manjoj od 3% (Prilog 9), četvrta kanonička os doprinosi vrlo malo razlikovanju svojiti: u najvećoj mjeri vrste *C. scheuchzeri*, *C. justiniana* i *C. debarensis*, poglavito na temelju pozitivnog koeficijenta za širinu baze režnja vjenčića (PETW), te negativnih koeficijenata za dužinu sraslog dijela čaške (SEPL) i dužine zubaca čaške (SEPLI). Na temelju rezultata diskriminacijske analize izračunata je udaljenost svakog mjenog primjerka do centroida svake vrste primjenom Mahalanobisovog koeficijenta udaljenosti (Prilog 11). Konkretno vjerojatnosti pripadnosti mjerenih jedinki pojedinoj vrsti nalaze se u Prilogu 12. U koloni "Vrsta" označena je *a priori* determinacija, a u kolonama koje slijede vjerojatnosti pripadanja toj ili nekoj drugoj vrsti. Nepodudaranje *a priori* determinacije s *a posteriori* svrstavanjem primjerka nekom centroidu označen je zvjezdicom (\*).



**Slika 4.20** Scatter grafikon primjeraka prvih dviju kanoničkih osi (*root 1, 2*).



**Slika 4.21** Scatter grafikon primjeraka prve i treće kanoničke osi (*root 1, 3*). Legenda kao na Slici 4.20.

Pregled pripadnosti pojedinoj unaprijed određenoj vrsti bez brožanih pokazatelja vjerojatnosti dana je u Prilogu 13. U koloni "Vrsta" označena je originalna determinacija, a u kolonama koje slijede vjerojatnost pripadanja toj ili nekoj drugoj vrsti, počevši od najvjerojatnije klasifikacije (stupac 1) ka najmanje vjerojatnoj (stupci>1). Nepodudaranje determinacije primjerka upotrebom ključeva i drugih saznanja s *a posteriori* svrstavanjem istog primjerka nekome centroidu označeno je zvjezdicom (\*). Kao što se vidi, *a priori* determinacije heterofilnih vrsta najčešće su pronalazene «netočnima», dok su izofiloidne vrste najvećim dijelom «točno» determinirane.

### **Analiza glavnih komponenta (PCA)**

Rezultati analize glavnih komponenta pokazuju da kumulativna varijabilnost sadržana u prve tri PC-osi iznosi 77%, s očekivanim najvećim udjelom prve PC-osi od 53% (drugim riječima, više od pola ukupne varijabilnosti uzroka nosi prva PC-os, Tab. 4.7). Druga i treća PC-os doprinose ukupnoj varijabilnosti mnogo manje, 14% odnosno 10%, dok preostalih šest osi doprinosi tek oko 27%, pa se mogu zanemariti. Doprinos svakog pojedinog mjenog svojstva (varijable) svakoj od izračunatih PC-osi prikazan je u Tablici 4.8.

Distribuciji objekata duž prve PC-osi u najvećoj mjeri doprinose dužina prašnica (ANTL) i vrata tučka (STYL), te manje širina reznja vjenčića (PETW). Distribuciji objekata duž druge PC-osi najviše doprinosi dužina zubaca čaške (SEPLI) i dužina vjenčića (PETL), a (manje) dužina sraslog dijela čaške (SEPLc). I na kraju, distribuciji objekata duž treće PC-osi najviše doprinosi dužina prašničke niti (FILL), a mnogo manje dužina sraslog dijela čaške (SEPLc) i ukupna dužina vjenčića (PETL). Dva mjerena svojstva, širina zubaca čaške u najširem dijelu (SEPW) i dužina slobodnih reznjeva latica (PETLI) nemaju značajnijeg utjecaja na raspodjelu objekata u 3D-prostoru prve tri PC-osi.

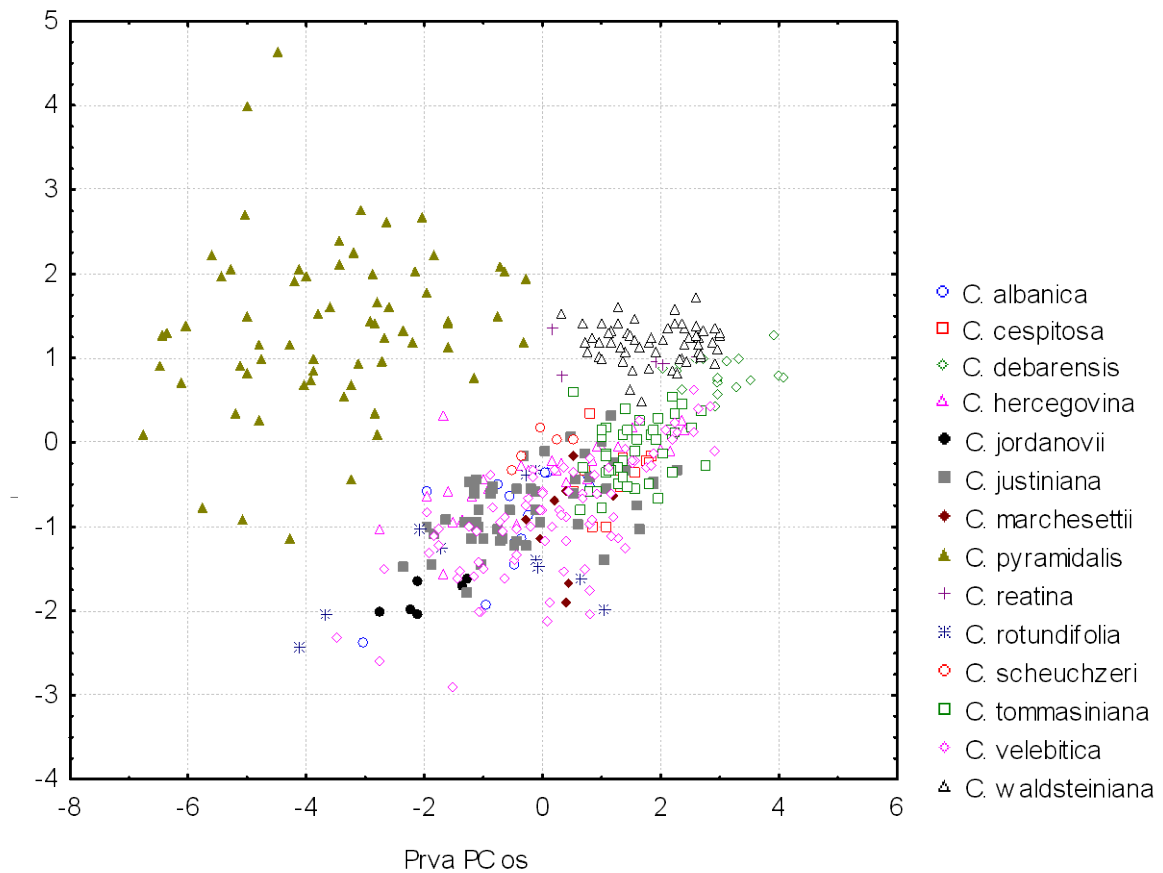
**Tablica 4.7** Eigen-vrijednosti i kumulativna varijabilnost sadržana u prvih devet PC-osi (masno otisnute vrijednosti označavaju kumulativne varijabilnosti prvih triju osi).

PC-osi	<i>Eigenvalue</i>	<i>% Total</i>	<i>Cumulative</i>	<i>Cumulative</i>
<b>1</b>	4,765339	<b>52,94821</b>	4,765339	<b>52,9482</b>
<b>2</b>	1,275914	<b>14,17683</b>	6,041253	<b>67,1250</b>
<b>3</b>	0,899085	<b>9,98983</b>	6,940338	<b>77,1149</b>
<b>4</b>	0,632248	7,02498	7,572586	84,1398
<b>5</b>	0,526145	5,84606	8,098731	89,9859
<b>6</b>	0,354562	3,93958	8,453293	93,9255
<b>7</b>	0,206326	2,29251	8,659619	96,2180
<b>8</b>	0,200171	2,22413	8,859791	98,4421
<b>9</b>	0,140209	1,55788	9,000000	100,0000

**Tablica 4.8** Faktor-kordinate mjerenih varijabli utemeljene na korelacijama. Masno su označene po tri osobine za prve tri PC-osi čije je doprinos distribuciji najznačajniji.

varijabla	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8	Factor 9
SEPLI	-0,546580	<b>-0,589373</b>	0,235756	-0,494520	-0,118012	0,054734	-0,135931	0,135047	0,011020
SEPLc	-0,623561	<b>-0,379919</b>	<b>-0,354336</b>	-0,061438	0,573071	-0,065985	0,057902	-0,037145	-0,002875
SEPW	-0,708348	0,448442	0,091823	-0,453455	-0,061073	-0,047909	0,194721	-0,186178	-0,066984
PETL	-0,762139	<b>-0,448165</b>	<b>-0,030589</b>	0,215941	-0,277184	-0,141746	0,077114	-0,180479	0,187843
PETLI	-0,755652	0,513430	0,156366	0,009913	0,175355	0,022428	-0,284537	-0,068907	0,154498
PETW	<b>-0,777656</b>	0,091911	0,402630	0,214609	0,051210	-0,364929	0,045107	0,178604	-0,094368
STYL	<b>-0,865036</b>	-0,178731	0,057590	0,263777	-0,068330	0,244084	-0,100171	-0,135253	-0,233022
ANTL	<b>-0,865491</b>	0,182080	-0,025744	0,111382	-0,007753	0,334048	0,192369	0,213606	0,102089
FILL	-0,567475	0,212386	<b>-0,719752</b>	-0,059434	-0,255238	-0,141363	-0,102944	0,112919	-0,053025

Scatter graf na Slici 4.22 sadrži prikaz disperzije svih 410 mjerenih cvjetova na 2D-prikazu obzirom na prvu i drugu PC-os, koje zajedno nose 67% ukupne varijabilnosti. Uočljivo je izdvajanje uzoraka vrste *C. pyramidalis* od ostalih uglavnom duž prve PC-osi, tj. temeljem dužine prašnica (ANTL) i vrata tučka (STYL), te širine režnjeva vjenčića (PETW). Ostatak uzorka sastoji od dvije međusobno nešto slabije izolirane skupine biljaka, koje se odvajaju uglavnom na temelju dužine sraslog dijela čaške (SEPLc), te dužine slobodnih režnjeva vjenčića (PETLI) i zubaca čaške (SEPLI). Prvu podskupinu čine gotovo isključivo uzorci cvjetova prethodno određenih kao *C. waldsteiniana*, dok se u drugoj podskupini ne mogu jasno razdvojiti pripadnici ostalih analiziranih svojiti.



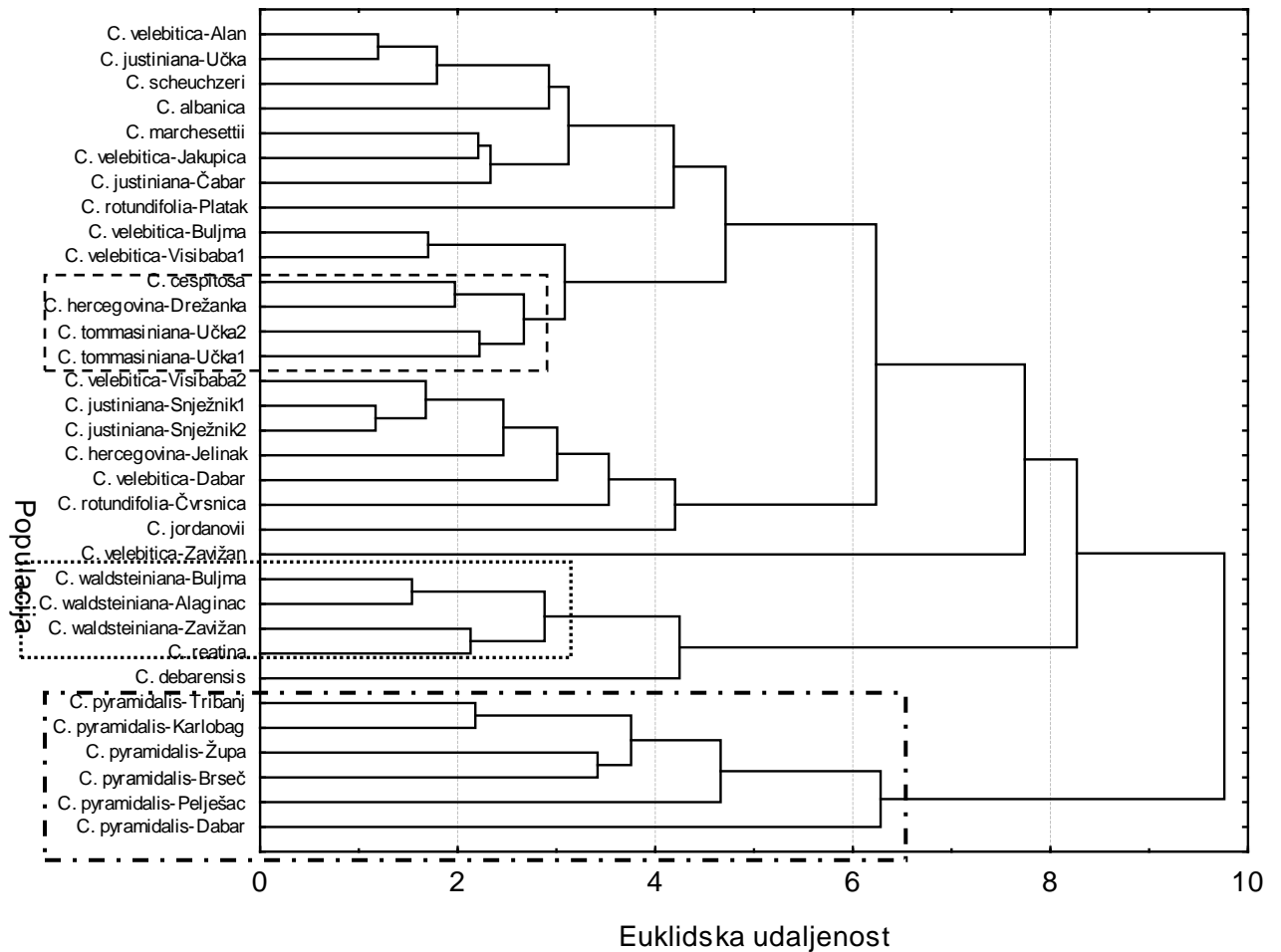
**Slika 4.22** 2D-scatter graf s *a-priori* determiniranim vrstama uzorka u koordinatnom sustavu prvih dviju PC-osi.

Kao što se jasno vidi, uzorci originalno određeni kao pripadnici agregata *Rotundifolia* ne mogu se temeljem karakteristika cvijeta jasno razdvojiti prema vrstama, odnosno, bit će potrebni i drugi faktori u točnom određivanju vrsta te skupine. Tek su nešto kompaktnije raspoređeni primjerci vrsta *C. justiniana*, *C. jordanovii* i *C. scheuchzeri*, dok su uzorci *a priori* određeni kao *C. albanica* i *C. velebitica* raspršeni «oblakom» skupine *Rotundifolia*. Pripadnici agregata *Pyramidalis* i *Waldsteiniana* puno se bolje razdvajaju, s tim da *C. tommasiniana* ima donekle intermedijarni položaj prema agregatu *Rotundifolia*. Izofilna vrsta *C. debarensis* kompaktnijeg je «oblaka», ali nejasno izdvojena od *Rotundifolia*, dok se *C. reatina* (mjereno mali broj uzoraka), ni po čemu ne ističe obzirom na varijable koje opisuju prve dvije PC-osi.

## Metode grupiranja podataka (*Cluster analiza*)

Primjenom UPGMA aglomerativne hijerarhijske metode dobiven je dendrogram (Sl. 4.23) za 33 istraživane populacije roda *Campanula* prema mjerenim karakteristikama cvijeta. Topologija dendrograma jasno ukazuje na postojanje dviju glavnih skupina istraživanih vrsta roda *Campanula* s obzirom na mjerene varijable cvijeta, kao što je to već prikazano i rezultatima prethodnih analiza. Skupina sastavljena isključivo od populacija vrste *C. pyramidalis* sasvim je odvojena od svih ostalih vrsta i populacija već na Euklidskoj udaljenosti od  $D=9,76$ . Međusobno se najviše razlikuju populacije s poluotoka (Istra i Pelješac,  $D=6,28$ ), dok su najbližije one geografski najbliže (s primorskih obala Tribnja i Karlobaga,  $D=2,18$ ). U drugoj velikoj skupini mogu se prepoznati četiri veće podskupine populacija. Prva se odvaja (na  $D=8,27$ ) podskupina građena od izofilnih vrsta *C. debarensis* i *C. reatina*, koja je nešto sličnija klasteru triju blisko povezanih populacija *C. waldsteiniana*. U sljedećem se stupnju (na  $D=7,74$ ), odvajaju vrste grupe *Rotundifolia*: sasvim odvojena od ostatka vrsta je populacija *C. velebitica* sa Zavižana, a slijedi niz slabije povezanih populacija: *C. jordanovii*, *C. velebitica* s Dabra, te hercegovačke populacije *C. rotundifolia* s.l. i *C. hercegovina* s Jelinka. Mali zasebni klaster unutar ovog većeg čine dvije populacije *C. justiniana* sa sunčanih staništa različitih ekspozicija Snježnika (zapravo ista populacija, s najmanjom izmjerenom Euklidskom udaljenošću od  $D=1,17$ ), kojima se priključuje i uzorak *C. velebitica* sa sunčanog staništa Visibabe.

Treću skupinu vrsta formiraju obje populacije *C. tommasiniana*, koje se građom cvijeta čine najbližijima klasteru vrsta *C. cespitosa* i *C. hercegovina* iz doline Drežanke (vezane na  $D=1,97$ ), a toj se skupini priključuju i dvije populacije *C. velebitica*, s travnatih staništa Buljme i Visibabe. Posljednji veći klaster (odvaja se na  $D=4,71$ ) vrlo je heterogen, građen od različitih, srodnih vrsta grupe *Rotundifolia*. Formiraju ga *C. rotundifolia* s.l. s Kuka iznad Platka, sjenovita populacija *C. justiniana* s izvora Čabranke, te makedonska *C. velebitica* i *C. marchesettii* s Kuka. Makedonska *C. albanica* također se malo izdvaja od ostalih srodnih vrsta: *C. scheuchzeri*, *C. justiniana* s Učke te *C. velebitica* s Malog Alana (vezane na vrlo maloj  $D=1,19$ ).



**Slika 4.23** Dendrogram za 33 populacije roda *Campanula* dobiven UPMGA metodom.

Zanimljivo je primijetiti da samo nekoliko *a priori* determiniranih populacija istih vrsta agregata *Rotundifolia* generira zajedničke skupine (nekoliko populacija *C. velebitica* i *C. justiniana*), ističući veliki polimorfizam unutar skupine. Kao što se i ovdje vidi, za sigurnu determinaciju vrsta agregata *Rotundifolia* očigledno nisu dovoljne samo morfološke karakteristike cvijeta, već i drugi parametri.

## 4.2 Analiza materijala za molekularna istraživanja

### RAZNOLIKOST RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTATA KLOROPLASTNE *trnT-trnF* REGIJE

#### Izolacija ukupne stanične DNA

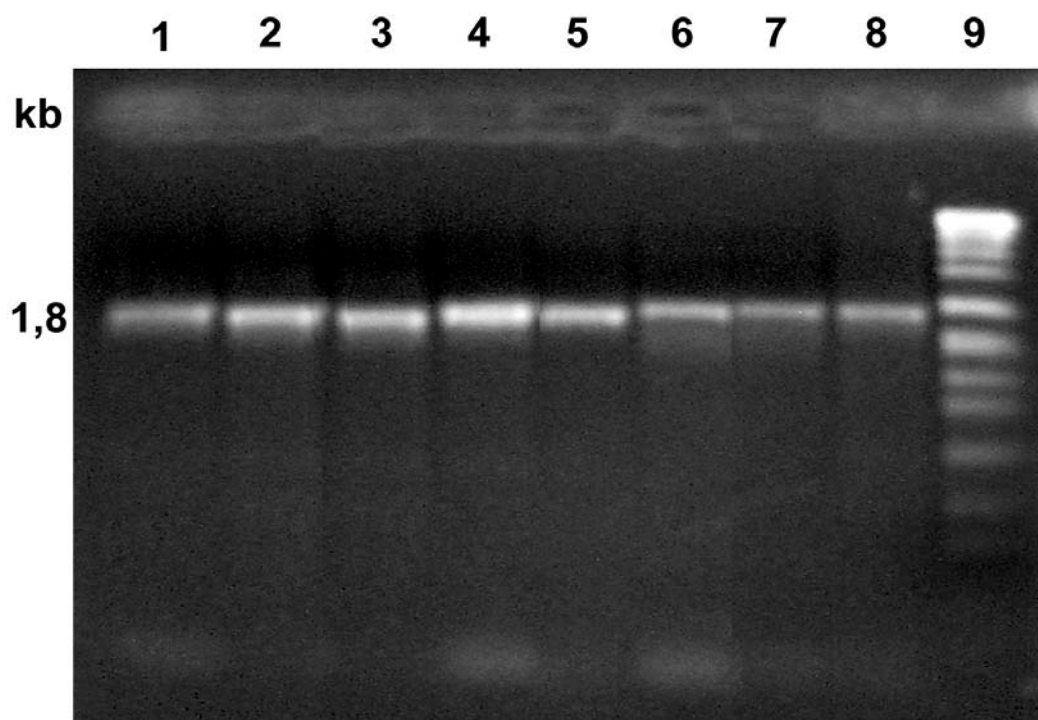
Rezultati izolacije ukupne stanične DNA svih istraživanih svojti roda *Campanula* upotrebom DNeasy® Plant Mini DNA izolacijskog kompleta (Qiagen) prikazani su na Slici 4.24. Iz prikazane fotografije vidljivo je kako je izolirana ukupna stanična DNA visoko polimerna, bez vidljive degradacije te bez prisutnosti polisaharida i RNA molekula. Usporedbom s DNA koncentracijskim standardima bakteriofaga  $\lambda$  određena je veličina izoliranih DNA fragmenata od 23 kb i prosječna koncentracija od 200 ng/ $\mu$ l.



**Slika 4.24** Ukupne stanične DNA 26 svojti roda *Campanula* te kontrolne vrste *Edraianthus tenuifolius*. Pruga: 1. = *C. rotundifolia* I, 2. *C. carpatica*, 3. *C. garganica*, 4. *C. isophylla*, 5. *C. cochleariifolia*, 6. *C. fenestrellata*, 7. *C. hercegovina*, 8. *C. scheuchzeri*, 9. *C. witasekiana*, 10. *Edraianthus tenuifolius*, 11. *C. rotundifolia* II, 12. *C. fenestrellata* ssp. *istriaca*, 13. *C. pyramidalis*, 14. *C. tommasiniana*, 15. *C. velebitica*, 16. *C. justiniana*, 17. *C. poscharskyana*, 18. *C. portenschlagiana*, 19. *C. waldsteiniana*, 20. *C. versicolor*, 21. *C. reatina*, 22. *C. romanica*, 23. *C. xylocarpa*, 24. *C. gentilis*, 25. *C. tatrae*, 26. *C. moravica*, 27.  $\lambda$  DNA 50 ng/ $\mu$ l, 28.  $\lambda$  DNA 100 ng/ $\mu$ l, 29.  $\lambda$  DNA 250 ng/ $\mu$ l.

### Umnožavanje kloroplastne *trnT-trnF* regije lančanom reakcijom polimerazom

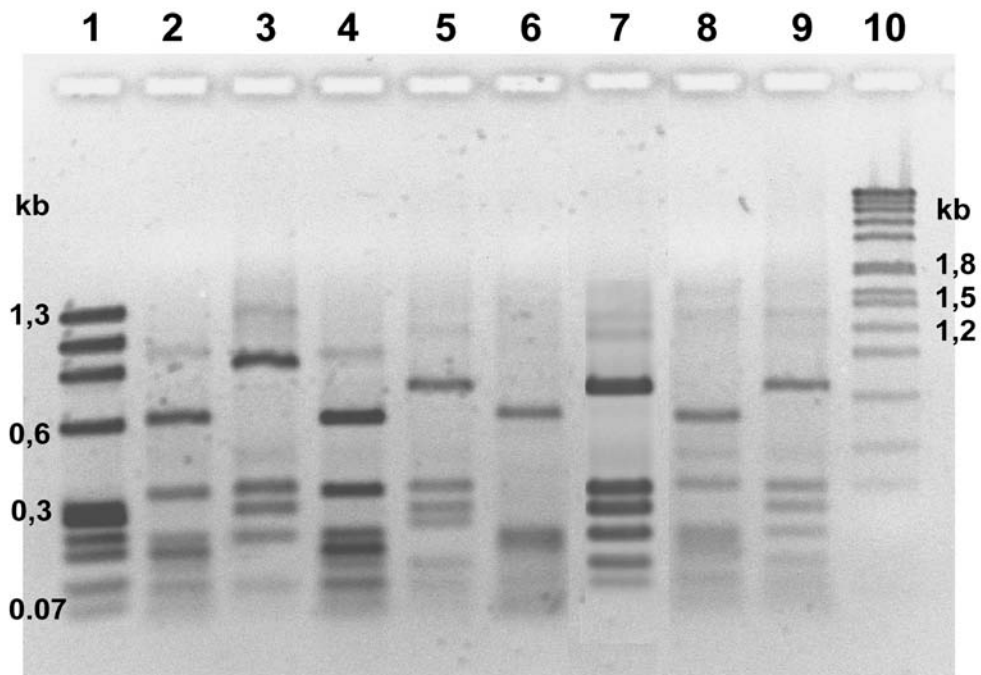
Umnožavanjem *trnT-trnF* lančanom reakcijom polimerazom dobiveni su fragmenti DNA veličine 1,8 kb. Na Slici 4.25 prikazan je rezultat umnožavanja *trnT-trnF* kloroplastne regije osam od ukupno 26 istraživanih svojti zvončića.



**Slika 4.25** *trnT-trnF* kloroplastne regije osam vrsta roda *Campanula* umnožene lančanom reakcijom polimerazom. Pruga 1. = *C. rotundifolia* s.l., 2. *C. carpatica*, 3. *C. hercegovina*, 4. *C. pyramidalis*, 5. *C. fenestrellata* s.s., 6. *C. tommasiniana*, 7. *C. portenschlagiana*, 8. *C. waldsteiniana*, 9. DNA veličinski standard VII (Roche).

### Restrikcija *trnT-trnF* kloroplastne regije

Restrikcijom *trnT-trnF* kloroplastnih regija 25 svojti zvončića i vrste *Edraianthus tenuifolius* dobiveno je ukupno 73 polimorfna fragmenta (tablica u Prilogu 14). Najveći broj polimorfni fragmenata dala je restrikcija s restriksijskim enzimom *AluI* (14), a najmanji broj s restriksijskim enzimom *RsaI* (pet). Na Slici 4.26 prikazan je tipičan restriksijski profil nakon elektroforeze u 1,4% gelu agaroze osam od ukupno 26 istraživanih svojti.



**Slika 4.26.** Restrikcija kloroplastnih *trnT-trnF* regija osam vrsta roda *Campanula* upotrebom restriksijskog enzima *Hinfl*. Pruga 1. = DNA veličinski standard IX (Roche) 2. *C. rotundifolia* s.l., 3. *C. carpatica*, 4. *C. hercegovina*, 5. *C. pyramidalis*, 6. *C. fenestrellata* s.s., 7. *C. tommasiniana*, 8. *C. portenschlagiana*, 9. *C. waldsteiniana*, 10. DNA veličinski standard VII (Roche).

## FILOGENETIČKA OBRADA MOLEKULARNIH PODATAKA

### **Analiza parsimonije**

Nakon što su su dobiveni restriksijski fragmenti prevedeni u binarnu matricu (1=fragment prisutan, 0=fragment odsutan) izlazna matrica podataka sadržavala je ukupno 26 svojti i 73 binarne karakteristike (Prilog 14). Wagnerova analiza parsimonije tog seta podataka sadrži 14 konstantnih i 20 varijabilnih karakteristika, neinformativnih za potrebe parsimonije. Ukupno 39 informativnih karakteristika rezultiralo je s 23 jednako parsimonična kladograma (*equally parsimonious trees*) s dužinom od 89 koraka, indeksom konzistencije (CI) 0,6629 (CI bez neinformativnih karakteristika=0,5652), indeksom homoplazije (HI) 0,3371 (HI bez neinformativnih karakteristika=0,4348) i indeksom retencije (RI) 0,8636. Kladogram (*50%-majority-rule consensus tree*) generiran iz 23 «najparsimoničnijih» dendrograma (*most parsimonious trees*) prikazan je na Slici 4.27. Očito je grupiranje uključenih svojti u

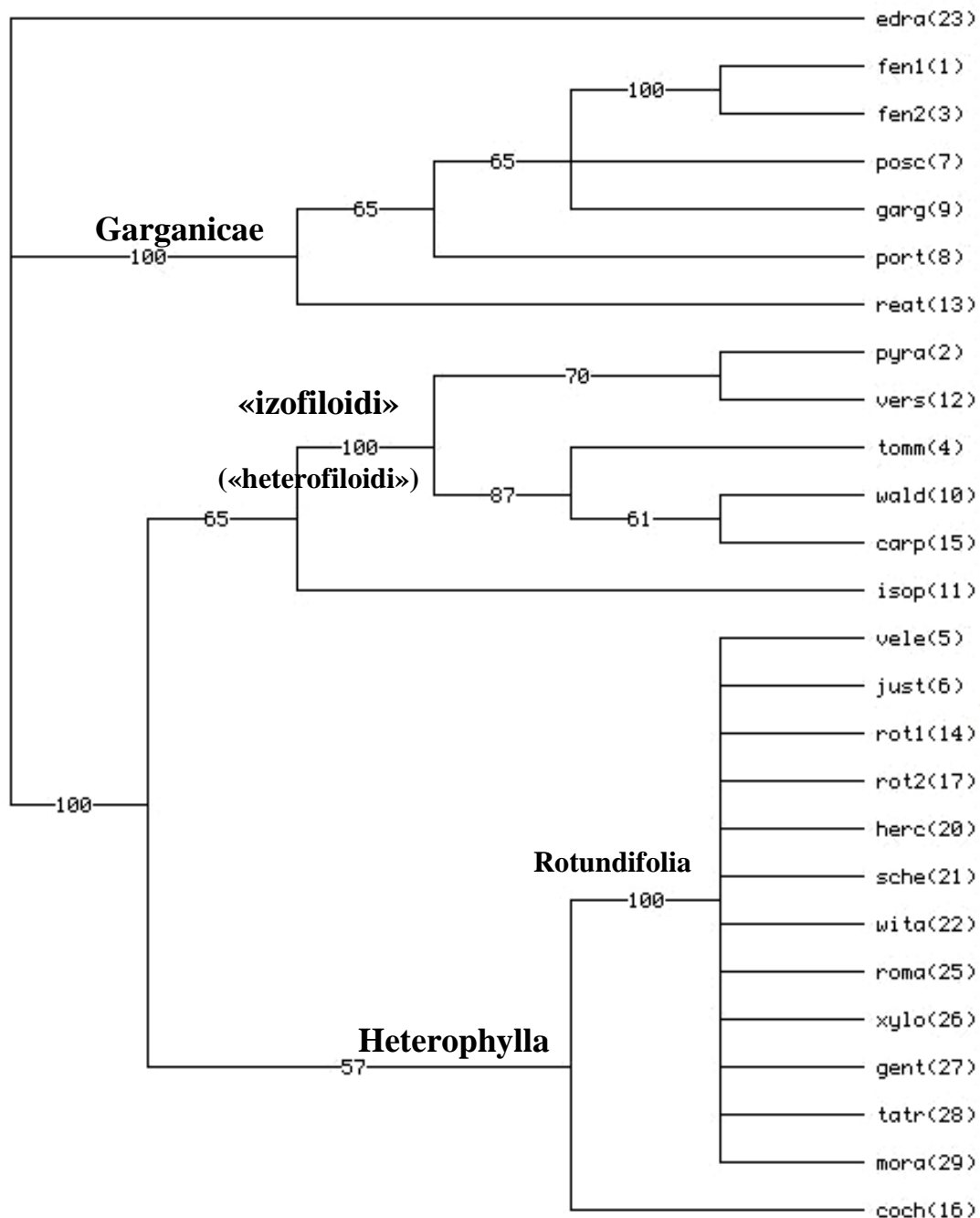
dvije osnovne skupine (kladusa). Prva grupa (*bootstrap*-vrijednost [BS] od 100%) obuhvaća obje podvrste *C. fenestrellata*, zatim vrste *C. portenschlagiana*, *C. poscharskyana*, *C. garganica* i, kao najudaljeniju, vrstu *C. reatina*. Dobiveni rezultati sasvim podržavaju teoriju o bliskoj srodnosti među izofilnim vrstama serije Garganicae. Neočekivano, tipična izofilna vrsta nekadašnje Damboldtove grupe *Isophylla*, *C. isophylla*, sasvim je razdvojena od glavne jezgre jednakolisnih zvončića.

Druga skupina vrsta jasno je podijeljena u dvije podskupine. Prva podskupina sastavljena je od "izofiloidnih" svojti, članova agregata *Pyramidalis* i *Waldsteiniana*, s pridruženim paleoendemom *C. carpatica*. Kako se mala skupina izofiloidnih svojti čini nedvojbeno zajedničkog postanka (monofiletička) s heterofilnom podgrupom vrsta (BS 100%), izgleda da bi joj bolje pristajao radni naziv «heterofiloidna». Vrsta *C. isophylla* čini se bliskijom toj «heterofiloidnoj» skupini (mada je ta teorija poduprta vrlo malenim BS, od samo 65%), nego «pravim» jednakolisnim vrstama.

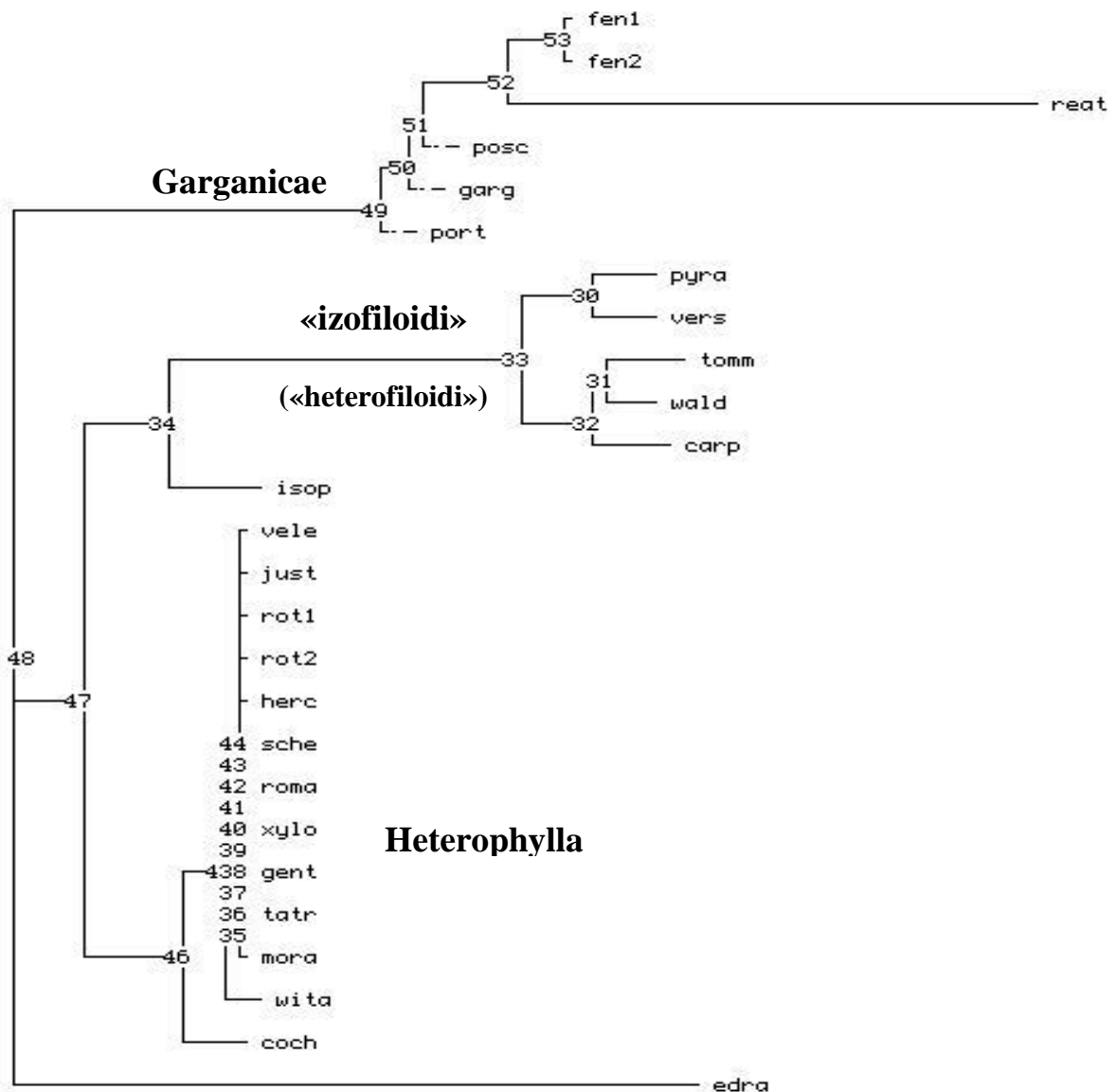
Druga podskupina druge skupine vrsta pokazuje veliku međusobnu srodnost (BS 100%) glavne jezgre svojti kompleksa vrste *C. rotundifolia* s.l.: zapravo, sličnost između tih svojti prevelika je da bi se jasno razlučila korištenjem RFLP analize cpDNK. Ono što je ovdje najuočljivije i najzanimljivije je to da, usprkos velikoj morfološkoj sličnosti s grupom *Rotundifolia* vrsta *C. cochleariifolia* doista ne pripada tome srodstvenom krugu, nego je vrlo «labavo» vezana s heterofilnim vrstama (BS od samo 57%).

### **Metoda najbližeg susjeda**

Opća topologija filograma dobivenog NJ-metodom (Sl. 4.28) veoma je slična onoj «50%-majority-rule consensus» stabla (Sl. 4.27). Ponovo se jasno razlučuju iste dvije temeljne skupine vrsta, izofilna i heterofilna/heterofiloidna. Skupina sastavljena od jednakolisnih zvončića ponovno odgovara seriji Garganicae; vrsta *C. reatina* se ovaj put čini nešto srodnijom s linijom *C. fenestrellata*, ali je još uvijek prilično udaljena. Vrsta *C. isophylla* ponovo je sasvim odvojena od izofilnih vrsta i priključena «heterofiloidnim» svojutama druge grupe, koje obuhvaćaju vrste agregata *Waldsteiniana* i *Pyramidalis*, uz vrstu *C. carpatica*. U heterofilnom klasteru («grozdu») najizdvojenija je vrsta *C. cochleariifolia*, dok su svojte okupljene oko *C. rotundifolia* praktično neprepoznatljive.



**Slika 4.27** «50%-majority-rule consensus» stablo izabrano između 23 «najparsimoničnija» (*most parsimonious*) stabla temeljena na PCR-RFLP restrikcijskim fragmentima *trnT-trnF* kloroplastnih DNA regija. Brojevi na granama ukazuju na vjerojatnost (u %) kojom se podupire položaj svake grane. Kratice svojti roda *Campanula* na stablu nalaze se u tablici u Prilogu 5. *Edraianthus tenuifolius* korišten je za «zakorjenjivanje» kladograma.



**Slika 4.28** Kladogram dobiven *Neighbour-joining* metodom uporabom Nei-ovog koeficijenta genetičke različitosti, temeljen na PCR-RFLP restrikcijskim fragmentima *trnT-trnF* kloroplastnih DNA regija. Kratice svojiti roda *Campanula* na stablu nalaze se u tablici u Prilogu 5. *Edraianthus tenuifolius* korišten je za «zakorjenjivanje» kladograma.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Usporedbena morfometrija cvjetova i moguća srodnost zvončica primorskih Dinarida

Naglasak na morfološke karakteristike cvijeta u ovome je radu stavljen iz dva razloga: Prvo, srodstvene linije roda *Campanula* u središtu istraživanja tradicionalno su razdvojene temeljem građe listova (ne/postojanje heterofilije), dok se o morfološkim karakteristikama cvjetova govori samo kao o zvjezdastima ili zvončastima, bez provedene temeljitije komparacije njihovih svojstava. Drugo, istražujući građu cvijeta kod dva blisko srodna člana agregata *Waldsteiniana Damboldt* (1965b) je zaključio da varijable cvijeta, a osobito oblik vjenčića, trebaju biti tretirani kao puno važnije sistematsko svojstvo unutar roda *Campanula*, stoga sam odlučila upravo njih usporediti sa cvjetovima agregata *Rotundifolia* i *Garganicae*.

Obzirom na to da je razvitak svake populacije temeljen na genetičkim osobinama kao i na raznovrsnim utjecajima okoliša, morfometrijske su metode dobri pokazatelji i interakcije genoma i staništa. No, kao što su rezultati pokazali, korelacije s vremenskim slijedom sabiranja uzoraka nisu se pokazale značajnima: jedino se dužina prašničkih niti (FILL) malo smanjuje prema kraju vegetacijske sezone, a to je trend koji se i očekuje kod proterandričnih vrsta. Primijećena mala korelacija s geografskim položajem lokaliteta (gledano od sjeveroistoka prema jugozapadu zupci čaške (SEPW) su sve širi, a režnjevi vjenčića (PETLI) i prašnice (ANTL) sve duže) također se izgubila već uz nešto strože kriterije. Tako se temeljem rezultata korelacija devet morfometrijskih varijabli s nezavisnim varijablama staništa može zaključiti da su mjerena svojstva cvijeta pod jakom genetičkom kontrolom.

Iako su rezultati neparametrijske univarijatne analize pokazali visoku značajnost za sve mjerene varijable cvijeta, one nisu sve jednako važne u razlikovanju srodstvenih linija 14 vrsta roda *Campanula* uključenih u morfološki dio istraživanja.

Najvarijabilnijim svojstvom unutar čitavog uzorka, s koeficijentom varijabilnosti od 84%, pokazala se širina zubaca čaške (SEPW), za kojom slijedi dužina zubaca čaške (SEPLI), te dužina režnjeva vjenčića (PETLI). Dok je SEPLI normalno distribuirano svojstvo u ukupnom uzorku, SEPW i PETLI (zajedno s dužinom prašnica, ANTL) prema rezultatima Kolmogorov-Smirnov testa to nisu. Treba također naglasiti i da na tako visok postotak varijabilnosti (posebno za SEPW) jako utječu populacije vrste *C. pyramidalis* (Tribanj-Marija Magdalena) koja ima iznimno široke zupce, dok je to

svojstvo inače, kod većine ostalih populacija i vrsta, relativno stabilno i slabo varijabilno. Populacije *C. pyramidalis* svojim krupnim cvjetovima uvelike utječu na podatke u ukupnom uzorku, što se dobro vidi na *Box & Whisker* dijagramima za PETLI (Sl. 4.8, str. 37) i ANTL (Sl. 4.16, str. 44). U ukupnom uzorku najmanje varira dužina vrata tučka (STYL), a osobito varijabilne nisu ni širina režnja vjenčića (PETW), te dužina prašnica (ANTL) i prašničkih niti (FILL), koji normalno ovise o zrelosti cvijeta. Tako je već metodama deskriptivne statističke analize razdvojeno nekoliko «prirodnih» skupina zvončića obzirom na građu cvijeta, no tek multivarijatna obrada podataka daje jasniju sliku kretanja mjerenih svojstava cvjetova po populacijama i vrstama.

Rezultati diskriminantne analize u ukupnom razlikovanju mjerenih vrsta roda *Campanula* u najvećoj mjeri daju važnost dužini prašničkih niti (FILL) i slobodnih režnjeva vjenčića (PETLI). Tu opet treba naglasiti da jedino cvjetovi vrste *C. pyramidalis* imaju filamente znatno kraće od antera, što ponovo utječe na sliku kretanja tih svojstava u ukupnom uzorku. Ovo jasno izdvajanje populacija *C. pyramidalis* vrlo je dobro uočljivo na *Scatter* grafikonima kanoničke i korelacijske analize (sl. 4.20 i 4.21, str. 50), kao i PCA (sl. 4.22, str. 52). Cvjetovi te vrste jasno se izdvajaju od svih ostalih prvenstveno veličinom svojih vjenčića (PETL, PETLI), ali temeljno slijede osnovni tip građe cvijeta koji se može nazvati zvjezdastim ili «izofilnim» (kakav imaju jednakolisni zvončići).

Uzorci preklasificirani kao izofilni i izofiloidni (*Campanula fenestrellata* ssp. *debarensis*, *C. reatina*, *C. waldsteiniana* i posebno *C. pyramidalis*) slijede taj zvjezdasti oblik cvijeta i temeljem kvalitativnih varijabli sasvim su jasno razdvojeni od ostatka, uzoraka heterofilnih vrsta kojima se pridružuje i *C. tommasiniana* zvončasto-cjevastog cvijeta (to je dobro uočljivo na dendrogramu *cluster*-analize, sl. 4.23, str. 55). Pokazalo se i da su *a priori* klasifikacije uzoraka koji slijede izofilnu građu cvijeta najčešće «točne», jer se usprkos sličnom tipu građe cvijeta te vrste međusobno dobro razlikuju, za razliku od heterofilnih, koje su najčešće «netočne» jer slijede gotovo identični tip građe cvijeta. Temeljem rezultata kanoničke i korelacijske analize možemo zaključiti i da su diskriminantne karakteristike vjenčića veće od onih čaške, što se vidi i na rezultatima PCA analize (sl. 4.22, str. 52). Uzorci preklasificirani kao pripadnici vrste *C. pyramidalis* jasno se razlikuju veličinom cvijeta (prvenstveno vjenčića) i dužinom prašnica (ANTL) od svih ostalih, pa bi bilo dobro u narednim istraživanjima tu vrstu isključiti iz statističkih analiza. I rezultati RFLP metode provedene u ovom radu, kao i rezultati drugih molekularnih istraživanja (Park i sur. u

prapr.), naznačuju neobičan položaj vrste *C. pyramidalis*. Filogenetičke metode obrade opdataka dobivenih RFLP metodom (Sl. 4.27 i 4.28, str. 59 i 60) nagovijestile su, naime, po prvi put moguću srodnost morfološki naizgled vrlo raznolikih «izofiloidnih» vrsta agregata *Pyramidalis* i *Waldsteiniana*, te s još nekim izoliranim vrstama zvončića (*C. carpatica*, *C. raineri*, *C. morettiana*), koje nemaju bliskijih srodnika. Te se vrste dalje čak pokazuju nešto srodnijima s heterofilnima, pa sam ih uvjetno nazvala «heterofiloidnima»: i njihove pojedine morfološke, a pogotovo fenološke karakteristike podupiru takvu mogućnost. Skupni rezultati molekularnih istraživanja pomalo daju sliku moguće međusobne srodnosti «izofiloida» i jasnu razdvojenost izofilnih i heterofilnih zvončića, što ću pobliže objasniti po pojedinačnim razvojnim linijama.

### **Jednakolisni zvončići srodstvenog kruga Garganicae**

(s. Trinajstić u Lovašen-Eberhardt i Trinajstić 1978; garganica-clade s. Park i sur. u prapr.)

U morfometrijski dio ovog istraživanja bile su uključene samo dvije najslabije poznate svojte serije Garganicae (nažalost, vrlo malenim uzorkom), čije je mjesto u sistematici zvončića slabo riješeno: talijanska *C. reatina*, te makedonska *C. fenestrellata* subsp. *debarensis*, koje se morfološki i biogeografski razlikuju od središnje jezgre ser. Garganicae sjeveroistočnih obala Jadrana (Damboldt 1965a, Lucchese 1993). Rezultati su potvrdili da se izofilni tip cvijeta zvončića jasno razlikuje od heterofilnog (širokoljevasti vjenčić relativno je duboko urezan, zupci čaške kratki i trokutasti), ali i da je moguće samo prema svojstvima cvijeta međusobno razlikovati navedene izofilne vrste. Ipak, pitanje međusobne srodnosti izofilnih vrsta, kao što je dilema o stvarnoj srodnosti *C. reatina* ili o taksonomskom statusu *C. debarensis*, problemi su koje klasične taksonomske metode ne mogu riješiti, već je idealno za molekularna istraživanja (uzorak *C. debarensis* na žalost nije dostajao za RFLP). Najbliži srodnici ser. Garganicae zasad se ne mogu pretpostaviti (potrebno je još puno uzorkovanja i iz udaljenijih regija Euroazije), a možebitno su i izumrli, no to nikako ne moraju biti zvončići tek slične morfologije i rasprostranjenosti.

U molekularnom dijelu istraživanja, u koje je bilo uključeno sedam izofilnih svojti, najvećim se iznenađenjem pokazala *C. isophylla*. Ta se vrsta sasvim odvojila od razvojnog kruga Garganicae, što može ukazivati i na njenu veliku starost i na vezu sa zajedničkim precima razvojnih linija izofilnih i heterofilnih zvončića. Također, rezultati pokazuju da bi *C. istriaca* doista trebalo smatrati podvrstom *C. fenestrellata*, a ne

samostalnom vrstom kao što se tretira u Popisu hrvatske flore (Lovašen-Eberhardt 2000). Rezultati RFLP metode (Sl. 4.27 i 4.28, str. 59 i 60) razdvajaju i *C. reatina* od *C. garganica* te je približavaju kompleksu *C. fenestrellata*, što bi trebalo i dodatno istražiti. U svakom slučaju, kao što je i Lucchese (1993) zaključio, *C. reatina* je prava članica ser. Garganicae, što je potvrđeno i u ovoj disertaciji.

Na okojadranskom prostoru raštrkana serija Garganicae morfološki je visoko konzervirana, no po Damboldt (1965a) samo jedna od tri manje skupine iste (monofiletske) razvojne linije *Isophylla*, što se godinama smatralo ispravnim. Međutim, bilo je i drugačijih mišljenja, a ono zanemareno Trinajstića (u Lovašen-Eberhardt i Trinajstić 1978) - koji je smatrao da *Isophyllae* nisu baš tako visoko srodne, te ih je kao sekciju podijelio na tri paralelne razvojne linije određenog unutarnjeg polimorfizma – pokazuje se ispravnim i korištenjem najmodernijih metoda molekularne sistematike (Park i sur. u priprav.). I rezultati ovoga istraživanja na tom su tragu, sasvim jasno izdvajajući tipičnu izofilnu vrstu *C. isophylla* od kompaktne skupine vrsta serije Garganicae. Daljnja istraživanja trebala bi obuhvatiti veći broj vrsta iz šireg srodstvenog kruga «izofilnih» vrsta, jer se najbliži srodnici ni serije Garganicae zasad ne mogu pretpostaviti (potrebno je još puno uzorkovanja *Campanula* i iz udaljenijih regija Euroazije), a možebitno su i izumrli, no to nikako ne moraju biti zvončići tek slične morfologije i rasprostranjenosti.

### **Raznolisni zvončići srodstvenog kruga *Rotundifolia***

(s. Kovanda 1970a; subsekcija *Heterophylla* (Witasek) Fedorov 1957)

Damboldt je smjestio svoje *Isophyllae* kao paralelnu razvojnu liniju s daleko većom i raširenijom subsekcijom *Heterophylla*, unutar koje se posebno ističe skupina (agregat, kompleks) *Rotundifolia* ovdje shvaćena u smislu Kovande (1970a). Iako su *Isophylla* i *Rotundifolia* (*Heterophylla*) temeljno razdvojene temeljem ne/postojanja heterofilije, među tim su skupinama, koliko god bile umjetno sastavljene, razlike daleko veće: komparativna morfometrija cvjetova pokazala je da se i građom cvijeta sasvim jasno razlikuju. To je osobito važno sad kad znamo da bi Damboldtovu skupinu *Isophylla* trebalo revidirati.

Iako jasno razdvojeni od izofilnih vrsta, uzorci vrsta i populacija agregata *Rotundifolia* uključenih u ovo istraživanje veoma se slabo međusobno razlikuju i morfološkim i molekularnim metodama. Jednostavne varijable cvijeta ne mogu biti sa

sigurnošću korištene u determinaciji vrsta ovoga agregata, usprkos tome što ćemo po općim karakteristikama cvjetova odmah uočiti da pripadaju razvojnoj liniji *Campanula rotundifolia* (linealni do gotovo nitasti zupci čaške duži od sraslog dijela, zvončasti oblik cvijeta s relativno kratkim režnjevima vjenčića spram sraslog dijela). Čini se da su morfološki tek nešto jasnije diferencirane starije vrste toga agregata, kao što su *C. cespitosa* i *C. justiniana*, dok se *C. velebitica* i njeni najbližiji srodnici (*C. albanica*, *C. jordanovii*) gotovo uopće ne razlikuju. Kao što smo vidjeli u poglavlju Rezultati, mali dio *a priori* određenih raznolisnih vrsta (npr. *C. velebitica* s.l., *C. hercegovina*, *C. rotundifolia* s.l. ili *C. scheuchzeri*) donekle se može raspoznati unutar zajedničkog «oblaka» heterofilnih uzoraka temeljem omjera cvjetnih varijabli i - donekle - jednostavnih izmjera STYL, ANTL, FILL i SEPO. Istini za volju, velike se poteškoće javljaju pri determiniranju svojiti agregata *Rotundifolia* i temeljem čitave biljke, kamoli samo temeljem cvjetnih varijabli, a bez podatka o geografskoj pripadnosti vrste gotovo da je to i nemoguće. I lokalne populacije često funkcioniraju kao «male vrste», a *Rotundifoliae* k tome i najvjerojatnije hibridiziraju (Böcher 1960) kad rastu simpatrički (npr. *C. scheuchzeri*, *C. marchesettii*, *C. velebitica* s.l., *C. witasekiana*), vjerojatno i bez obzira na stupanj ploidiije (Kovanda 1999). Determinacijski ključevi nedosljedni su oko klasifikacijske vrijednosti svojstava kao što su ne/bradavičavost plodnice, trepetljičavost baza prašničkih niti, položaj cvjetnih pupova i tobolaca, tip podzemnih organa te oblik, veličina i dlakavost listova i stabljika, jer ti uvelike variraju i unutar iste svojite (pa i jedinke!), a možda su rezultat višestrukih hibridizacija. Rezultati RFLP metode potvrđuju ovakav stav: od 12 uključenih vrsta srodstvenog kruga *Rotundifolia* moguće je bilo razlikovati samo jednu: *Campanula cochleariifolia*. Sve druge vrste uopće nije bilo moguće razlikovati primjenom ove metode. Na ovom stupnju istraživanja stoga smatram da bi bilo kakav novi ključ baziran na ovako konfuznoj morfologiji unio samo još više zabune u ionako prekomplikiranu sistematiku skupine *Rotundifolia*.

Treba spomenuti i to da je čitav srodstveni krug *Rotundifolia*, iako jedan od najistraživanijih na Planetu, posve sigurno «neprirodan», odnosno sastavljen umjetno – čak i u manjem opsegu vrsta kakvim ga drži Geslot (1984)<sup>7</sup>. Böcher (1960) je smatrao da bi pravilan taksonomski tretman sjevernoatlanskog kompleksa *C. rotundifolia* s.l. bio taj da je to sve jedna divovska vrsta s puno podvrsta (kao što je

---

<sup>7</sup> Među najcitiranijim istraživanjima kompleksa *Rotundifolia* radovi su Kovande (1970a, b, 1977), Geslota (i Medus 1974; Geslot 1980, 1984) i Shetlera (1982), gdje se mogu naći i popisi literature.

predlagala još Witasek 1902), a vrlo je zanimljivo i to što sve tetraploidne populacije *C. rotundifolia* s europskog i sjevernoameričkog kontinenta još uvijek hibridiziraju bez ikakvih poteškoća, tj. nema genetskih barijera (Bielawska 1972, Shetler 1982). Podrobnija podjela srednjoeuropskog dijela kompleksa *Rotundifolia* na serije, koju je Kovanda (1970ab, 1977) sastavio na gledištima mnogobrojnih starijih autora (poglavito Krašana 1894) i proširio vlastitim dugogodišnjim istraživanjima, temelji se na njihovoj na morfologiji, biogeografiji i (dijelom) citologiji. I ta se podjela u međuvremenu pokazala umjetnom. Gadella (1964) je tretirao kompleks *C. rotundifolia* u smislu Hrubyja (1930), te primjećuje da se iz kolektivne vrste jasnije izdvaja tek nekoliko «dobrih vrsta», među ostalima *C. cespitosa*, *C. carnica*, *C. cochleariifolia* i *C. scheuchzeri*. Ta, kao i još neke starije i jednostavnije sistematizacije skupine okruglolisnih zvončića (npr. Nyman 1878-1882; Witasek 1902, 1906; Podlech 1962, 1965) mogle bi biti na tragu prirodne srodnosti razvojnih linija heterofilnih zvončića grupe *Rotundifolia*, ali ne u cijelosti, baš kao i Krašanova i Kovandina. Jasno je da pojedine vrste uopće ne pripadaju srodstvenom krugu *Rotundifolia* (usp. Geslot 1984, Kolakovski 1992ab, Park i sur. u priprav.), kao što se pokazalo temeljem molekularnih metoda za stari diploid *C. cochleariifolia*, no tek se od sofisticiranijih tehnika očekuju novi prilozi poznavanju filogenije tog dijela roda *Campanula*.

### **Prijelazne svojte: «izofiloidni» ili «heterofiloidni» zvončići?**

Nekoliko manjih razvojnih linija zvončića areala sličnih kao i prije opisane skupina *Garganicae* i *Rotundifolia* zbunjuju botaničare stoljećima, a Eddie ih je nazvao «izofiloidnima» (Eddie i sur. 2003, Eddie i Kovačić 2004). Kao što sam spomenula, na prostoru primorskih Dinarida «izofiloidnima» u tom smislu možemo smatrati u prvom redu pripadnike agregata *Waldsteiniana* i *Pyramidalis* (s. Geslot 1984) koji morfološki donekle zauzimaju intermedijerni položaj između Damboldtove grupe *Isophylla* i Fedorovljeve subsekcije *Heterophylla*, a sad se po prvi put pokazalo da i molekularne metode to podupiru.

Morfološke karakteristike koje «izofiloidi» dijele s jednakolisnim zvončićima su uspravni tobolci, trokutasti do produženo-jajasti zupci čaške i zvjezdasti vjenčići (osim kod *C. tommasiniana*): usporedbena morfometrija cvjetova tih vrsta u ovome radu doista pokazuje njihovu bliskost s izofilnim primjercima uključenim u istraživanje, no u većini ih se slučajeva može više ili manje jasno raspoznati. Međutim, vrste agg.

Waldsteiniana imaju jasnu (mada često previđenu) heterofiliju (okrugli bazalni listovi već većinom nedostaju za cvatnje), bočne sterilne ogranke (zajedno s *C. versicolor*), izraženu teksturu sjemene lupine (Prilog 4), te prezimljuju u obliku prizemnih lisnih pupova poput *Heterophylla*, a ne «zimskih» listova kao *Isophyllae*, te se «bude» u rano proljeće i dalje razvijaju na sasvim isti način kao i heterofilne vrste. Vrste agregata *Pyramidalis*, s druge strane, također prezimljuju u obliku rozeta srcastih listova, koji su kod *C. pyramidalis* sasvim nalik kasnijim listovima cvatućih izbojaka. Međutim, kod *C. versicolor*, a pogotovo kod *C. secundiflora* (koja ima listove stabljike oblikom jako slične agg. *Waldsteiniana*) listovi zimskih rozeta nešto su drugačijeg oblika od listova stabljike, pa bi trebalo izvršiti dodatna komparativna istraživanja oblika i veličine listova svih triju vrsta (posebno *C. secundiflora*, koja morfološki najviše nalikuje jednakolisnim zvončićima) kako bi se sasvim isključilo postojanje slabe heterofilije i kod srodstvene linije *Pyramidalis*. Sve to, zajedno s rezultatima molekularnih istraživanja, stavlja u pitanje «izofiloidnost» agg. *Waldsteiniana* i *Pyramidalis*.

**Agregat *Pyramidalis*** (s. Geslot 1984; subsect.? *Pyramidalis* s. Kolakovski 1992b)

Zanimljivo je pobliže promotriti morfometrijske rezultate vezane uz jedinu od tri vrste «izofiloidnog» agregata *Pyramidalis* koja raste na prostoru primorskih Dinarida, *C. pyramidalis*. Krupni cvjetovi te vrste temeljno slijede izofilni tip cvijeta, no prašnice su ovdje znatno duže od prašničkih niti, zupci čaške mesnati i jasno trokutasti, a vrat tučka izrazito dugačak i zakrivljen. Osim toga, cvjetovi te vrste mirišu, što je jedinstveno među istraživanim svojstama, a gotovo i u čitavom rodu *Campanula*. Starija istraživanja hibridizacije u kontroliranim uvjetima (Gadella 1967; Musch u Musch i Gadella 1972), te naši preliminarni rezultati izoenzimske aktivnosti (Tkalec i sur. 2004) ukazuju na mogućnost bliže srodnosti agregata *Pyramidalis* (konkretno, tipične vrste *C. pyramidalis*) i izofilnog kruga zvončića u užem smislu. Bliski srodnik *C. pyramidalis*, srpski subendem *C. secundiflora*, oblikom rasta donekle slični tipičnoj izofilnoj vrsti *C. isophylla* (koja se pak, sudeći po rezultatima molekularnih analiza u ovom istraživanju, te Park i sur. (u priprav.) nije pokazala blisko srodnom seriji *Garganicae* uopće). Ipak, rezultati molekularnih analiza (Park i sur. u priprav., ovo istraživanje) pokazuju da su piramidalni zvončići donekle bliski i heterofilnim vrstama. Relativno uspješno križanje *C. pyramidalis* s paleoendemičnim rapunkuloidom *C. carpatica* o kojem izvještava

Gadella (1964)<sup>8</sup> indicira moguću daleku vezu s tom prastarom razvojnom linijom, što donekle potvrđuje i morfologija (tobolci agg. *Pyramidalis* otvaraju se porama pri sredini kao kod *C. carpatica*, a ne strogo bazalno, kao kod jednakolisnih, raznolisnih i agg. *Waldsteiniana*; široko ljevokasto-rotatna građa vjenčića *C. pyramidalis* na tragu je građe vjenčića *C. carpatica* i *C. raineri*; rast je strogo uspravan), a i rezultati molekularne analize u ovom radu<sup>9</sup>. I preliminarna istraživanja izoenzima (Tkalec i sur. 2004) pokazala su da se izofiloidnim zvončićima približavaju populacije *C. pyramidalis* no, ako je ta vrsta doista potekla od istih predaka kao i vrste serije *Garganicae*, mada se od njih danas uvelike razlikuje tipom rasta, općom morfologijom (građa sjemene lupine, tip cvata, česta fascijacija) i načinom života (u idealnim uvjetima okoliša, tj. u pukotinama stijena na punom suncu, *C. pyramidalis* je dvogodišnja biljka), možda je vrijeme cvatnje predstavljalo prvu (temporalnu) barijeru između predaka piramidalinih zvončića (cvate od kolovoza do kraja listopada, baš kao i *C. isophylla*) i današnjih *Garganicae* iste rasprostranjenosti (cvatu u lipnju i srpnju). Iako je razvojni «tajming» bez sumnje visokovrijedno sredstvo evolucije vrste, na evoluciju cvijeta kao organa ništa nema tako snažan utjecaj kao pritisak oprašivača, poglavito pčela, i posebno u evoluciji vrsta roda *Campanula* u Europi (Eddie 1984), što uopće nije istraživano na vrstama zvončića uključenim u ovo istraživanje. To može biti osobito važno i osjetljivo pitanje u diskusiji jedinstvene dihotomije oblika vjenčića kod dva jedina člana agregata *Waldsteiniana*.

#### **Agregat *Waldsteiniana* (s. Geslot 1984)**

Nasuprot izofilnim, a posebno heterofilnim vrstama zvončića, dvije vrste srodstvenog kruga *Waldsteiniana* razlikuju se upravo, i gotovo jedino, građom cvijeta. Sudeći prema rezultatima usporedne morfometrije cvjetova, iako su ostale morfološke karakteristike prilično različite (heterofilija; listovi stabljike eliptični do rombični, nazubljeni i gotovo sjedeći; zupci čaške linealni), osnovna građa cvijeta *C. waldsteiniana* slijedi tipičnu zvjezdastu građu izofilnih cvjetova serije *Garganicae*. S druge strane, cvjetovi njegova najbližeg srodnika, *C. tommasiniana*, imaju «prijelazni» položaj prema heterofilnim vrstama, osobito njenim starijim (ako uopće?) članovima,

---

<sup>8</sup> *Campanula carpatica*, paleoendemični «rapunkuloid» s Karpata, još uvijek hibridizira s većinom vrsta s  $2n=34$ , pa se pretpostavlja da su njeni preci mogli biti zajednički svim današnjim zvončićima s  $n=17$ .

<sup>9</sup> Istraživanja Eddieja i suradnika (2003) ionako su pokazala da je klasična dihotomija roda *Campanula* na dvije sekcije, *Campanula* i *Rapunculus* (usp. Fedorov i Kovanda, 1976) samo temeljem načina otvaranja tobolca proizvoljna i «neprirodna», baš kao i sastav vrsta čitavog roda *Campanula* s najbližim srodnicima (*Asyneuma*, *Adenophora*, *Symphyandra* i dr.).

kao što je *C. cespitosa*. Ta sličnost, zajedno s morfološkim i fenološkim karakteristikama, indicira mogućnost postojanja zajedničkog pretka *C. tommasiniana* unutar grupe *C. rotundifolia* (te bi stoga ovaj agregat prije bi bio «heterofiloidni» nego «izofiloidni!»), no ne objašnjava zvjezdasti oblik vjenčića kod *C. waldsteiniana*. Sličnost u građi vjenčića, svakako, može biti i rezultatom pomanjkanja vrsta slične građe vjenčića u regiji ili jednostavno njihove neuključenosti u ovo istraživanje - ali i slučajna. Ipak, vrijedi spomenuti da je još Nyman (1878-1882) smatrao da bi vrste agg. *Waldsteiniana* mogle biti bliske s reliktnim okruglolisnim vrstama kao što su *C. cespitosa*, *C. excisa* ili *C. pulla* (tada klasificiranima u skupinu *Rupestria* Boiss. podroda *Campanulastra*), mišljenje koje su kasniji autori odbacili (npr. Wohlfahrt u Koch 1902, Fiori 1927, Hayek 1931, Gadella 1964, Damboldt 1965b), arbitrarno prisličivši *Waldsteinianae* jednakolisnim zvončićama (tada se smatralo da je *C. tommasiniana* tek podvrsta *C. waldsteiniana*). Damboldt (1965b) je ipak dopustio mogućnost veze *C. tommasiniana* sa subendemičnom okruglolisnom vrstom *C. hercegovina*, koja morfološki napadno nalikuje umjetno dobivenom križancu *C. waldsteiniana* x *C. tommasiniana* po općem habitusu i sličnom obliku bazalnih i stabličnih listova. No, prema ovom istraživanju te rezultatima drugih autora (Liber i sur. 2004, Park i sur. u priprav.), *C. hercegovina* je prava (moguće vrlo stara) pripadnica kruga *Rotundifolia*, bez ikakvih bliskijih veza s agregatom *Waldsteiniana*. Prema Podlechu (1965) sredozemne bi vrste kao *C. hercegovina*, *C. macrorrhiza* ili *C. forsythii* mogle predstavljati neke od drevnih diploida iz kojih je evoluirala čitava grupa *C. rotundifolia*.

Koliko je poznato, dvije vrste *Waldsteiniana* međusobno se uspješno križaju dajući sasvim fertilno potomstvo (*C. x yorkii*), građom «na pola puta» između roditeljske (Damboldt 1965b), no ne hibridiziraju ni s jednom drugom vrstom izofilnih, kao ni heterofilnih zvončića, iako na dinarskim planinama s mnogima dijele prirodna staništa (npr. *C. fenestrellata* s.s., *C. pyramidalis*, *C. cochleariifolia*, *C. justiniana*, *C. velebitica* s.l., *C. witasekiana*, *C. marchesettii*), a i u hortikulturnoj su literaturi takvi navodi česti (usp. Crook 1951, Lewis i Lynch 1998). Stoga se čini nevjerojatnim da bi neobični cjevasti vjenčić *C. tommasiniana* mogao nastati križanjem *C. waldsteiniana* s bilo kojom recentnom vrstom zvončića. Ako i jest tako, tada je drugi pra-roditelj *C. tommasiniana* danas izumro, barem na interesnom području ovoga rada: u sljedećim će analizama evolucijske putove endemičnih razvojnih linija roda *Campanula* zapadnobalkanskog i okojadranskog prostora biti potrebno potražiti i među izoliranim i

slabo poznatim svojstama Apeninskog te Iberskog poluotoka (npr. *C. acutiloba*, *C. arvatica*, *C. cenisia*, *C. excisa*, *C. herminii*<sup>10</sup>), ali i u Sjevernoj Americi, koje su možda također opstale na svojim malenim područjima refugijalnog tipa iz pradavnih vremena. Velika je mogućnost (Damboldt 1965b, Park i sur. u priprav.) da su izolirane, reliktno svojte kao što su talijanski subendemi *C. morettiana* ili *C. raineri* pravi srodnici linije *Waldsteiniana*, pa i *Pyramidalis*, što traži dalja istraživanja.

Međutim, po mišljenju pojedinih stručnjaka (Contadriopoulos 1984, Eddie osob. kont., Wraber osob. kont.) nije nemoguće ni da su daleki srodnici «izofiloidnih» zvončića do danas opstali i puno dalje od planina sredozemnog bazena: možda na sjeveroistoku Sjeverne Amerike (vrlo slične grupe američkih «izofiloida», *C. lasiocarpa*, *C. piperi*, *C. scouleri* i «heterofiloida», *C. parryi* s  $2n=34$ ) ili čak u umjerenim dijelovima Kine («izofiloidno-heterofiloidne» vrste *C. aristata*, *C. calcicola*, *C. chrysosplenifolia*, *C. crenulata*, *C. cymbalaria* – vrlo stare svojte s  $2n=26/28$ ). Uočljive sličnosti između geografski veoma udaljenih i izoliranih skupina svojti i malih rodova kao što su *Campanula scoparia*–*C. arvatica*/*C. herminii*; *C. lasiocarpa*/*C. piperi*/*C. aurita*–*Hyssaria lehmanniana*–*Astrocodon kruhseanus* pozivaju na detaljnija istraživanja biogeografije i filogenije ove velike skupine kampanuloida korištenjem svih dostupnih najmodernijih tehnika. Metode molekularne sistematike danas se široko primjenjuju u izučavanju filogenije živoga svijeta, a upravo su nezaobilazne kod istraživanja velikih i polimorfnih srodstvenih skupina polifiletskog postanka, kao što je to rod *Campanula*. Temeljem isključivo morfoloških i anatomskih karakteristika nije uvijek moguće sa sigurnošću utvrditi koje su svojte doista srodne temeljem sličnih vanjskih osobina (sinapomorfije), a koje zbog paralelne evolucije samo nalikuju jedne drugima (homoplazije): upravo je davanje prevelikog taksonomskog značaja vrlo varijabilnim morfološkim karakteristikama jedan od glavnih razloga zašto je taksonomija roda *Campanula* i čitave porodice danas pretjerano složena i zahtijeva temeljitu reviziju. No isto tako, treba biti oprezan i s rezultatima molekularnih istraživanja, te ih ne uzimati kao konačne i jedino vrijedne, nego ih staviti u kontekst s rezultatima klasičnih i ostalih taksonomskih izučavanja (morfologija, korologija, citologija i dr.).

---

<sup>10</sup> Nije nemoguće da su daleki srodnici ili čak preci naših zvončića mogli preživjeti u refugijima i daleko izvan okojadranskog bazena, možda raštrkani na malenim, konzerviranim staništima u Karpatima ili Iberskom poluotoku: tako «azijska *Campanula garganica*» (Crook 1951), sasvim slabo poznata *C. acutiloba* nastanjuje vrhove planina danas gotovo nedostupnog Kurdistan.

## 5.2 Evolucija morfoloških karakteristika cvijeta kod roda *Campanula*

Dva procesa u evoluciji pravih zvončića moraju biti posebno naglašena. Prvi je široko rasprostranjena neotenija, koju Eddie (1984, 1998) smatra jednim od najvažnijih faktora u shvaćanju iznimne raznolikosti oblika unutar iste svojte. Drugi je selekcijski pritisak oprašivača, osobito pčela, najjača pokretačka sila u evoluciji cvijeta, što je posebno izraženo kod vrsta roda *Campanula* u Europi. Već je dugo poznato (Grant 1949) da križanci dviju vrsta koji steknu sposobnost privlačiti različite oprašivače od onih roditeljskih vrsta postaju reproduktivno izolirani od obje roditeljske vrste. Kako su svi današnji zvončići bez iznimke entomofilni, možemo smatrati činjeničnim da su izvorno različiti oblici cvjetova – posebno vjenčića – današnjih izofilnih i heterofilnih zvončića «utemeljeni» još s krajem tercijara, ali je doista teško razumjeti kako je, na primjer, neobično cjevast vjenčić *C. tommasiniana* evoluirao na području malene i ne osobito izolirane Učke. Učka, doduše, ne slijedi klasični smjer pružanja istočnih Dinarida (sjeveroistok-jugozapad), no ipak nikad nije bila sasvim izolirana od ostatka dinarskog sustava. Mogli bismo pretpostaviti da su dva različita oblika vjenčića dvaju bliskih rođaka dizajnirana mutacijama zajedničkih populacija predaka, tj. da je vjenčić *C. tommasiniana* nastao kao lokalna mutacija u možda tek jednoj pra-populaciji zajedničkog pretka nastanjenog na pra-Učki i nikad se nije proširio izvan okvira te planine, držeći se viših nadmorskih visina ili pak strogo primorskih obronaka. Ne treba previdjeti i mogućnost rapidne promjene cvjetnih karakteristika kao odgovor na velike i nagle promjene uvjeta okoliša (Niklas 1997): *Campanulaceae* imaju veoma raznolik mozaik cvjetnih tipova, no to je tek varijacija visoko konzerviranog kukac-oprašivanje "bauplana" (Eddie 1998). Sasvim jednostavne, monogenetične («one-gene») mutacije mogu drastično promijeniti opći oblik (broj, pozicija, simetrija, stupanj srastanja) cvjetnih dijelova, a time i seksualne karakteristike cvijeta. Slijedom događaja, i te male mutacije mogu dovesti do stvaranja novih vrsta. Monogenetične mutacije mogu postaviti mehaničku izolaciju među dijelovima populacija jednostavnom promjenom simetrije cvijeta, a time i potencijalno mijenjajući sastav populacije (Hilu 1983). Osim važnih cvjetnih karakteristika, mehaničke barijere mogu i spriječiti dalju hibridizaciju dviju subpopulacija; kako su kontrolirane jednim jedinim (recesivnim) genom, njegova mutacija može voditi i do kleistogamije. Čini se da relativno malo gena specificira tip cvjetnog organa u

njegovom normalnom razvitku (Niklas 1997). Posebno su važne tzv. homeotične mutacije, koje mijenjaju tip formiranog organa. Kako protok gena unutar populacije uvelike ovisi o sposobnosti cvjetova da privuku specifične oprašivače, promjene morfologije cvijeta mogu promijeniti vrste oprašivača koji ih posjećuju. S obzirom na to da imaju potencijal postavljanja reproduktivnih barijera, homeotične mutacije mogu poslužiti kao mehanizam promjene svojstava cvijeta, genetičke divergancije, te konačno i specijacije.

Nezaobilazna veza između veličine i oblika cvijeta i biologije oprašivača bez sumnje je najvažnije u razvitku svojstava cvijeta: velika raznolikost cvjetova uopće odražava adaptivnu modifikaciju kao posljedicu reakcije na životinjske oprašivače. Poznato je da vrste velikog roda *Campanula* posjećuju različite vrste kukaca (osobito pčela, žohara i malih muha), a kod kritosjemenjača opći je trend od primitivnijih oprašivača (žohari, muhe) prema naprednijima (leptiri, moljci, pčele). Cvjetovi koje oprašuju pčele pokazuju najveću specijalizaciju u strukturi: primitivni cvjetovi tako su većinom zvončasti, ljevkast ili tanjurasti, dok su napredniji usko cjevasti ili zigomorfni. Opseg oprašivača i njihove fine veze s veličinama i oblicima cvjetova strogih entomofila kao što je rod *Campanula* još su uvijek slabo poznate (usp. Janzon 1983, Inoue i Amano 1986, Dafni i Kevan 1997), a u dinarskom području, zajedno s mnogim drugim otvorenim pitanjima, potpuno mistične: ipak, teško je vjerovati da se na našoj maloj Učki razvio jedinstveni oprašivač, specifično utječući na razvitak tubularnog vjenčića *C. tommasiniana* i nikad se ne proširivši na prostore okolnih planina. Vakramejeva i Dluski (1994) su, na primjer, izučavali oprašivače vrsta *Campanula persifolia*, *C. rapunculoides* i *C. latifolia* na širem području Moskve. Iako je sastav kukaca gotovo jednak za sve tri vrste, one ipak imaju različitu morfologiju cvijeta, koja se uobičajeno interpretira kao specijalizacija na određenu skupinu oprašivača. Međutim, ne treba smetnuti s uma da se radi o tri vrste roda vrlo široke rasprostranjenosti, koje su vjerojatno i oblikom cvijeta prilagođene na vrlo različit sastav oprašivača. Inoue i sur. (1995) otkrili su da pčele reagiraju različito i na veličinu i na spolnu dob cvijeta, indicirajući da privlačenje oprašivača nije dovoljno da bi objasnilo evoluciju veličine cvjetova roda *Campanula*. Kobajaši je sa suradnicima (1999) pokušao objasniti mehanizam odabira širine vjenčića kod vrste *C. punctata* i otkrio da oprašivači daleko manje posjećuju cvjetove užeg vjenčića od onih širokog vjenčića, usmjeravajući tako dalju evoluciju u razvitku cvijeta prema širokoljevkastom

obliku. Moja iskustva s prirodnih staništa ukazuju na daleko veću produkciju sjemenki kod *C. waldsteiniana* nego kod *C. tommasiniana* (posebno na šumskim staništima), što može ukazivati na to da prilagodba cjevastog vjenčića na nekog specifičnog oprašivača ne postoji ili još uvijek nije dovršena.

Čini se mogućom i pretpostavka da se cjevasti vjenčić – a time i *C. tommasiniana* – pojavio kao lokalna mutacija u nekoj od učkarskih roditeljskih populacija budućeg agregata *Waldsteiniana* (ili kao neotenična populacija same *C. waldsteiniana*?) i ostao rasprostranjen samo na malom broju - možda čak isključivo šumskih - lokaliteta, dok su roditeljske populacije zvjezdastog oblika vjenčića na tom području postupno izumrle. Jedan jedini primjerak *C. waldsteiniana* nedavno je pronađen i na slovenskom Snežniku (Surina u Kovačić i Surina 2005), pokazujući da su staništa te vrste doista mogla biti i puno sjevernije od dosad poznatih hrvatskih. U svakom slučaju, potrebno je posebno istraživanje oprašivača endemičnih vrsta zvončića od interesa u ovom radu (posebno vrste *C. tommasiniana* na prirodnim staništima Učke), kako bismo mogli donijeti sigurniji zaključak o podrijetlu, nastanku i starosti tog tipa vjenčića.

### **5.3. Filogenetski odnosi jednakolisnih i raznolisnih zvončića primorskih Dinarida**

Kako su različite filogenetske i statističke metode obrade podataka dosad dale vrlo slične rezultate utemeljene na uzorku kloroplastne DNA jednakolisnih, raznolisnih i drugih bliskih vrsta zvončića primorskih Dinarida, u usporedbi s rezultatima morfoloških istraživanja možemo donijeti određene zaključke o njihovoj mogućoj srodnosti: čini se da se sistematički pogledi na zapadnobalkanske i okojadranske svojte, uvriježeni od šezdesetih i sedamdesetih godina prošloga stoljeća, trebaju mijenjati.

**Prvo.** nekadašnja podskupina *Garganicae* Damboldtove skupine *Isophylla* bez sumnje je zasebna razvojna linija koja se sastoji od nekoliko visokosrodnih vrsta, među koje pripada i *C. reatina*. Ta je vrsta morfologijom vrlo različita od ostatka *Garganicae*, a da je doista izolirana potvrdili smo i rezultatima RFLP-cpDNK provedenima u sklopu ovog istraživanja, te rezultatima istraživanja ITS sekvenci

stanične DNA (Park i sur. u priprav.). Iako se u Index Florae Croatiacae (usp. Lovašen-Eberhardt 2000) tretira kao zasebna vrsta, *C. istriaca* u smislu Feera (1890) ipak se čini podvrstom *C. fenestrellata*, što pokazuju korištene molekularne metode. Već je i Degen (1938) smatrao da se *C. istriaca*, istina, razlikuje od *C. fenestrellata* (po pustenasto-sivom indumentu, dužem tobolcu, sitnijim sjemenkama i većim cvjetovima), no bez daljnega se treba smatrati dlakavom paralelnom formom, jer na Velebitu te dvije svojte nisu jasno razgraničene, a pojavljuju se i prijelazni oblici (npr. iznad Karlobaga, na Velikoj gori iznad Jablanca), te križanci tih dviju svojti.

I morfološki vrlo slične prekojadranske vrste *C. poscharskyana* i *C. garganica* bez sumnje su blisko srodne, kao što je naglasio i Damboldt (1965a, 1968) i Trinajstić (u Lovašen-Eberhardt i Trinajstić, 1978). Kako su razdvojene Jadranskim morem tek od kraja posljednjeg ledenog doba (12-15.000 godina), *C. poscharskyana* i *C. garganica* još su uvijek morfološki sličnije nego susjedi *C. poscharskyana* - *C. portenschlagiana* ili *C. garganica* - *C. reatina*.

Analizirajući rezultate molekularne analize za izofilne vrste, svakako najveće iznenađenje predstavlja potpuno izdvajanje «tipične» izofilne vrste, apulijske *C. isophylla* i njeno priključivanje heterofilnom dijelu uzorka. Doista, *C. isophylla* se jako razlikuje od sekcije Garganicae u općoj morfologiji, fenologiji i citologiji, čega je bio svjestan i Damboldt (1965a). Ta je tirenska vrsta, sa svojim bliskim srodnikom *C. fragilis*, jasno razdvojena od ostatka Damboldtovih *Isophylla* brojem kromosoma  $2n=32$ , duže nasađenim i znatno većim srednjim listovima stabljike nasuprot netrajnih listova rozete, pseudo-umbelatnim cvatom (glavni izboj izrasta u cvjetni), tanjurastim vjenčićima širokih režnjeva, crvenkastosmeđim polenom, te izrazito sjajnim sjemenkama oker boje. Zanimljivo je spomenuti i da se *C. isophylla* ne križa, zapravo, niti sa svojim najbližim srodnikom *C. fragilis*, odnosno u najboljem slučaju daje sasvim sterilno potomstvo – baš kao i s *C. pyramidalis*.

Kako je to potvrđeno i rezultatima ITS sekvenci stanične DNA (Park i sur. u priprav.), čini se neizbježnom revizija i potpuno napuštanje pojma «grupe *Isophylla*» u smislu Damboldta, nakon što se dovrše analize koje su u tijeku. U daljnja bi istraživanja srodnosti zvončića ove skupine trebalo, po svemu sudeći, uključiti i predstavnike sekcije *Saxicolae* (Boissier) Charadze (Eddie, osobni kontakt), a vrlo vjerojatno i morfološki slične vrste, kao što je američka *C. piperi* ili azijska *C. cashmiriana* sa srođnicima.

**Drugo.** slabo poznata skupina «izofiloidno-heterofiloidnih» vrsta, ovdje zastupljenih predstavnicima agregata Waldsteiniana i Pyramidalis, već se pokazala izdvojenom iz jednakolisnih i raznolisnih skupina zvončića temeljem morfologije cvijeta (i ne samo cvijeta), a rezultati molekularnih istraživanja indiciraju vrlo neobične zaključke: ne samo da su predstavnici tih dvaju agregata jasno odvojeni od (bivše) grupe Isophylla, tj. njene sekcije Garganicae, oni se čak čine bliskijima heterofilnim vrstama. I što najviše začuđuje, također postoje indicije i da bi te dvije male istočnojadransko-balkanske razvojne linije zvončića mogle biti međusobno – makar i relativno daleko – srodne, što se čini vrlo neobičnim s obzirom na njihovu opću morfologiju (najveća se zajednička morfološka sličnost zapravo može uočiti u izraženoj bradavičasto-mrežastoj teksturi sjemene lupine). Bez ikakve sumnje, usprkos značajnim razlikama u obliku vjenčića, *C. tommasiniana* i *C. waldsteiniana* visoko su srodne vrste, što je već Damboldt (1965b) dokazao njihovim uspješnim recipročnim križanjem. Visoka srodnost vrsta *C. pyramidalis* i *C. versicolor* potvrđena je također njihovim uspješnim križanjem (u hortikulturi cijenjena vrsta *C. x pyraversi*, usp. Crook 1951, Lewis i Lynch 1998), kao i preliminarnim rezultatima ITS sekvenci jezgrine DNA (Park i sur. u priprav.). Srodstveni odnosi trećeg člana toga agregata, srpsko-crnogorske paleostenoendemične vrste *C. secundiflora*, još su posve nepoznati.

Nasuprot morfološki dobro opisanim jednakolisnim zvončićima serije Garganicae, srodstveni odnosi «izofiloida»/»heterofiloida» u ovoj su fazi istraživanja još uvijek nedovoljno jasni, kao i njihove veze s jednakolisnim i raznolisnim zvončićima. Preliminarni rezultati ITS sekvenci jezgrine DNA (Park i sur. u priprav.) također indiciraju izvjesnu – mada relativno slabu – sestrinsku vezu agregata Waldsteiniana i Pyramidalis. Isti rezultati pokazuju i da je *C. pulla*, mala svojta iz sjeveroistočnih Alpa koju je Kovanda smjestio među Alpicolae (kao i *C. cespitosa* i *C. cochleariifolia*, između ostalih), bez sumnje srodnik sestrinske grupe Waldsteiniana-Pyramidalis. Možemo spekulirati da razvitak agregata Waldsteiniana i Pyramidalis seže sve do zajedničkog pretka među izumrlim, primitivnim vrstama s kraja tercijara (kao što su *C. carpatica* i *C. raineri* koje im se pokazuju bliskima): tada bi ta stara skupina danas morfološki jako dobro diferenciranih i udaljenih vrsta bila monofiletička, te bi se razvijala paralelno s razvitkom drugih, puno većih razvojnih linija euroazijskih zvončića, među kojima su i jednakolisni i raznolisni, ali nije postrani razvojni ogranak niti jedne od njih.

**Treće,** jasno je da, baš kao ni komparativne morfometrijske metode, ni dosad korištene metode molekularne analize (RFLP kloroplastne DNA u ovom istraživanju, kao ni ITS sekvence jezgrine DNA u istraživanju Park i sur.) ne uspijevaju riješiti zamršeno klupko bliskih srodnika kompleksa *C. rotundifolia*. Zanimljivo je ipak vidjeti da se *C. cochleariifolia*, jedina od oko 35 hrvatskih svojiti zvončića koja se našla u novoj Crvenoj knjizi biljnih vrsta Hrvatske (Šegulja i sur. 2005) u kategoriji osjetljive do gotovo ugrožene (VU/NT), uporabom RFLP metode jasno izdvaja iz kruga bliskih srodnika *C. rotundifolia*. *Campanula cochleariifolia* vrsta je koju je Kovanda (1970ab) smjestio među *Alpicolae* zajedno s ostalim starim i neobičnim okruglolisnim diploidima kao što su *C. cespitosa*, *C. excisa*, *C. pulla* i *C. stenocodon*. Sve ostale okruglolisne vrste uključene u ovo molekularno istraživanje nisu se međusobno razlikovale, a kako ni ITS sekvence nuklearne DNA (Park i sur. u priprav.) nisu dale jasnije odgovore o filogeniji heterofilnih vrsta uključenih u to istraživanje (većinu vrsta nije bilo moguće razlučiti temeljem ITS sekvenciranja, kao ni uporabom RFLP-cpDNA, te su isključene iz prikaza rezultata), u daljem raspetljavanju ovoga složenog klupka trebat će primijeniti sofisticiranije molekularne metode. Starija istraživanja, međutim, pokazuju da *C. rotundifolia* još donekle hibridizira s *C. cochleariifolia*, dajući triploide i tetraploide, ali isključivo u slučaju  $4x \text{♀} \times 2x \text{♂}$  (Bielawska 1964). Introgresivne forme morfološki nalikuju *C. rotundifolia*, što ipak indicira – makar i dalju – srodnost tih vrsta.

Neizbježna reklasifikacija roda *Campanula* utemeljena na filogenetskim odnosima, tj. rezultatima molekularnih analiza, bit će jako teška, jer će dovesti u pitanje neke od čvrsto ukorijenjenih postavki koje se smatraju «zadanim» već desetljećima, pa i stoljećima. Mnoge će skupine zvončića - čak i morfološki, kariološki i biogeografski jasnije definirane, kao što je to *Isophylla* - doživjeti revizije i velike promjene, do napokon i samoga roda, koji je u današnjem opsegu neodrživ (usp. Eddie i sur. 2003, Kovačić 2004, Park i sur. u priprav.), čega je već Damboldt bio svjestan (1965b). Kako je ovo istraživanje bilo geografski usmjereno na prostor primorskih Dinarida, ni rezultate ne možemo tumačiti izvan tih okvira, jer je moguće da bi određeni broj vrsta koje nisu uključene u glavni uzorak (bilo zbog toga što ne rastu na tome prostoru, bilo zbog svoje nedostupnosti), promijenilo sliku dobivenu analizom rezultata. Uzorak bi, sad kad znamo kakve će se poteškoće javljati tijekom morfoloških i molekularnih istraživanja, trebalo dopuniti prvenstveno jednakolisnim, «izofiloidno-heterofiloidnim»

vrstama nejasne filogenije bez obzira na njihovu biogeografiju (preostale vrste Damboldtove grupe *Isophylla* i agregata *Pyramidalis*; *C. morettiana*), a zatim i morfološki sličnim vrstama stare sekcije *Rapunculus* (*C. raineri*, *C. zoysii*, *C. arvatica*, *C. adsurgens*), te naposljetku i izoliranim vrstama koje spominju Flora Kine ili Flora Irana. Bez uporabe svih dostupnih metoda i integralnog tumačenja rezultata neće biti moguće načiniti ponovnu klasifikaciju roda, niti donijeti konačne zaključke o srodnosti njegovih članova. Eddie i Ingrouille kažu (1999): «Sve ukazuje na to da intuitivni eklektički pristup korištenjem svih raspoloživih podataka može biti najbolji put postavljanju zadovoljavajućih filogenetičkih hipoteza.»

#### **5.4. Korologija i biogeografija jednakolisnih i raznolisnih zvončića primorskih Dinarida s osvrtom na geološku prošlost zapadnog Balkana i okojadranskog područja**

Ekološke i biogeografske analize vrlo su korisne u rješavanju filogenije i klasifikacije zvončića (*Campanuloideae*), posebno biogeografija (Eddie 1984), koja se bavi analizama uzroka sistematskih i distribucijskih činjenica tijekom promjena vremena i prostora. Korologija, kao znanost o arealima, dugo je vremena bila sastavnim dijelom fitogeografije i taksonomije, iz jednostavnog razloga što svojta bez svog područja rasprostranjenosti nije vrijedna prepoznavanja (Löve 1967): nedvojbeno je utvrđeno da areal odražava povijest vrste i njenu evolucijsku divergenciju.

Rasprostranjenost roda *Campanula* na Zemlji jasno je prikazao Kolakovski (1986, te u Meusel i sur. 1992ab): najraznovrsnije je razvijen na zapadu Eurazije, posebno u južnoj i srednjoj Europi, te oko Sredozemnog mora. Središta razvitka su u meridionalnoj i submeridionalnoj Europi te u prednjoj Aziji: dominiraju Alpe, ilirsko-balkanske planine i Kavkaz. Različite stjenovite i šljunkovite zvončike Alpa u širem smislu, pa tako i naših Dinarida, pripadaju hazmofitskoj flori koja nastanjuje staništa od same obale mora do visokih planina (sastav vrsta roda *Campanula* na području zapadnog Balkana, okojadranskog prostora i Hrvatske detaljnije je opisan u preglednom članku Kovačić 2004). Naši zvončići ne dominiraju nijednom određenom ekološkom nišom i gdje god se pojave pod jakim su utjecajem kompeticije drugih porodica kritosjemenjača. Te biljke gotovo nikad nisu zabilježene u čistim populacijama, niti dominiraju nekom vegetacijom. Jedino kao hazmofiti, te na suhim

vapnencima uopće, imaju određenih kompetitivnih prednosti, vjerojatno zbog svoje razvojne plastičnosti, podzemnih pohrambenih organa (*caudex*) i fino razgranjenog korijenovog sustava (Eddie 1998).

Areali većine interesnih svojiti u ovome radu pokazuju snažan biogeografski afinitet prema srodstvenoj skupini kojoj pripadaju: to se, naravno, ne može dobro vidjeti u slučaju vrsta skupine *Rotundifolia*, jer su zastupljene s premalim uzorkom svojiti. Vrste serije *Garganicae* su obvezni hazmofiti – mada ne i heliofiti, kao što se često navodi u literaturi! – vapnenjačkih stijena većih nadmorskih visina, a nastanjuju i slična otočna staništa na koja su se uspjele proširiti (*C. fenestrellata* ssp. *istriaca* na Krku, *C. portenschlagiana* na Pelješcu i Braču). S druge strane, tipične vrste agg. *Rotundifolia* pripadnice su kontinentalnih, mahom planinskih fitocenoza krških livada, pašnjaka, točila i pukotina stijena, sasvim nepoznate na otocima naše obale Jadrana. To bi donekle išlo u prilog *nunatak*-teoriji rekolonizacija u razdobljima interglacijala (prikazano u Schönswetter i sur. 2002), no kako na hrvatskim i okojadranskim prostorima i nije bilo oledbi u punom smislu, i prije provedenih sistematskih molekularnih istraživanja, o tome možemo samo spekulirati. Ipak, ako su u refugijima («nunatacima») preživljavale jedna za drugom nove i nove populacije *C. rotundifolia*, koje su se doseljavale tijekom interglacijala i u glacijalima ostajale zarobljene ledenim «jezicima» i ledenjacima da bi se tako «u valovima» periodički širile i donosile nov genetički materijal, trebalo bi provesti veoma široko, sve-europsko uzorkovanje za potrebe molekularne analize (AFLP-fingerprinting), kako bi se (eventualno) došlo do jasnije slike o raspodjeli genetičkog materijala unutar mnoštva «malih vrsta» ovog velikog i iznimno šarolikog kompleksa.

Distribucija jadranskog (apeninsko-balkanskog) kompleksa serije *Garganicae* pokazuje da je do diferencijacije došlo uslijed geografske izolacije. Najizrazitije su izolirane *C. garganica* i *C. reatina* te *C. debarensis*, dok su ostale vrste međusobno odijeljene sinklinalama, koje su još i u pleistocenu mogle biti barijere za kontakt vrsta): *C. fenestrellata* i *C. portenschlagiana* širokim prostorom od kanjona Zrmanje na sjeveru do kanjona Cetine na jugu; *C. portenschlagiana* i *C. poscharskyana* prostorom od kanjona Neretve na sjeveru do kanjona Omble na jugu; širenje *C. poscharskyana* na jug priječi bokokotorski zaljev, tako da je *C. debarensis* sasvim izolirana na području grada Debra u zapadnoj Makedoniji, uz albansku granicu gdje rijeka Radika utječe u Crni Drim, te planinama Jablanici, Stogovu i Karaormanu. *Campanula reatina* ostala je izolirana na okomitim klisurama Riatskog gorja (središnji Apenini), a *C.*

*garganica* na Monte Garganu, s izrazito disjunktivnim srođnicima (vjerojatno ne i podvrstama, kao što su parcijalni rezultati Park i sur. pokazali) *cephallenica* na Kefaliniji i *acarnica* u Akarniji (Jonsko more). Pojedini prijelazni morfološki oblici raspoređeni su ovisno o geografskoj distribuciji: njihov današnji raspored treba povezati s paleogeografskim prilikama iz doba miocena (prije 25–5 milijuna godina) i pliocena (prije 5–2 milijuna godina) na tom dijelu Jadrana (usp. Blondel i Aronson 1999), kad je čitav balkanski areal zvončića bio povezan, a spekuliralo se i s puno kasnijim postojanjem kopnenog mosta s Mt Garganom, tzv. montegargansko-palagruškog ili dalmatinskog mosta.

*Campanula fenestrellata* sa svojim podvrstama subsp. *fenestrellata* i subsp. *istriaca* jasno su odvojene od ostatka izofilnih vrsta, živeći na priobalnim planinama sjeverne Dalmacije, a i jedine su dvije svojte Garganicae čiji se areali manjim dijelom preklapaju (sjeverni Velebit), gdje nastaju intermedijerne forme. Pojava jasnih intermedijera, te činjenica da su se njihove RFLP sekvence kloroplastne DNA, te ITS sekvence jezgrine DNA pokazale identičnima, ipak podupiru prepoznavanje tih dviju svojti na razini podvrsta. Nasuprot tome, *C. debarensis* biogeografski je oštro odvojena od središnje jezgre Garganicae, a i morfološki se i filogenetički pokazuje vrlo različitom od para *fenestrellata-istriaca*, te je doista ispravnije ponovo je tretirati na razini vrste, kao *C. debarensis* Feer, kao što to čine Lovašen-Eberhardt i Trinajstić (1978) i predlažu Park i sur. (u pripr.).

Filogenetički položaj *C. portenschlagiana*, zbog svojih zvončastih vjenčića jedinstvene vrste unutar Garganicae, čini se udaljenim od ostatka svojti, makar bez sumnje pripadnikom iste razvojne linije. Taj biokovski endem oblikom cvijeta slični vrstama kao što je *C. sartorii* sa Ciklada ili čak zvoncima roda *Edraianthus*, prije nego ostalim vrstama serije Garganicae.

Kako je *Campanula reatina* otkrivena relativno nedavno, još nema pokusnih križanja s ostalim svojtama kruga Garganicae, što je potencijalno vrlo zanimljivo. Kao što i morfološki dijeli izvjesne karakteristike s linijama *C. fenestrellata* i *C. garganica*, *C. reatina* je i molekularno negdje «u sredini». Rezultati RFLP sekvenci cpDNA u ovom istraživanju pokazuju određenu izdvojenost *C. reatina* od ostatka vrsta ser. Garganicae ili u najboljem slučaju njenu slabu srodnost s linijom *C. fenestrellata*, dok rezultati Park i sur. (u pripr.) pokazuju tek umjerenu srodnost s *C. (garganica subsp.) cephalenica* i *C. poscharskyana*. Redoslijed ulančavanja ukazuje i na trajanje izolacije, a time i potencijalnu duljinu specijacije, što smo detaljno objasnili u radu Park

i sur. (u priprav.). *Campanula garganica* morfološki je najbližnja, a čini se i najrodnija (pokusi recipročnog križanja, RFLP cpDNA, ITS nDNA) s našim dubrovačkim zvončićem (*C. poscharskyana*). Tu su posebno važni Damboldtovi pokusi križanja, jer *C. poscharskyana* ne hibridizira niti s jednom drugom vrstom kruga Garganicae, dok autogamna *C. garganica* subsp. *garganica* daje klijave sjemenke (iako uglavnom sterilne križance) križajući se s *C. fenestrellata* subsp. *fenestrellata* i subsp. *istriaca*. Prema tim podacima, te priobalnoj prekojadranskoj rasprostranjenosti, izgleda da je areal tih dviju srodnih vrsta dugo bio zajednički, tj. pripadao je istoj pra-vrsti (Trinajstić u Lovašen-Eberhardt i Trinajstić 1978), a današnji otklon ukazuje na tektoniku i odmicanje zapadne i istočne strane Jadrana u različitim smjerovima.

Za razliku od međusobno oštro izoliranih vrsta ser. Garganicae (isto se odnosi i na ostale dvije nekadašnje podskupine Isophylla: Elatines i Fragiles), raznovrsne Rotundifoliae zapadnog Balkana nerijetko dijele staništa (npr. *C. scheuchzeri*, *C. marchesettii*, *C. velebitica* s.l., *C. witasekiana*). Također, za razliku od Isophylla, srodstveni krug *C. rotundifolia* višestruko je poliploidan i široke rasprostranjenosti, a sastoji se od vrlo mladih i jako starih svojti. Pogledi se na podsistematiku te skupine znatno razlikuju (usp. Podlech 1965, Kovanda 1970a, Geslot u Greuter i Burdet 1984). Prema Podlechu (1965) skupina Rotundifolia ima veze s grupama koje je obrađivao Damboldt (1965a), a posebno vrstama *C. fragilis*, *C. garganica* i *C. morettiana*, čije je središte rasprostranjenosti u planinama južne i središnje Europe. Još je Fedorov pokazao da se 2n-, 4n- i 6n-poliploidi serije Vulgares međusobno križaju bez ikakvih poteškoća, no ni Damboldt (1965a) nije imao problema u križanju 2n=34 svojti grupe Isophylla (morfološki, to potomstvo dijeli karakteristike oba roditelja i do neke je mjere fertilno). Kovanda i Ančev (1989) pak smatraju da diploidni relikti i kalcifilni hazmofiti *C. cochleariifolia* i *C. jordanovii*, ograničeni samo na Balkanski poluotok, skupa s poliploidima *C. scheuchzeri* i *C. velebitica* s.l. demonstriraju fitogeografske veze roda *Campanula* i s jugoistočnoeuropskim i sa srednjoeuropskim florama.

*Campanula pyramidalis* karakteristični je element sredozemne vegetacije istočnog Jadrana, ali zalazi i dublje u kontinent i visoko u planine («*C. kapelae*», Topić i Ilijanić 2005). Bliski srodnik, *C. versicolor*, vrlo je neobične, južnobalkansko-južnoapeninske rasprostranjenosti, dok je sasvim disjunktna *C. secundiflora* poznata s malog broja lokaliteta u Srbiji i Crnoj Gori. Baš kao i mnoge druge srodstvene linije roda *Campanula*, ni agregat Pyramidalis nije temeljitije istražen (Zimmer 1982ab), što donekle čudi, s obzirom na to da je bar *C. pyramidalis* u kulturi od 16. stoljeća i npr. u

Engelskoj naturalizirana vrsta (Crook 1951). Osim da je vrlo polimorfan i sastavljen od velikog broja nižih svojiti nepoznata sistematskog položaja (npr. *C. staubii*, *C. plasonii* te novoopisana *C. kapelae*), o filogeniji razvojne linije *Pyramidalis* zapravo se malo zna.

Vrste agregata *Waldsteiniana* oduvijek se smatraju disjunktnima: *C. tommasiniana* nastanjuje masiv Vele i Male Učke u Istri na visinama do 1400 m, dok je središte šire rasprostranjene *C. waldsteiniana* na primorskim obroncima Velebita (700-1650 m/nm), uz nekoliko lokaliteta u Bosni i Hercegovini te jednim u Sloveniji. Koliko je (dosad) poznato, te se dvije vrste nigdje u prirodi ne susreću, iako u uzgoju daju sasvim plodno potomstvo.

## **5.5 Starost i mogući razvitak okojadranske flore s osvrtom na rod *Campanula***

Zapanjujuća karakteristika većina grupa biljaka i životinja Sredozemlja je visok stupanj endemičnosti, koji je rezultat vrlo složene povijesti. Jako su važni dugi, uski poluotoci i izolirane planine, te ogroman arhipelag, uz visoke geografske i ekološke barijere među njima: tako sredozemne planine pokazuju čak do 43% endemičnosti među višim biljkama (Blondel i Aronson 1999). Čitavo je područje bilo – i još je – razdvajano na otoke, poluotoke i planine, pa ponovo spajano s kontinentom mnogo puta tijekom svoje povijesti, da bi konačno dobilo današnji oblik prije oko pet milijuna godina (Blondel i Aronson 1999), no okojadranski je prostor zajedno s morem puno mlađi. Jašić i suradnici (1999) temeljem novih spoznaja o jadranskoj platformi, geotektonskim i morfostrukturnim značajkama dna Jadrana raspravljaju o međuovisnosti oblikovanja sukcesije Jabučke potoline i Palagruškog praga, koji u strukturno-geomorfološkom pogledu predstavljaju jedinstveni Srednjojadranski prag. Oblikovanje tog osnovnog prostora počinje u starijem tercijaru, a tijekom alpske orogeneze (mlađi tercijar) oblikuju se obrisi dinarskih, apeninskih i alpskih subdukcijskih sustava, dok je jadranska platforma otplutala prema sjeveru. Reljef Dinarida kakav danas poznajemo star je tek oko 20.000 godina (tj. pretpostavlja se da je mlađi od posljednjeg ledenog doba): bazeni bliže Dinaridima mlađi su, nastajući u paleogenu i neogenu, a bliže Apeninima u neogenu i kvartaru. Kopnena veza između Apulije i Albanije prekinuta je tek krajem pliocena (prije 3 milijuna godina), a srodnost

flore i faune na Monte Garganu i našoj obali upućuje na to da je u prošlosti više puta dolazilo ili do kopnene veze suprotnih obala, ili su razdaljine među njima nizom otoka bile tako smanjene tako da su različiti organizmi mogli migrirati. Rubić (1952) piše: "Od Monte Gargana u Italiji do Stonskog rata (Pelješac) na našoj obali proteže se, u dužini od 150 km, u širini od oko 50 km i u dubini od 100 do 150 m, jedna podmorska stepenica, sa koje se dižu Vrhovnjaci, Donji Školji, Lastovo, Sušac, Palagruža, Pianosa i Tremiti: ukupno 4 otoka, 16 otočića, 10 grebena i 3 sike." Također, u istočnojadranskom primorju utvrđeno je dvadesetak svojiti koje pripadaju zapadnomediteranskom flornom elementu, koji svoju istočnu granicu dosežu na tirenskim obalama Apeninskog poluotoka, na Siciliji i u Tunisu. Smatralo se da je prodor tih vrsta prema istoku, na obale Balkana, uslijedio posredstvom tercijarnih kopnenih veza, montegargansko-palagruškog i otrantskog spoja. Novija istraživanja (Šegota 1982-1983, Prelogović i Kranjec 1983, Mantovani i sur. 1992), međutim, pokazuju da su dvije obale Jadrana u dalekoj prošlosti mogle biti samo udaljenije, a more dublje, te postojanje kopnenog «mosta» na tom području nije bilo moguće. Stoga su areali srodnih vrsta oko Jadrana ili morali biti razdvojeni puno prije nego se to nekad smatralo (refugiji na južnim rubovima velikih poluotoka tijekom oledbi), ili su postojali drugačiji načini rasprostranjivanja biljnih vrsta (ptice, vjetar... čovjek?).

Iako je sredozemni tip klime uspostavljen prije otprilike 3,2 milijuna godina, velika serija fluktuacija obilježila je posljednja 2,5 milijuna godina. Te drastične promjene klime imale su dalekosežne posljedice na današnji raspored vrsta i zajednica Sredozemlja. Izmjene ledenih doba i međuoljedbenih razdoblja više-manje pravilno se izmjenjuju u ciklusima od po 100.000 godina, a u vremenskim razdobljima od 1000-10.000 godina izmjenjuju se regionalne flore i faune u skladu s klimatskim promjenama, tako da današnje imaju tek kratku povijest od nekoliko tisuća godina. Analize polenskih nakupina pokazale su da su čak i tijekom najekstremnijih glacijala postojali mnogobrojni refugiji biljaka i životinja na obroncima planina, velikim poluotocima (Iberski, Apeninski, Egejski, Anatolski) i otocima, te u dolinama velikih rijeka (za naše područje odlične prikaze daje Šoštarić 2004, 2005). Sredozemno je područje bilo puno veće i ekološki kompleksnije nego što je danas, kao rezultat toga što je na cijeloj planeti razina mora bila 100-150 m niža nego danas. Tijekom interglacijala biljke i životinje opet su se širile na sjever bez napuštanja Sredozemne regije tako su mnoge borealne vrste dodane današnjoj sredozemnoj flori jednostavno tu ostale i nakon zatopljenja. Mnoge su se vrste do neke mjere izdiferencirale, nakon

što su im areali bili razdijeljeni u nekoliko sredozemnih refugija: mnogobrojne diferencijacije, vikarizmi i endemizmi različitih vrsta rezultat su duge evolucije Sredozemlja od mezozoika do danas.

Puno specijacija na Sredozemlju svakako je starije nego što se to prije mislilo i može se povezati s rastavljanjima i sastavljanjima mikroploča tijekom Paleogena i donjeg Neogena, tj. od prije 65 do prije oko 35 milijuna godina (Blondel i Aronson 1999). U tom se razdoblju možda diferenciraju i preci današnjih zvončića, a možda su to čak bili izravni preci današnjih «izofiloidno-heterofiloidnih» vrsta. Ne postoji rod koji bi se danas mogao smatrati izvornim za ostale unutar uže shvaćenih kampanuloida: neki su zadržali primitivnije karakteristike od drugih, ali za ni jedan se ne može tvrditi da je najstariji (arhetip). I najprimitivniji živi rodovi pravih «kampanuloida» (*Legousia*, *Musschia*, i *Trachelium*), koji danas žive na području Sredozemlja i Makronezije, pokazuju mnoge “napredne” karakteristike, uglavnom povezane s adaptacijom na više nadmorske visine. Iz te se drevne skupine vjerojatno razvila i rapunkuloidna grupa zvončića (npr. rodovi *Rapunculus* i *Gadellia*), no također i “izofiloidi” u smislu Eddieja (i sur. 2003). Ključ razumijevanja razvitka i cijepanja nekad zajedničkih areala pra-vrsta zvončića od kojih su nastali jednakolisni i raznolisni zvončići, te njihovog daljnjeg samostalnog razvitka vjerojatno leži u istraživanju evolucije i puteva kolonizacije izofiloidno-heterofiloidnih vrsta sjeverne Zemljine polutke. Filogenetska povijest vrsta i molekularni sat o kojem ovisi stupanj evolucijskih promjena jako variraju kod različitih filogenetskih skupina, stoga se nikako ne može sa sigurnošću tvrditi kad su se izdiferencirale odvojene svojte (Park i sur. u priprav.). Sigurno je samo da su se u davna vremena geografskom izolacijom na “paleo-otocima” stvorili uvjeti za diferencijaciju i biljnih i životinjskih vrsta, a upravo je naš, sjeveroistočni kvadrant Sredozemlja prostor u kom se razvilo najveće bogatstvo geoloških oblika.

Povijest sredozemne flore (Blondel i Aronson 1999) i unutar nje Hrvatske (Trinajstić 1991) relativno su dobro poznati, no gdje su u tome vrste roda *Campanula* od interesa u ovom istraživanju? Te su razvojne linije vrlo vjerojatno u srodstvenom pogledu danas veoma udaljene, što ne znači da nisu imale zajedničkih predaka: poglavito se to odnosi na linije Garganicae i Rotundifolia. Puno starije Garganicae ostaci su pradavnog, možda kasno-tercijarnog ili bar pliocenskog areala pra-jednakolisne vrste (ili više predačkih populacija) koja je tijekom toplijeg razdoblja bila

rasprostranjena velikim dijelom negdašnjeg pra-kopna od kojega će nastati Europa, a još je zauzimala kompaktno područje za vrijeme Velike slane krize (prije oko 5 milijuna godina)<sup>11</sup>. U kasnijim razdobljima, podizanjem planinskih i morskih barijera te naizmjeničnim zahlađenjima, areal pra-vrste višestruko se cjepkao, a novonastale forme polako evoluirale i prilagođavale se uvjetima života u refugijima (topla staništa u pukotinama stijena, klisure okrenute moru, strmci rječnih kanjona), što je moglo ići i relativno brzo.

Neobične vrste *Campanula* koje sam u ovome radu nazivala «nalik-jednakolisnima» (izofiloidi) ili «nalik-raznolisnima» (heterofiloidi) vrlo su vjerojatno još starijeg postanka (zvjezdasto-kolasti tip cvijeta vrlo je primitivan): odličan su primjer za to *C. carpatica* i *C. raineri*, dvije danas iznimno disjunktne vrste koje se, zapravo, morfološki međusobno razlikuju samo u postojanju (*C. carpatica*) odnosno nepostojanju (*C. raineri*) cvjetne stapke. Te bi vrste mogle potjecati i od zajedničkih predaka jednako- i raznolisnih zvončića, jer nisu postrane razvojne linije niti jedne od njih.

Nasuprot tome, tijekom hladnijih razdoblja daleko na jug Europe mogle su pristizati – temeljno sjevernjačke, mlađe i sklone poliploidiji – populacije *Campanula rotundifolia* s.l., koje su ostajale zarobljene na hladnijim staništima (planinski pašnjaci, livade, šumske pukotine stijena) tijekom međuoldbi, ali se i prilagođavale umjerenijem okolišu. Sa svakom oledbom pristizale bi nove populacije i novi bi se oblici razvijali u refugijima nakon zatopljavanja klime. Pojedine danas dobro konzervirane okruglolisne svoje kao što su *C. hercegovina* ili *C. cespitosa* svakako bi mogle pripadati tim starijim kolonizatorima, dok su vrste kao što je *C. cochleariifolia* možda najstarije, ako ne i sasvim izdvojenog postanka od agg. *Rotundifolia*.

U velikom mnoštvu vrsta i silnoj raznolikosti roda *Campanula* (koji treba cjelovitu reviziju) otvorenih je pitanja daleko više od riješenih. Ovo je istraživanje tek malen doprinos poznavanju razvitka zvončića i mogućim načinima kolonizacije današnjih primorskih Dinarida i okojadranskog bazena, te se uz stalno pridodavanje vrsta i suradnju većeg broja stručnjaka različitih područja nastavlja i dalje.

---

<sup>11</sup> Prema Park i sur. (u priprav.), postanak razvojne linije Garganica procijenjen je između (11,16–) 7,99 (–4,84) i (2,49–) 1,78 (–1,08) milijuna godina, dok je razdvajanje vrsta počelo između (5,76–) 3,62 (–1,49) i (1,29–) 0,81 (–0,33) milijuna godina. Prekojadranska disjunkcija (*C. reatina*, *C. poscharskyana*, *C. garganica* subsp. *garganica*, i *C. g.* subsp. *acarnanica*) mogla je nastati između (4,60–) 3,05 (–1,23) i (1,03–) 0,68 (–0,33) milijuna godina (procijenjeno DIVA 2.0 programom).

## 6. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenih usporedno-morfoloških i molekularnih istraživanja dvadesetak vrsta izofilnih, heterofilnih i «izofiloidno-heterofiloidnih» zvončića (*Campanula* L.) šireg prostora primorskih Dinarida možemo zaključiti:

1. Nedvojbeno se radi o nekoliko odvojenih razvojnih linija porodice *Campanulaceae* koje se međusobno dobro razlikuju: to su skupine *Garganicae*, *Rotundifolia*, te *Waldsteiniana* i *Pyramidalis*.
2. Korelacije mjerenih svojstva cvjetova s vremenskim slijedom uzorkovanja i geografskim koordinatama lokaliteta nisu se pokazale značajnima, što upućuje na to da je razvitak cvijeta pod snažnim genetičkim utjecajem.
3. Sistematska «skupina *Isophylla*», koja se smatra monofiletičkom još od klasičnih radova Damboldta (1965a, 1968), treba biti revidirana: njena nekadašnja podskupina (serija) *Garganicae*, predstavnika rasprostranjenih prvenstveno hrvatskim primorskim planinama, zasigurno je zasebna razvojna linija jednakolisnih zvončića, bez izravnih veza s *C. isophylla*, tipičnim predstavnikom podskupine (serije) *Fragiles* (s. Damboldt).
4. *Campanula reatina*, riatski endem nepoznat u Damboldtovo doba, pravi je pripadnik serije *Garganicae*.
5. Raznolisna skupina (agregat) *Rotundifolia* (s. Kovanda 1970a) vjerojatno se također ne može smatrati monofiletičkom u sadašnjem opsegu: dok se većina raznolisnih zvončića uključenih u ovo istraživanje nije mogla razlučiti metodama usporedbene morfometrije cvjetova niti molekularnim metodama, pokazalo se da
6. *Campanula cochleariifolia* možebitno i nije pripadnica razvojnog kruga *C. rotundifolia* s.l. kao ostale istraživane raznolisne vrste.
7. Zvončići uvjetno nazvani «izofiloidnima» (agg. *Waldsteiniana* i *Pyramidalis*) doista se nalaze negdje između izofilnih i heterofilnih, no molekularne metode pokazuju da bi i međusobno mogli biti izravno srodni, što se dosad nikad nije razmatralo. Usprkos međusobnoj velikoj morfološkoj različitosti i građi cvijeta na tragu izofilnih vrsta, «izofiloidne» se vrste čine potomcima istog dalekog pretka, koji je možda prije bio zajednički s raznolisnima («heterofiloidi»).

## 7. LITERATURA

- Adamović, L., 1909: Die Vegetationsverhältnisse der Balkanländer. U: Engler i Drude: Die Vegetation der Erde 11. Leipzig.
- Adamović, L., 1911: Die Pflanzenwelt Dalmatiens. Verlag Dr. W. Klinkhardt, Leipzig.
- Adamović, L., 1929: Die Pflanzenwelt der Adrialänder. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Ančev, M.E., 1994: *Campanula* L. in the Bulgarian flora: taxonomy and evolution. God. Sofiisk. Univ. Kliment Ohridski, Biol. Fak., 2(85): 193-197.
- Angiosperm Phylogeny Group, 1998: An ordinal classification for the families of flowering plants. Ann. Missouri Bot. Gard. 85: 531-553.
- Angiosperm Phylogeny Group, 2002: An update for the APG classification for the orders and families of flowering plants (APG II). Bot. J. Linnean Soc.
- Avetisjan, E., 1986: Palynomorphology of the families *Campanulaceae*, *Sphenocleaceae* and *Pentaphragmaceae*. Bot. Žurn. (Moskva - Lenjingrad) 71: 1003-1010. (Rus.)
- Beck-Managetta, G., 1901: Die Vegetationsverhältnisse der illyrische Länder. Leipzig.
- Beck-Managetta, G., Maly, K., Bjelčić, Ž. (ur.) 1950-1983: Flora Bosnae et Hercegovinae. 4 Sympetalae. Zemaljski muzej, Posebno izdanje 44-50. Sarajevo.
- Bentham, G., Hooker, J.D., 1876: *Campanulaceae*. U: Genera Plantarum 2: 541-564.
- Benton, M., 1993: The Fossil Records 2. Chapman & Hall, London.
- Bernini, A., Marconi, G., Polani, F., 2002: Campanule d'Italia e dei territori limitrofi. Verba & Scripta s.a.s., Pavia.
- Bielawska, H., 1964: Cytogenetic relationships between lowland and montane species of *Campanula rotundifolia* L. I. *C. cochleariifolia* Lam. and *C. rotundifolia* L.. Acta Soc. Bot. Polon. 33(1): 15-44.
- Bielawska, H., 1972: Cytogenetic relationships among some palearctic and nearctic tetraploid taxa of the *Campanula rotundifolia* L. group. Acta Soc. Bot. Polon. 41(2): 293-300.
- Bielawska, H., 1973: Self-fertilization in *Campanula rotundifolia* s.l. group. Acta Soc. Bot. Polon. 42: 253-264.
- Blondel, J., Aronson, J., 1999: Biology and Wildlife of the Mediterranean Region. Oxford University Press.
- Böcher, T.W., 1960: Experimental and cytological studies on plant species. V. The *Campanula rotundifolia* complex. Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk. 11(4): 1-69.
- Böcher, T.W., 1963: A cytologically deviating west-alpine *Campanula* of the *C. rotundifolia* - group. Botaniska Notiser (Lund) 116: 113-121.
- Boissier, E., 1875: Flora Orientalis III. Geneve and Basel.
- Borbás, V., 1883: Zur Flora von Istrien, Ungarn and Kroatien. Öster. Bot. Zeitsch. 33: 1-132.
- Brullo, S. 1993: *Campanula marcenoi* (Campanulaceae), a new species from Sicily. Candollea 48(2): 493-500.

- Buzas, G., 1998: Provisorischer Schlüssel für die österreichischen Arten von *Campanula* subsect. *Heterophyllae*. Fl. Austr. Novit. 5: 19-25.
- Candolle, A.L.P.P. de, 1830: Monographie des Campanulees. Paris: Veuve Desroy 1-8. pp 384
- Carlström, A., 1986: A revision of *Campanula drabifolia* complex (Campanulaceae). Willdenowia 15: 375-387.
- CARNOY 2.0., 2003: Laboratorij za biljnu sistematiku Leuven. Sveučilište u Leuwenu, Belgija. [<http://www.kuleuven.ac.be/bio/sys/carnoy/>].
- Conover, W.J., 1980: Practical nonparametric statistics. John Wiley & Sons, New York.
- Contandriopoulos, J. 1984: Differentiation and evolution of the genus *Campanula* in the Mediterranean region. U: Grant, W.F. (ur.): Plant Biosystematics. Academic Press Canada.
- Cosner, M. E., Jansen, R. K., Lammers, T. G., 1994: Phylogenetic relationships in the *Campanulaceae* based on *rbcL* sequences. Plant Syst. Evol. 190(1-2): 70-95.
- Cosner, M.E., Raubeson, L.A. Jansen, R.K., 2004: Chloroplast DNA rearrangements in *Campanulaceae*: Phylogenetic utility of highly rearranged genomes. Molec. Phylogenet. Evol.
- Cronquist, A. 1988: The evolution and classification of flowering plants, Bronx, New York; New York Botanical Garden.
- Crook, H.C., 1951: Campanulas – their Cultivation and Classification. Country Life Ltd. Charles Scribner's Sons, London-New York.
- Dafni, A., Kevan, P.G., 1997: Flower size and shape: implications in pollination. Israel Journ. Plant Sci. 45(2-3): 201-212.
- Dahlgren, R.M.T., 1980: A revised system of classification of the angiosperms. J. Linn. Soc. Bot. 80: 91-197.
- Damboldt, J., 1965a: Zytotaxonomischen Revision der isophyllen Campanulae in Europa. Bot. Jb. 84(3): 302-358.
- Damboldt, J., 1965b: *Campanula tommasiniana* Koch und *C. waldsteiniana* R. et S.: Zur taxonomie zweier mediterraner Reliktsippen. Österr. Bot. Zeitschr. 112: 392-406.
- Damboldt, J., 1968: Kurzer Nachtrag zur "Zytotaxonomischen Revision der isophyllen Campanulae in Europa". Bot. Jb. 2(88): 200-203.
- Damboldt, J., 1978: *Campanula* L. U: Davis, P.H. (ur.): Flora of Turkey and the East Aegean Islands. 6: 2-64. Univ. Press, Edinburgh.
- Degen, A., 1938: *Campanula* L. U: Flora Velebitica 3: 93-105. Verlag der Ungarn. Acad. Wiss., Budapest.
- Domac, R., 1994: Flora Hrvatske – priručnik za određivanje bilja. Školska knjiga, Zagreb.

- Dunbar, A., 1975: On pollen of *Campanulaceae* and related families with special reference to the surface ultrastructure. I. *Campanulaceae* subfam. *Campanuloideae*. Bot. Not. 128: 73-101.
- Dunbar, A., Wallentinus, H.-G., 1976: On pollen of *Campanulaceae*. III. A numerical taxonomy investigation. Bot. Not. 129: 69-72.
- Dunbar, A., 1984: Pollen morphology in *Campanulaceae*. IV. Nord. J. Bot. 4: 1-19.
- Eddie, W.M.M., 1984: A systematic study of the genus *Musschia* Dumortier, with reference to character diversity and evolution in the *Campanulaceae* - *Campanuloideae*. M.Sc. Thesis, University of Reading, England (UK).
- Eddie, W.M.M., 1998: A global reassessment of the generic relationships in the bellflower family (*Campanulaceae*). PhD Thesis, University of Edinburgh, Scotland (UK).
- Eddie, W.M.M., 2000: *Campanula* L. U: Cullen, J. i sur. (ur.): The European Garden Flora 6: 466-476. Cambridge Univ. Press.
- Eddie, W.M.M., Ingrouille, M.J., 1999: Polymorphism in the Aegean "five-loculed" species of the genus *Campanula*, section *Quinqueloculares* (*Campanulaceae*). Nordic J. Bot. 19(2): 153-169.
- Eddie, W.M.M., Kovačić S., 2004: The optimistic in pursuit of the elusive: a progress report and review of evolutionary and classification studies of the *Campanulaceae*. Knjiga sažetaka 107-108. Prvi hrvatski botanički simpozij, Zagreb, 30. rujna–3. listopada 2004.
- Eddie, W.M.M., Shulkina, T., Gaskin, J., Haberle, R.C., Jansen, R.K., 2003: Phylogeny of *Campanulaceae* s.str. inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Ann. Missouri Bot. Gard. 90: 554-575.
- Everitt, B.S., 1981: Cluster analysis. Heinemann Educational Books. London.
- Favarger, C., Contandriopoulos, J., 1961: Essai sur l'endemisme. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 71: 384-408.
- Fedorov, A. A., 1957: *Campanulaceae*. U: Šiškin, B.K., Bobrov, E.G. (ur.): Flora SSSR 24: 126-450.
- Fedorov, A.A., Kovanda, M., 1976: *Campanula* L. U: Tutin, T.G. i sur. (ur.): Flora Europaea 4: 74-93. Cambridge Univ. Press.
- Feer, H., 1890: Campanularum novarum decas prima. Jour. Bot. 28: 268-284.
- Fiori, A., 1927: Nuova flora analitica d'Italia, Vol. 2. Ricci, Firenze.
- Botanički zavod-PMF, FER-ZPM, 2005: FLORA CROATICA DATABASE – Taksonomija i bibliografija vaskularne flore Hrvatske. Sveučilište u Zagrebu. [<http://hirc.botanic.hr/fcd/search.aspx>].
- Frizzi, G., Pomponi, C., Tammaro, F., 1987: Indagini elettroforetiche su popolazioni naturali di campanule isofille (gen. *Campanula* L.) dell'Italia centro-meridionale e Dalmazia. Inform. Bot. Ital. 19(3): 437-440.

- Frizzi G., Tammaro, F., 1991: Electrophoretic study and genetic affinity in the *Campanula elatines* and *C. fragilis* (Campanulaceae) rock-plants group from Italy and W. Yugoslavia. *Pl. Syst. Evol.* 174(1-2): 67-73.
- Gadella, T.W.J., 1964: Cytotaxonomic studies in the genus *Campanula*. *Wentia* 11: 1-104.
- Gadella, T.W.J., 1967: The taxonomic significance of two artificially produced hybrids of the genus *Campanula*. *Acta Bot. Neerl.* 21: 605-608.
- Geslot, A., Medus, J., 1974: Quelques remarques sur les relations entre morphologie pollinique et polyploidie dans le genre *Campanula* sous-section *Heterophylla*. *Rev. Paleobot. Palynol.* 17: 233-243.
- Geslot, A., 1980: Biometrie des Graines et Nombres Chromosomiques dans la Sous-Section *Heterophylla* du genre *Campanula* (Campanulaceae). *Plant Syst. Evol.* 134: 193-206.
- Geslot, A. 1984: *Campanula* L. U: Greuter, W. i sur. (ur.): *Med-Checklist* 1: 123-145. Geneve – Berlin-Dahlem.
- Grant, V., 1949: Pollinating systems as isolating mechanisms. *Evolution* 3: 82-97.
- Greuter, W., 2003: Source data for floristics and flora writing in the Balkans: an overview. Book of abstracts, 25-32/ 3<sup>rd</sup> International Balkan Botanical Congress "Plant Resources in Creation of New Values", Sarajevo, May 18-24 2003.
- Gutermann, W., 1961: *Campanula*-taxa. U: L. Löve, A., Löve, D. (ur.): *Chromosome numbers of Central and Northwest European Plant species. Opera Botanica (Lund)* 5: 1-581.
- Hartvig, P., 1998: *Campanula pangea*, a new species of *Campanula* Sect. *Involucratae* from Mt. Pangeon, NE Greece. *Wildenowia*, 28(1-2): 65-68.
- Hayek, A., 1931: *Prodromus florum penninsulae Balcanicae*. 2: 522-548. Verlag des Repertoriums, Berlin-Dahlem.
- Hegi, G., 1915-1916: *Illustrierte Flora von Mittel-Europa* (Hayek, A., Hegi, G.: *Campanulaceae*. U: Vol. 6(1): 328-391). A. Pichler & Sohn Verl. Wien.
- Heywood, V.H., 2003: Assessment, conservation and sustainability of the plant diversity of the Balkan peninsula. Book of abstracts, 1-11/ 3<sup>rd</sup> International Balkan Botanical Congress "Plant Resources in Creation of New Values", Sarajevo, May 18-24 2003.
- Hilu, K.W., 1983: The role of single-gene mutations in the evolution of flowering plants. U: Hecht, M.K., Wallace, B., Prance, G.T. (ur.): *Evolutionary biology* 16: 97-128. New York: Plenum.
- Hofrichter, R. (ur.), 2002: *Das Mittelmeer: Fauna, Flora, Ökologie*. Bd. 1: Allgemeiner Teil. Spektrum Akad. Vrl. Heidelberg – Berlin.
- Hong, D.Y., 1995: The geography of *Campanulaceae*: on the distribution centres. *Acta Phytotax. Sin.* 33: 521-536.
- Horvat, I., Glavač, V., Ellenberg, H., 1974: *Vegetation Südosteuropas*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.

- Hruby, J. 1930: *Campanula*-studien innerhalb der Vulgares und ihrer Verwandten. Mag. Bot. Lapok. 29: 152-276.
- Inoue, K., Amano, M., 1986: Evolution of *Campanula punctata* Lam. in the Izu Islands, Japan: changes of pollinator and evolution of breeding systems. Plant Species Biol. 1(1): 89-98.
- Inoue, K., Maki, M., Masuda, M., 1995: Different responses of pollinating bees to size variation and sexual phases in flowers of *Campanula*. Ecological Research 10(3): 267-273.
- Janzon, L.-A., 1983: Pollination studies of *Campanula persicifolia* (Campanulaceae) in Sweden. Grana 22: 153-165.
- Jašić, D., Bognar, A., Riđanović, J., 1999: Geološke i geomorfološke značajke Srednjojadranskog praga. Pomorski zbornik 37(1): 169-178.
- Javorka, S., 1924-1925: Magyar flora (Flora Hungarica). Budapest.
- Johnson, R.G., 2002: Secrets of the Ice Ages: the role of the Mediterranean Sea in climate change. Glenjay Publishing, Minnetonka-Minnesota.
- Judd, W.S., Campbell, Ch.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J., 2002: Plant systematics – a phylogenetic approach. Sinauer Ass. Inc., Sunderland.
- Junikka, L., Uotila, P., 2002: Comparison of the vascular flora of Mediterranean peninsulas on the basis of distribution mapping. Proc. Int. Congr. Syst. Evolut. Biol., Patras (Grčka), 202.
- Kobajaši, S., Inoue, K., Kato, M., 1999: Mechanism of selection favoring a wide tubular corolla in *Campanula punctata*. Evolution 53(3):752-757
- Kolakovski, A.A., 1980: Novje dannje k sistematike kolokol'čikovj'h. Saobšč. Akad. Nauk. Gruz. SSR, 98(3): 653-656.
- Kolakovski, A.A., 1986: (Carpology of the Campanulaceae and problems in their taxonomy.) Bot. Žurn. 71(9): 1155-1166. (rus.-sažetak engl.)
- Kolakovski, A.A., 1987: Sistema semeistva Campanulaceae starogo sveta. Bot. Žurn. 72(12): 1572-1579.
- Kolakovski, A.A., 1992a: *Campanula* L. U: Meusel, H. i sur. (ur.): Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora 1: 170-171. Gustav Fischer Verlag Jena – Stuttgart – New York.
- Kolakovski, A.A., 1992b: *Campanula* L. U: Meusel, H. i sur. (ur.): Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora 2: 214-219. Gustav Fischer Verlag Jena – Stuttgart – New York.
- Kolakovski, A.A., 1994: (The conspectus of the system of the Old World Campanulaceae.) Bot. Žurn. 79(1): 109-124. (rus.-sažetak engl.)
- Kovačić, S., Liber, Z., Tkalec, M., Nikolić, T., 2003: Genus *Campanula* L. in Croatian flora: Taxonomy and Evolution. Book of abstracts, 144 / 3<sup>rd</sup> International Balkan Botanical Congress "Plant Resources in Creation of New Values", Sarajevo, May 18-24 2003.

- Kovačić, S., 2004: The genus *Campanula* L. (Campanulaceae) in Croatia, circum-Adriatic and West Balkan region. *Acta Bot. Croat.* 63(2): 171-202.
- Kovačić S., Nikolić, T., 2004: Comparative floral morphometry of *Campanula Waldsteiniana* and *Rotundifolia* (Campanulaceae) aggregates. *Knjiga sažetaka* 112-113. Prvi hrvatski botanički simpozij, Zagreb, 30. rujna–3. listopada 2004.
- Kovačić S., Surina, B., 2005: Chorology of *Campanula Waldsteiniana* (Campanulaceae) Aggregate. *Zbornik sažetaka Slovenskog botaničkog simpozija*, 29. Ljubljana.
- Kovanda, M., 1970a: Polyploidy and variation in the *Campanula rotundifolia* complex. Part 1 (General). *Rozpravy Československe Akademie Ved, Rada Matematickych a Prirodnich Ved. Praha math.-natur.* 80(2): 1-99.
- Kovanda, M., 1970b: Polyploidy and variation in the *Campanula rotundifolia* complex. Part 2 (Taxonomic). 2. Revision of the groups Saxicolae, Lanceolatae and Alpicolae in Czechoslovakia and adjacent regions. *Folia Geobot. Phytotax.* 5: 171-208.
- Kovanda, M., 1977: Polyploidy and variation in the *Campanula rotundifolia* complex: part 2 (taxonomic). 2. Revision of the groups Vulgares and Scheuchzerianae in Czechoslovakia and adjacent regions. *Folia Geobot. Phytotax.* 12(1): 23 - 89.
- Kovanda, M., Ančev, M. 1989: The *Campanula rotundifolia* complex in Bulgaria. *Preslia* 61(3): 193-207.
- Kovanda, M., 1999: *Campanula x iserana* (*C. rhomboidalis* x *C. rotundifolia*), a new hybrid in *Campanula*. *Thaiszia - J. Bot. Košice* 9: 15-18
- Lakušić, D., Conti, F., 2004: *Asyneuma pichleri* (Campanulaceae), a neglected species of the Balkan peninsula. *Plant Syst. Evol.* 247: 23–36.
- Lammers, T.G., 1992: Circumscription and phylogeny of Campanulales. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 388-413.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998: *Numerical ecology*. Elsevier Science B.V. Amsterdam.
- Lewis, P., Lynch, M., 1998: *Campanulas – A Gardener's Guide*. Timber Press, Portland (Oregon).
- Liber, Z., Kovačić S., Nikolić, T., 2004: Relationships among several amphi-Adriatic *Campanula* groups (Campanulaceae) according to their chloroplast DNA characteristics. *Knjiga sažetaka* 115-116. Prvi hrvatski botanički simpozij, Zagreb, 30. rujna–3. listopada 2004.
- Liber, Z., Kovačić S., Tkalec, M., Nikolić, T., Schneeweiss, G., 2005: *Campanula Waldsteiniana* and *Pyramidalis* lineages: not more than neighbours - or truly relatives? *Poster. Book of Abstracts*, 362. 17th International Botanical Congress, Vienna (Austria), July 17-23th, 2005.
- Lovašen-Eberhardt, Ž., 1971: Citotaksonomska istraživanja nekih endemičnih *Campanula* (Cytotaxonomic research on some endemic *Campanula*). *Zbornik radova I. Simpozija biosistematičara Jugoslavije*, Sarajevo. 85-90.

- Lovašen-Eberhardt, Ž., Trinajstić, I., 1978: O geografskoj distribuciji morfoloških karakteristika vrsta serije Garganicae roda *Campanula* L. u flori Jugoslavije. *Biosistematika* 4(2): 273-280.
- Lovašen-Eberhardt, Ž., 2000: *Campanula* L. U: Nikolić T. (ur.): Flora Croatica, Index Florae Croaticae Pars 3. Nat. Croat. 6, Suppl. 1: 64-67.
- Löve, A., 1967: The evolutionary significance of disjunctions. *Taxon* 16: 324-333.
- Lucchese, F., 1993: *Campanula reatina*, a new species restricted to some cliffs in the Sabina area (Lazio, central Italy). *Flora Medit.* 3: 265-271.
- Mantovani, E., Albarello, D., Babbucci, D., Tamburelli, C., 1992: Recent geodynamic evolution of the central Mediterranean region. Dept. of Earth Sciences, Univ. of Siena, Italy.
- Mayer, E., 1952: Seznam praprotnic in cvetnic slovenskega ozemlja. (List of ferns and flowering plants of Slovenian region). Dela 4. raz. SAZU 5, Inšt. za Biologijo 3, Ljubljana.
- Merxmüller, H., Damboldt, J., 1962: Die Chromosomenzahlen einiger rupicoler mediterraner Campanulae. *Ber. d. Deutsch. Bot. Ges.* 75(7): 233-236.
- Mildenhall, D. C. 1980. New Zealand late Cretaceous and cenozoic plant biogeography: A contribution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 31: 197–233.
- Musch, A., Gadella, T.W.J., 1972: Some notes on the hybrid between *C. isophylla* Mor. and *C. pyramidalis* L. *Acta Bot. Neerl.* 21(6): 605-608.
- Nei, M., Li, W. H., 1979: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5269-5273.
- Neilreich, A., 1868: Vegetationsverhältnisse von Kroatien. *Verh. d.k.k. Zool.-Bot. Ges.* 8. Wien.
- Neilreich, A., 1869: Nachträge zu den Vegetationsverhältnisse von Kroatien. *Verh. d.k.k. Zool.-Bot. Ges.* 765-830. Wien.
- Niklas, K.J., 1997: The evolutionary biology of plants. Univ. of Chicago Press.
- Nikolić, T., 1996: Herbarijski priručnik. Školska knjiga, Zagreb
- Nurmi, J., 1987: Chromosome numbers and variation of the *Campanula rotundifolia* complex in Northwestern Europe. *Symb. Bot. Upsal.* 27(2): 235-239.
- Nyman, C.F., 1878-1882: *Conspectus Florae Europaeae. Oerebro Sueciae.*
- Oestreich, A., Raubeson L.A., Cosner, M.E., Jansen, R.K., 2000: *Campanulaceae* systematics based on four chloroplast DNA markers. (<http://www.botany2000.org/section13/abstracts/170.shtml>)
- Oganesian, M.E., 2001: Review of the sections Symphyandriiformes and Cordifoliae of the subgenus *Campanula* (*Campanula*, Campanulaceae). *Bot. Žurn.* 86(11): 134-150.
- Park, J.-M., Kovačić, S., Liber, Z., Eddie, W.M. M., Schneeweiss, G. M.: Phylogeny and biogeography of isophyllous species of *Campanula* (Campanulaceae) in the Mediterranean area. (na recenziji časopisa *Systematic Botany*)

- Phitos, D., Kamari, G., 1988: Contribution to the cytotaxonomy of the genus *Campanula* (Campanulaceae) in Greece. *Willdenowia* 17(1-2): 103-105.
- Pignatti, S., 1982: Flora d'Italia. 2: 681. Egadricole.
- Podlech, D., 1962: Beitrag zur Kenntnis der Subsektion Heterophylla der Gattung *Campanula*. *Ber. Dt. Bot. Ges.*
- Podlech, D., Damboldt, J. 1964: Zytotaxonomische Beiträge zur Kenntnis der Campanulaceae in Europa. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 76: 360-369.
- Podlech, D., 1965: Revision der europäischen und nordafrikanischer Vertreter der Subsect. Heterophylla (Wit.) Fed. Der Gattung *Campanula* L. *Feddes Rep.* 71: 51-187.
- Prelogović, E., Kranjec, V., 1983: Geološki razvitak područja Jadranskog mora. *Pomorski zbornik (Rijeka)* 21: 387-404.
- Pulević, V., 2005: Građa za vaskularnu floru Crne Gore – dopuna «Conspectus Florae Montenegrinae» J. Rohlene. Republički zavod za zaštitu prirode Crne Gore - Podgorica. Specijalna izdanja, Knjiga 2.
- Quezel, P., 1985: Definition of the Mediterranean region and origins of its flora. U: Gomez-Campo, C. (ur.), *Plant conservation in the Mediterranean area*, 9-24. Junk, Dodrecht.
- Quinn, G.P., Keough, M.J., 2002: *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge Univ. Press.
- Rohlena, J., 1941/42: *Conspectus florae Montenegrinae*. *Preslia* 20-21: 344-351.
- Rubić, I., 1952: *Naši otoci na Jadranu*. Split.
- Runemark, H., Phitos, D., 1996: A contribution to the distribution of the genus *Campanula* sectio *Quinqueloculares* in Greece. *Bot. Chronika* 12: 5-8.
- Saez L., Aldasoro J.J., 2003: A taxonomic revision of *Campanula* L. subgenus *Sicyocodon* (Feer) Damboldt and subgenus *Megalocalyx* Damboldt (Campanulaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 141(2): 215-241.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schlosser, J.C., Vukotinović, L.F., 1869: *Flora Croatica*, 914-952. *Zagrabiae*.
- Schönland, S., 1889: *Campanulaceae*. U: Engler, A., Prantl, K. (ur.): *Die natürlichen Pflanzenfamilien* 4: 40-70. W. Engelmann, Leipzig.
- Schönswetter, P., Tribsch, A., Barfus, M., Niklfeld, H., 2002: Several pleistocene refugiatedetected in the high alpine plant *Phyteuma globulariifolium* Sternb. & Hoppe (*Campanulaceae*) in European Alps. *Mol. Ecol.* 11: 2637-2647.
- Shetler, S.G., 1982: Variation and Evolution of the Nearctic Harebells (*Campanula* subsect. Heterophylla). *Phan. Monogr.* 11: 1-516. J. Cramer, Vaduz.
- Snowdon R.J., Langsdorf A., 1998: An introduction to DNA fingerprinting using RFLP and RAPD techniques. U: Tietz D. (ur.) *Nucleic acid electrophoresis*. Springer Verlag, Berlin, str. 99-128.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1989: *Biometry*. Freeman and CO, San Francisco.

- Spichiger, R., Savolainen, V., 1997: Present state of Angiospermae phylogeny. *Candollea* 52: 435-455.
- StatSoft, 2005: STATISTICA 7.1. Toolsa, Texas, USA.
- Sugiura, T., 1942: Studies on the chromosome numbers in *Campanulaceae*. I. Campanuloideae – Campanulae. *Cytologia* 12: 418-434.
- Swofford, D. L., 1993: PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1. - Centre for Biodiversity, Illinois Natural History Museum.
- Šegota, T., 1982-1983: Paleogeografske promjene u Jadranskom moru od virmskog maksimuma do danas. *Radovi Hrv. geol. društva* 17/18: 11-15.
- Šegulja, N., Nikolić, T., Stančić, Z., Belamarić, M., 2005: *Campanula cochleariifolia* Lam. U: Nikolić, T., i Topić, J. (ur.): Crvena knjiga vaskularne flore Republike Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 400-401.
- Šoštarić, R., 2004: The development of vegetation in the inland area of Croatia during the Postglacial period. *Nat. Croat.* 13(4): 357-369.
- Šoštarić, R., 2005: The development of postglacial vegetation in coastal Croatia. *Acta Bot. Croat.* 64(2): 383-390.
- Stevanović, V., Tan, K., Petrova, A., 2003: Diversity and centres of endemism in the Balkan flora. Book of abstracts, 144 / 3<sup>rd</sup> International Balkan Botanical Congress "Plant Resources in Creation of New Values", Sarajevo, May 18-24, 2003.
- Šuljkina, T.V., 1978: Živnennje formi v semeistve *Campanulaceae* Juss., ih geografičeskoe rasprosttranenie i sjaz's taksonomiei. *Bot. Žurn.* 63(2): 153-169.
- Šuljkina, T.V., 1979: The significance of life-form characters for systematics, with special reference to the family *Campanulaceae*. Lenjingrad. (rus.-sažetak engl.)
- Šuljkina, T.V., Gaskin, J. F., Eddie, W.M.M., 2003: Morphological studies toward an improved classification of *Campanulaceae* s.str. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 90: 576-591.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991: Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Taktadžan, A.L., 1991: *Evolutionary Trends in Flowering Plants*. New York; Columbia Univ. Press.
- Tanfani, E., 1888: Die Gattung *Campanula* L. U: Parlatore, F. (ur.): *Flora Italiae* 1(8): 15-146.
- Thorne, R.F., 1992: The classification and geography of the flowering plants. *Bot. Rev.* 58: 225-348.
- Tkalec, M., Kovačić S., Nikolić, T., 2004: Isoenzyme variability among isophyllous, "isophylloid" and heterophyllous *Campanula* representatives in Croatia. *Knjiga sažetaka* 121-122. Prvi hrvatski botanički simpozij, Zagreb, 30. rujna–3. listopada 2004.
- Topić, J., Ilijanić, Lj., 2005: *Campanula kapelae*, the new species? within *Campanula pyramidalis* agg.. *Nat. Croat.* 14(3): 249-253.

- Trinajstić, I., 1991: O problemu geneze i bogatstva recentne jugoslavenske flore. On the Problem of Genesis and Richness of the Recent Yugoslav Flora. *Biol. vestn.* 39(1/2): 53-66.
- Trinajstić, I., 1992: A contribution to the phytogeographical classification of the Illyrian floral element. *Acta Bot. Croat.* 51: 135-142.
- Turrill, W.B., 1929: The plant life of the Balkan peninsula. Clarendon Press. Oxford.
- Vakramejeva, M.G., Dluski, G.M., 1994: Flower morphology in three *Campanula* species as adaptation to ceanotic surrounding. *Žurn. Obšč. Biol.* 55(3): 271-284.
- Visiani, R., 1847: Flora Dalmatica. 2. Lipisae.
- Waldstein-Wartemberg, F.A., Kitaibel, P., 1799-1812: Descriptiones et Icones Plantarum rariorum Hungariae. Viennae.
- Watson, L., Dallwitz, M.J., 2000: The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval Version. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>.
- Welden, V., 1830: Über die Vegetation Dalmatiens. *Flora (Regensb.)* 14, Regensburg.
- Willis, K.J., McElwain, J.C., 2002: The Evolution of Plants. Oxford Univ. Press.
- Witasek, J., 1902: Ein Beitrag zur Kenntnis der Gattung *Campanula*. *Abh. Zool. Bot. Ges. Wien* 1(3): 1-106.
- Witasek, J., 1906: Studien über einige Arten aus der Verwandtschaft der *Campanula rotundifolia* L. *Magy. Bot. Lapok* 5: 236-260.
- Wohlfahrt, R., 1902: Der Gattung *Campanula* L. U: Koch, D.W.J. (ur.): Synopsis der Deutschen und Schweizer Flora. 1-3. Leipzig
- Zimmer, K., 1982a: *Campanula pyramidalis* L. 1. Keimung, Blatt- und Sprossmerkmale. *Gartenbauwissenschaft* 47(4): 177-181.
- Zimmer, K., 1982b: *Campanula pyramidalis* L. 2. Blütenmerkmale. *Gartenbauwissenschaft* 47(5): 233-236.

## Prilozi

- Prilog 1** Izofilni ("jednakolisni") zvončići serija Garganicae (sl. 1-6) i Fragiles (sl. 7).
- Prilog 2** Heterofilni («raznolisni») zvončići agregata *Rotundifolia* (subsekcija Heterophylla) - sl. 1-8.
- Prilog 3** «Izofiloidni» zvončići agregata *Pyramidalis* (sl. 1-3) i *Waldsteiniana* (sl. 4 i 5) s mogućim srodnicima (sl. 6-9).
- Prilog 4** Mikrofotografije teksture vanjske lupine sjemenki šest vrsta roda *Campanula* dobivene SEM metodom.
- Prilog 5a** Podaci o biljnom materijalu prikupljenom za morfometrijsku i molekularnu analizu.
- Prilog 5b** (karta) Lokaliteti prikupljanja biljnog materijala duž primorskih Dinarida i zapadnog Balkana za potrebe morfometrijske analize:
- Hrvatska: Brseč (*C. pyramidalis*), Vela Učka (*C. justiniana*, *C. tommasiniana* - dvije populacije), Čabar (*C. justiniana*), Gerovo (*C. cespitosa*), Snježnik (*C. justiniana* -dvije populacije), Platak-Kuk (*C. marchesettii*, *C. rotundifolia*, *C. scheuchzeri*), Zavižan (*C. velebitica*, *C. waldsteiniana*), Alaginac (*C. waldsteiniana*), Visibaba (*C. velebitica* - dvije populacije), Ravni Dabar (*C. pyramidalis*, *C. velebitica*), Mali Alan (*C. velebitica*), Karlobag (*C. pyramidalis*), Tribanj-Sv. Marija Magdalena (*C. pyramidalis*), Buljma-Paklenica (*C. velebitica*, *C. waldsteiniana*), Pelješac-Putnikovići (*C. pyramidalis*), Dubrovnik-Župa (*C. pyramidalis*).
- Bosna i Hercegovina: vrh Jelinak, Čvrsnica (*C. hercegovina*), Čvrsnica-obronci (*C. rotundifolia* s.l.), rijeka Drežanka (*C. hercegovina*).
- BJR Makedonija: Ljuboten (*C. albanica*), Jakupica (*C. jordanovii*, *C. velebitica*), Debar (*C. debarensis*).
- Italija: dolina rijeke Turano (*C. reatina*).
- Prilog 6** Originalne izmjere devet varijabli i 410 cvjetova roda *Campanula* kroz 33 populacije.
- Prilog 7** Deskriptivni pokazatelji za ukupni uzorak (33 istraživane populacije roda *Campanula*) po mjerenim varijablama.
- Prilog 8** Deskriptivni statistički pokazatelji za devet mjerenih varijabli cvijeta u ukupnom uzorku (N=410).
- Prilog 9** Standardizirani koeficijenti kanoničkih varijabli.
- Prilog 10** Srednje vrijednosti (aritmetičke sredine) kanoničkih varijabli.
- Prilog 11** Dio kvadratne matrice Mahalanobisovih udaljenosti pojedinih mjerenih jedinki od centroida vrsta.
- Prilog 12** Dio tablice vjerojatnosti posteriorne klasifikacije pojedinih primjeraka pojedinim vrstama. Netočne klasifikacije u odnosu na determinaciju označene su zvjezdicom (\*).
- Prilog 13** Dio tablice klasifikacije primjeraka. Netočne klasifikacije u odnosu na determinaciju su označene zvjezdicom (\*).
- Prilog 14** Izlazna matrica restrikcijских fragmenata 25 vrsta roda *Campanula* i *Edraianthus tenuifolius* dobivenih RFLP cpDNA metodom uz korištenje osam restrikcijских enzima (1=fragment prisutan, 0=fragment odsutan).