



UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA HEMIJU



**Snežana Č. Jovanović**

**Sekundarni metaboliti predstavnika roda *Sedum* L.  
(Crassulaceae) centralnog Balkanskog poluostrva i  
njihov hemotaksonomski značaj**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



**Snežana Č. Jovanović**

**Secondary metabolites of the *Sedum* L.  
(Crassulaceae) representatives from the central  
Balkan Peninsula and their chemotaxonomic  
significance**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број, <b>РБР:</b>	
Идентификациони број, <b>ИБР:</b>	
Тип документације, <b>ТД:</b>	монографска
Тип записа, <b>ТЗ:</b>	текстуални / графички
Врста рада, <b>ВР:</b>	докторска дисертација
Аутор, <b>АУ:</b>	Снежана Ч. Јовановић
Ментори, <b>МН:</b>	Гордана С. Стојановић и Бојан К. Златковић
Наслов рада, <b>НР:</b>	<b>СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ПРЕДСТАВНИКА РОДА <i>SEDUM</i> L. (CRASSULACEAE) ЦЕНТРАЛНОГ БАЛКАНСКОГ ПОЛУОСТРВА И ЊИХОВ ХЕМОТАКСОНОМСКИ ЗНАЧАЈ</b>
Језик публикације, <b>ЈП:</b>	српски
Језик извода, <b>ЈИ:</b>	енглески
Земља публикавања, <b>ЗП:</b>	Србија
Уже географско подручје, <b>УГП:</b>	Србија
Година, <b>ГО:</b>	2016.
Издавач, <b>ИЗ:</b>	ауторски репринт
Место и адреса, <b>МА:</b>	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, <b>ФО:</b> (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	10 Поглавља, 197 страна, 213 цитата, 64 табеле, 51 слика /граф, 4 прилога
Научна област, <b>НО:</b>	Хемија
Научна дисциплина, <b>НД:</b>	Органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, <b>ПО:</b>	<i>Sedum</i> L., секундарни метаболити, епикутикуларни воскови, метанолни екстракти, хемотаксономија.
<b>УДК</b>	<b>577.13 : 582 + 57.06 (497)</b>
Чува се, <b>ЧУ:</b>	библиотека
Важна напомена, <b>ВН:</b>	Истраживање докторске дисертације је финансирано од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројекта "Природни производи биљака и лишјајева: изоловање, идентификација, биолошка активност и примена", евиденциони број 172047.
Извод, <b>ИЗ:</b>	Циљ ове докторске дисертације је испитивање применљивости секундарних метаболита одабраних представника рода <i>Sedum</i> L. (Crassulaceae) са територије централног Балканског полуострва у хемотаксономске сврхе. Укључени су и представници из других родова исте фамилије: <i>Crassula</i> L., <i>Hylotelephum</i> H. Ohba, <i>Echeveria</i> DC. i <i>Kalanchoe</i> Adans. GC-MS и GC-FID техником је праћена дистрибуција <i>n</i> -алкана (C <sub>20</sub> -C <sub>35</sub> ) и тритерпена (олеани, лупани и тараксерани) у хексанским екстрактима, а код метанолних екстраката дистрибуција поларних компоненти (HPLC анализа). Садржаји поменутих компоненти су коришћени као променљиве које су једнообразно систематизоване у матрице за статистичке анализе: дескриптивна статистика, униваријантне и мултиваријантне методе. Дистрибуција наведених хемијских карактера је разматрана на нивоу серије као таксономске категорије. Различит садржај поменутих карактера је условно класификовано испитиваних таксона које је коментарисано и упоређивано у складу са већ постојећим системима класификације.

Датум прихватања теме, <b>ДП</b> :	28.01.2015.	
Датум одбране, <b>ДО</b> :	}	
Чланови комисије, <b>КО</b> :	Председник:	Гордана С. Стојановић
	Члан:	Олга П. Јовановић
	Члан:	Горан М. Петровић
	Члан:	Биљана Н. Божин
	Члан, ментор:	Гордана С. Стојановић
	Члан, ментор:	Бојан К. Златковић



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number, <b>ANO</b> :	
Identification number, <b>INO</b> :	
Document type, <b>DT</b> :	monograph
Type of record, <b>TR</b> :	textual / graphic
Contents code, <b>CC</b> :	doctoral dissertation
Author, <b>AU</b> :	Snežana Č. Jovanović
Mentors, <b>MN</b> :	Gordana S. Stojanović and Bojan K. Zlatković
Title, <b>TI</b> :	<b>SECONDARY METABOLITES OF THE <i>SEDUM</i> L. (CRASSULACEAE) REPRESENTATIVES FROM THE CENTRAL BALKAN PENINSULA AND THEIR CHEMOTAXONOMIC SIGNIFICANCE</b>
Language of text, <b>LT</b> :	Serbian
Language of abstract, <b>LA</b> :	English
Country of publication, <b>CP</b> :	Serbia
Locality of publication, <b>LP</b> :	Serbia
Publication year, <b>PY</b> :	2016
Publisher, <b>PB</b> :	author's reprint
Publication place, <b>PP</b> :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, <b>PD</b> : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	10 Chapters, 197 pages, 213 references, 64 tables, 51 pictures/graphs, 4 appendixes
Scientific field, <b>SF</b> :	Chemistry
Scientific discipline, <b>SD</b> :	Organic chemistry and Biochemistry
Subject/Key words, <b>S/KW</b> :	<i>Sedum</i> L., secondary plant metabolites, epicuticular waxes, methanol extracts, chemotaxonomy.
<b>UC</b>	<b>577.13 : 582 + 57.06 (497)</b>
Holding data, <b>HD</b> :	Library
Note, <b>N</b> :	PhD Research was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic Serbia, within the project "Natural products of plants and lichens: isolation, identification, biological activity and application" (No. 172047)
Abstract, <b>AB</b> :	The aim of this doctoral dissertation was the estimation of chemotaxonomic utility of secondary metabolites of the selected members from the genus <i>Sedum</i> L. (Crassulaceae), collected from the Central Balkan Peninsula. The study also included compatriots from the related genera (same family): <i>Crassula</i> L., <i>Hylotelephum</i> H. Ohba, <i>Echeveria</i> DC. and <i>Kalanchoe</i> Adans. Distribution of <i>n</i> -alkanes (C20-C35) and triterpenes (olenanae, lupane and taraxerane) were monitored in hexane extracts by GC-MS and GC-FID techniques, while polar components, from methanol extracts, were monitored by HPLC technique. The contents of mentioned components were inputted uniformly in matrices (pattern) further used in statistical analyses: descriptive, univariate and multivariate methods. Distribution of characters was considered on the series level as a taxonomic rank. Different contents contributed to certain classification of examined taxa which was discussed with respect to already established systems of classification related to genus.

Accepted by the Scientific Board on, <b>ASB</b> :	28.01.2015
Defended on, <b>DE</b> :	
Defended Board, <b>DB</b> :	
President:	Gordana S. Stojanović
Member:	Olga P. Jovanović
Member:	Goran M. Petrović
Member:	Biljana N. Božin
Member, Mentor:	Gordana S. Stojanović
Member, Mentor:	Bojan K. Zlatković

*Eksperimentalni deo doktorske disertacije je rađen u laboratoriji za Organsku hemiju, na Departmanu za hemiju (Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu), u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja "Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena", evidencioni broj 172047.*

*Disertacija je urađena pod mentorstvom red. prof. dr Gordane Stojanović i vanr. prof. dr Bojana Zlatkovića. Na ovaj način im se srdačno i najiskrenije zahvaljujem, jer su me nesebično i strpljivo vodili kroz izradu disertacije. Prenoseći mi svoja iskustva, ispunjena entuzijazmom i ljubavlju prema nauci, učili su me pragmatičnosti i metodičnosti u radu. Zahvaljujem im se jer su mi ukazali poverenje i pružili podršku.*

*Veliku podršku, korisne savete i sugestije dobila sam i od svojih dragih profesora, članova komisije i kolega. Pored toga, zahvalna sam im i na svim prijatnim trenucima.*

*Zahvaljujem se svojim prijateljima – od ranog detinjstva do sada.*

*Najdražima, zbog безусловne ljubavi,  
Jer su utočište i najveći podstrek!*

*S.J.*

---

# SADRŽAJ

---

1. UVOD I CILJEVI .....	1
2. TEORIJSKE OSNOVE .....	3
2.1. Filogenija i filogenetska sistematika .....	3
2.2. Taksonomija biljaka – osnovni pojmovi .....	4
2.3. Hemotaksonomija i hemotaksonomski markeri .....	8
2.4. Obrada taksonomskih podataka .....	14
2.4.1. Numerička taksonomija .....	14
2.4.2. Hemometrija .....	15
2.4.3. Statističke metode .....	16
2.4.3.1 Osnovna analiza podataka, deskriptivna statistika .....	18
2.4.3.2 Statističko testiranje, analiza varijanse .....	18
2.4.3.3 Multivarijantne tehnike analize podatka .....	19
2.4.3.3.1. Faktorska analiza i analiza glavnih komponenti .....	20
2.4.3.3.2. Diskriminantna analiza .....	23
2.4.3.3.3. Klaster analiza .....	23
2.4.3.3.4. Korespondentna analiza .....	25
2.5. Epikutikularni voskovi .....	26
2.5.1. Građa kutikule kod biljaka .....	26
2.5.2. Epikutikularni vosak: sastav i funkcija .....	28
2.5.3. Epikutikularni vosak kao hemotaksonomski kriterijum .....	32
2.5.3.1. Distribucija komponenti epikutikularnog voska i njihov hemotaksonomski značaj .....	34
2.5.3.1.1. Alkani kao hemotaksonomski markeri .....	34
2.5.3.1.2. Triterpeni kao hemotaksonomski markeri .....	35
2.5.4. Biosinteza komponenti epikutikularnih voskova .....	37
2.5.4.1. Biosinteza derivata masnih kiselina (DMK) .....	37
2.5.4.2. Biosinteza triterpena .....	40
2.6. Fenolna jedinjenja .....	43
2.6.1. Biosinteza, poreklo i značaj fenolnih jedinjenja .....	43
2.6.2. Izolovanje i karakterizacija fenolnih jedinjenja .....	46
2.6.3. Fenolna jedinjenja kao hemotaksonomski markeri .....	48
2.7. Familija Crassulaceae .....	50
2.7.1. Karakteristike, rasprostranjenost i praktični značaj predstavnika familije .....	50
2.7.2. Sistematska pripadnost i taksonomska struktura familije Crassulaceae .....	52
2.8. Opšte karakteristike, rasprostranjenje i značaj roda <i>Sedum</i> .....	58
2.8.1. Sistematika roda <i>Sedum</i> L. .....	59



2.8.2. Fitohemijska istraživanja i tradicionalna upotreba predstavnika roda <i>Sedum</i> .....	62
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	65
3.1. Biljni materijal .....	65
3.2. Izolovanje i analiza epikutikularnih voskova .....	67
3.2.1. Ekstrakcija epikutikularnih voskova .....	67
3.2.2. GC-MS i GC-FID analiza epikutikularnih voskova .....	67
3.3. Izolovanje i analiza metanolnih ekstrakata .....	71
3.3.1. Dobijanje metanolnih ekstrakata .....	71
3.3.2. HPLC analiza i identifikacija komponenti metanolnih ekstrakata .....	71
3.4. Statistička obrada podataka .....	76
4. REZULTATI.....	77
4.1. Fitohemijska karakterizacija serija roda <i>Sedum</i> .....	78
4.1.1. Zastupljenost pojedinih komponenti u epikutikularnom vosku i metanolnom ekstraktu ..	78
4.1.2. Prinos epikutikularnih voskova i zastupljenost ispitivanih klasa jedinjenja u epikutikularnim voskovima i metanolnim ekstraktima .....	83
4.2. Statistički značajni karakteri epikutikularnog voska i metanolnih ekstrakata predstavnika serija roda <i>Sedum</i> (ANOVA) .....	85
4.3. Multivarijantne tehnike analize podataka.....	88
4.3.1. Analiza glavnih komponenti (PCA) .....	88
4.3.1.1. Analiza glavnih komponenti – nivo serija roda <i>Sedum</i> .....	88
4.3.1.2. Analiza glavnih komponenti – nivo serija roda <i>Sedum</i> i spoljne grupa taksona .....	99
4.3.1.3. Analiza glavnih komponenti na osnovu ukupnih sadržaja <i>n</i> -alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta kao karaktera.....	108
4.3.2. Kanonijska diskriminantna analiza (CDA) .....	113
4.3.2.1. Diskriminantna analiza – nivo serija roda <i>Sedum</i> .....	113
4.3.2.2. Diskriminantna analiza – nivo serija roda <i>Sedum</i> i spoljne grupa taksona .....	121
4.3.2.3. Diskriminantna analiza na osnovu ukupanih sadržaja <i>n</i> -alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta kao karaktera.....	128
4.3.3. Klaster analiza .....	133
4.3.3.1. Klaster analiza – nivo serija roda <i>Sedum</i> .....	133
4.3.3.2. Klaster analiza – nivo serija roda <i>Sedum</i> i spoljne grupe taksona.....	136
4.3.3.3. Klaster analiza na osnovu ukupanih sadržaja <i>n</i> -alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta kao karaktera.....	139
4.3.4. Korespondentna analiza .....	141
5. DISKUSIJA.....	146
5.1. Karakteri epikutikularnog voska predstavnika roda <i>Sedum</i> .....	146
5.2. Karakteri metanolnog ekstrakta predstavnika roda <i>Sedum</i> .....	149
5.3. Testiranje statističke značajnosti .....	150
5.4. Analiza glavnih komponenti .....	150

5.5. Diskriminantna analiza i klaster analiza.....	153
5.6. Korespodentna analiza .....	157
6. ZAKLJUČAK .....	160
7. LITERATURA.....	162
8. PRILOZI.....	170
9. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM .....	193
10. PROPATNA DOKUMENTACIJA .....	197

---

# 1. UVOD I CILJEVI

---

*Biljke su čovekovi prvi (najbolji) prijatelji.  
G. Singh*

Čovek je oduvek osećao potrebu i dužnost da za sobom ostavi pisani trag o iskustvu, odnosno saznanju, koje je stekao i unapređivao izučavajući svojstva različitih biljnih organizama. Takva aktivnost je najpre beležena u vidu ilustracija, a mnogo godina kasnije, usavršavanjem kognitivnih veština, znanje o biljkama je i zvanično sistematizovano u vidu prvih farmakopeja i drugog pisanog materijala (*Balick i Cox, 1997*).

Biljke su vekovima sakupljane i gajene kao izvor hrane i energije, kao gradivni materijal i sirovina za izradu odeće, lekova, napitaka, ali i iz estetskih razloga. Iz korisnog odnosa sa biljkama, koji je čovek negovao i usavršavao, razvile su se brojne naučne discipline. Na primer, u okviru farmakognozije se vrši procena pozitivnih i negativnih efekata biljnih supstanci (droga) na žive organizme, taksonomija klasifikuje biljke na osnovu njihovih morfo-anatomskih, hemotaksonomskih i drugih osobina, dok hemičari utvrđuju strukturu biljnih metabolita koji su značajni za farmakognoziiju i botaniku uopšte. Fitohemija je kao naučna disciplina proistekla iz farmakognozije i bavi se izolovanjem i identifikacijom biljnih jedinjenja (primarnih i sekundarnih metabolita) koja su od značaja za pomenute discipline.

Do danas, zahvaljujući aktivnom istraživanju biljaka i njihovih proizvoda, dokazana su preimućstva prirodnih, odnosno biljnih sirovina u odnosu na sintetske u farmaceutskoj industriji, kozmetici i slično. Osim terapijske upotrebe ekstrakata lekovitih biljaka, oni se primenjuju i kao prirodne boje, konzervansi, zaslađivači, aditivi, itd.

Prvi sistemi klasifikacije biljaka su proistekli iz čovekove potrebe za sistematizacijom vrsta koje se koriste u terapiji i ishrani (*Walters, 1963*). Jedinjenja iz biljnog tkiva (tzv. sekundarni metaboliti) takođe predstavljaju dominantan objekat taksonomskih istraživanja (*Singh, 2004*). Sekundarni metaboliti se koriste kao specifični hemijski karakteri ili biomarkeri, odnosno jedinjenja čija distribucija i varijabilnost u biljnom svetu može biti pouzdan parametar za klasifikaciju taksona. Oni takođe, obavljaju veoma značajne funkcije

za biljku, kao što su, odbrana od patogena ili konkurentnih biljaka, ili igraju ulogu signalizirajućih molekula (alelopatija).

Mnoga istraživanja su dokazala da je produkcija biljnih metabolita pod uticajem ekoloških faktora koji doprinose njihovoj kvalitativnoj i kvantitativnoj varijabilnosti, te se može se reći da sekundarni metaboliti predstavljaju adaptivne karaktere zbog čega se i vrednuju u taksonomskim studijama (*Wink, 2003*).

Biohemijska sistematika, hemosistematika ili hemotaksonomija biljaka je disciplina koja obuhvata sistematiku i fitohemiju zajedno, a bavi se distribucijom biljnih metabolita (struktura, biosinteza, funkcija i aktivnost). Hemijski karakteri koji se najčešće koriste u hemotaksonomskim istraživanjima jesu komponente biljnih ekstrakata različite polarnosti: fenolna jedinjenja i njihovi derivati, alkaloidi, komponente etarskih ulja (terpeni), komponente epikutikularnih voskova (derivati masnih kiselina, triterpeni, itd.), nukleinske kiseline, itd. (*Marin, 2003*).

Ova doktorska disertacija ima za cilj istraživanje hemotaksonomskih odnosa i klasifikacije taksona roda *Sedum* L. (Crassulaceae) sa teritorije centralnog Balkanskog poluostrva (Srbija, Crna Gora, Makedonija, Grčka i Bugarska). Izvršeno je ispitivanje hemijskog sastava predstavnika roda *Sedum*, tj. identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita radi utvrđivanja potencijalne primene određenih hemijskih markera u hemotaksonomiji. Testirana je uloga komponenti epikutikularnih voskova ekstrahovanih heksanom i jedinjenja identifikovanih u metanolnim ekstraktima istraživanih vrsta. Identifikacija i kvantifikacija nepolarnih, isparljivijih jedinjenja heksanskog ekstrakta je izvedena GC-MS i GC-FID analizom, a polarnih, neisparljivih jedinjenja metanolnog ekstrakta HPLC analizom. Nezavisno jedni od drugih, *n*-alkani (C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub>) i triterpeni (oleani, lupani i tarakserani) iz epikutikularnih voskova i jedinjenja iz metanolnih ekstrakata (uglavnom fenolnog tipa) tretirani su kao varijable koje su najpre jednoobrazno sistematizovane u matrice, a potom korišćene kao osnova za izvođenje statističkih analiza (deskriptivna statistika, univarijantne i multivarijantne metode). Takođe su analizirani svi karakteri zajedno (metanolnih i heksanskih ekstrakata), kao i ukupni sadržaji karaktera voskova i metanolnih ekstrakata. Razmatrana je distribucija i varijabilnost navedenih hemijskih karaktera na nivou serije kao taksonomske kategorije. Različit sadržaj pomenutih karaktera je uslovio određeno klasifikovanje i asociranje (korespondentna analiza) ispitivanih taksona koje je razmatrano i upoređivano u skladu sa već postojećim sistemima klasifikacije roda *Sedum* i familije Crassulaceae.

---

## 2. TEORIJSKE OSNOVE

---

### 2.1. Filogenija i filogenetska sistematika

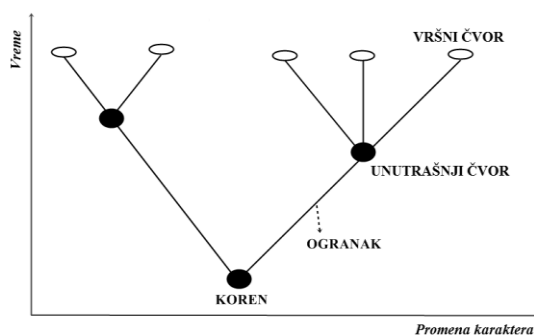
Filogenija je naučna disciplina koja se bavi biološkom evolucijom organizama. Termin „filogenija“ potiče od kombinacije grčkih reči *phylon*, koja označava pleme ili klan, i *genesis* što označava poreklo ili izvor.

Razvoj tehnike, koji je istraživačima omogućio rekonstrukciju evolutivnih i genealoških odnosa kod organizama (genealogija – nauka o poreklu, tj. rodoslovu organizama), uslovio je i razvoj komparativne biologije. Za razliku od opšte biologije, koja ciljano bira organizam, podoban za istraživanje datog procesa, komparativna biologija u osnovi podrazumeva proučavanje karakteristika različitih organizama radi zaključivanja o evolutivnim i istorijskim odnosima među njima. Filogenetska sistematika, kao i druge discipline iz oblasti sistematike, podržava komparativni pristup, tj. omogućava istraživaču da svoje zapažanje uvrsti u istorijski kontekst o poreklu, uz mogućnost modifikacije i navođenje faktora koji doprinose formiranju datog zapažanja. Shodno tome, glavni zadatak filogenetičara je procena, utvrđivanje obrasca diverziteta, odnosno istorijskog toka evolucije. Bilo koja vrsta komparativnih podataka (ili više njih) se vrednuju u ovakvim studijama. Preispitivanjem, tj. testiranjem hipoteza o poreklu vrsta moguće je izmeniti i odnose u filogeniji.

Filogenetsko stablo je grafički prikaz istorijske specijacije i predstavlja niz procesa koji dovode do nastanka jedne ili više vrsta, deljenjem u odnosu na pretka (kladogeneza) ili putem hibridizacije<sup>1</sup>. Najjednostavnije rečeno, filogenetsko stablo prikazuje promenu stanja karaktera u toku vremena (slika 1). Postoje različiti tipovi filogenetskih stabala, međutim, najosnovniji oblik jeste kladogram na kome se razmatra relativno mesto grananja, dok dužina grane (klade) nema posebno značenje. Filogenetska sistematika je jedan od pristupa sistematici i taksonomiji kojim je moguće izvršiti revidiranje filogenetskih odnosa između taksona ili uneti promene u skladu sa postojećim biološkim klasifikacijama.

---

<sup>1</sup> Hibridizacija je ukrštanje između nedovoljno izolovanih taksona sa različitim genetskom strukturom.



**Slika 1.** Filogenetsko stablo - promena stanja karaktera tokom vremena (modifikovano, Marin, 2003)

Prilikom klasifikacije i definisanja filogenetskih odnosa, istraživaču je neophodno saznanje o prirodi organizama (gde se pre svega misli na njihova svojstva iliti karaktere), zatim o njihovom grupisanju i klasifikaciji, kao i o istoriji i evoluciji organizama (Marin, 2003; Willey i Lieberman, 2011; Patwardhan, et al. 2014).

## 2.2. Taksonomija biljaka – osnovni pojmovi

Potreba za klasifikacijom biljnih organizama postoji još od nastanka ljudske vrste. Istorijski gledano, prvi pisani podaci o njihovoj klasifikaciji datiraju iz perioda starih Grka (Teofrast i Dioskoridis), na kojima se u srednjem veku temeljila evropska zbirka koja je sistematizovala biljke korišćene u narodnoj medicini i ishrani. Ta činjenica potvrđuje da su prvi sistemi klasifikacije, zajedno sa prepoznavanjem i imenovanjem biljnih vrsta, proistekli iz veoma praktičnih potreba ljudskog roda. Neodvojivi deo taksonomije se tiče hijerarhije imenovanja jedinki i grupa koja u osnovi predstavlja potrebu za eksplicitnom terminologijom radi efikasne komunikacije (Walters, 1963).

Iako su sistematika, sistematičnost i sistematizacija termini koji su svakodnevno prisutni u komunikaciji i praksi, potrebno je preciznije definisati pojmove taksonomija, klasifikacija, identifikacija i sistematika.

Sastavni deo sistematike je taksonomija – naučna disciplina koja ima za cilj opisivanje, imenovanje i grupisanje jedinki, organizama ili grupa organizama u skladu sa unapred utvrđenim kriterijumima u posebne, manje ili više uniformne i smislene jedinice, tj. entitete ili takson<sup>2</sup> (Hegnauer, 1986, Singh, 2004). Taksonomija podrazumeva principe i

<sup>2</sup> Takson (lat. *taxon*, mn. *taxa*) je sistematikom prepoznata grupa bića (organizama), ili, taksonomska grupa koja pripada bilo kom rangu.

metode (tabela 1) kojima se vrši klasifikacija, daje smernice kako treba klasifikovati organizme i predlaže principe za klasifikaciju taksona u inkluzivnije, složenije sistematizovane taksone (Ereshefsky, 2008). Reč „taksonomija“ potiče od grčke reči *taxis* što znači uređenje i *nomas* – zakon, dakle taksonomija predstavlja pravilo uređenja. Formalno je kao predmet prepoznata od strane švajcarskog botaničara *Augustin Pyramus de Candolle* u knjizi *Théorie élémentaire de la botanique*, 1813. godine.

Danas su taksonomskim shvatanjima, osim objekata živog sveta, obuhvaćeni i drugi aspekti modernog društva. Sa razvojem ljudske svesti, tj. sa evolucijom, savladavanjem i usavršavanjem različitih veština, javila se potreba za identifikacijom, opisivanjem, imenovanjem i klasifikacijom mnoštva novih prirodnih i društvenih pojava (Marin, 2003; Singh, 2004).

Klasifikacija u biološkim disciplinama predstavlja proces organizovanja (smisleni raspored i redosled) organizama na osnovu njihovih filogenetskih i fenetskih odnosa (*raspored organizama u okviru grupa na osnovu njihove sličnosti* – Singh, 2004). Kada se govori o klasifikaciji, vrlo blizak njoj je postupak identifikacije, koji podrazumeva raspoređivanje neidentifikovanih organizama u odgovarajuću grupu ili klasu koja je klasifikacijom definisana. Drugačije rečeno, taksonom, prema odabranom „ključu“, identifikuje objekat ili organizam i svrstava ga u grupu koja je organizovana/oformljena prethodnom identifikacijom organizama prema utvrđenim („ključnim ili taksonomskim“) karakteristikama.

Sistematika detaljnije razmatra povezanost organizama u prirodi. U idealnom slučaju, sistematikom se definišu principi kojima se služi taksonomija u cilju dobijanja što „prirodnijeg“ sistema klasifikacije (tabela 1). To je naučni postupak kojim se karakteriše tip i raznovrsnost organizama na osnovu jednog ili više odnosa i afiniteta koji ih karakteriše. Dakle, osim udruživanja taksonomskih jedinica u taksone i njihovog korektnog imenovanja, uzimaju se u obzir uzroci i izvori grupisanja (Sneath i Sokal, 1973; Ereshefsky, 2008).

Pored istraživanja raznovrsnosti i filogenije organizama, jedan od osnovnih zadataka sistematike jeste karakterizacija osnovnih ili specifičnih svojstava organizama (fiziološke, morfološke, biohemijske, genetičke, ekološke i druge karakteristike), na osnovu kojih se mogu grupisati i uvrstiti u neki hijerarhijski sistem. Ona daje uvid u evolutivne tokove i omogućava doslednost u imenovanju jedinki. Tako, na primer, grupa organizama jedinstvena sa nekoliko aspekata naziva se vrsta. Mnoštvo vrsta se dalje, takođe prema nekoj svojstvenoj grupi osobina, sistematizuje u veću celinu – rod, više rodova u familiju, familije u red, i tako

dalje grupisanje ide u pravcu formiranja najveće inkluzione grupe (Hegnauer, 1986; Singh, 2004).

Morfološki karakteri pripadaju grupi najčešće korišćenih karaktera u taksonomiji. Prema Radfordu (1986), morfološki podaci su dostupniji, lakši za uočavanje, pa su zato i zastupljeniji u taksonomskim studijama. Takozvana spoljna morfologija predstavlja osnovu u karakterizaciji, identifikaciji, klasifikaciji i utvrđivanju međusobnih odnosa biljaka. Na primer, karakteristike/struktura cveta i cvasti. Morfološki karakteri se mogu podeliti u dve grupe: vegetativni i cvetni karakteri. Vegetativni se odnose na karakterizaciju razvića, fenoloških karaktera, podzemnih organa, stabla, listova, petiola, lisnih zalistaka, dok se cvetni karakteri odnose na strukturu cveta i cvasti. Istoj grupi karaktera pripadaju i karakteri ploda i semena (Sharma, 2009).

Svaki metod klasifikacije i kategorizacije trebalo bi da se karakteriše stabilnošću i univerzalnošću u imenovanju organizama. Imena treba da budu: univerzalna (insistiranje da se jednim, opšte usvojenim jezikom imenuju organizmi, npr. Latinski jezik), jedinstvena (neponovljiva) i nepromenljiva. Eventualnim promenama prethodi detaljan pregled, procena i odobrenje zvaničnih institucija, tj. eksperata za datu oblast. Propisima i predlozima ICBN organizacije (*International Code of Botanical Nomenclature*) utvrđuje se nomenklatura biljaka (algi i gljiva). Obzirom na redovno ažuriranje podataka, „botanički kod“ omogućava odabir korektnog naziva za takson, od nekoliko predloženih, uz detaljan opis, poziciju i rang kome pripada (Singh, 2004). ICBN je prepoznala i predložila taksonomske kategorije/ragnove u okviru kojih se vrši klasifikacija jedinki i grupa.

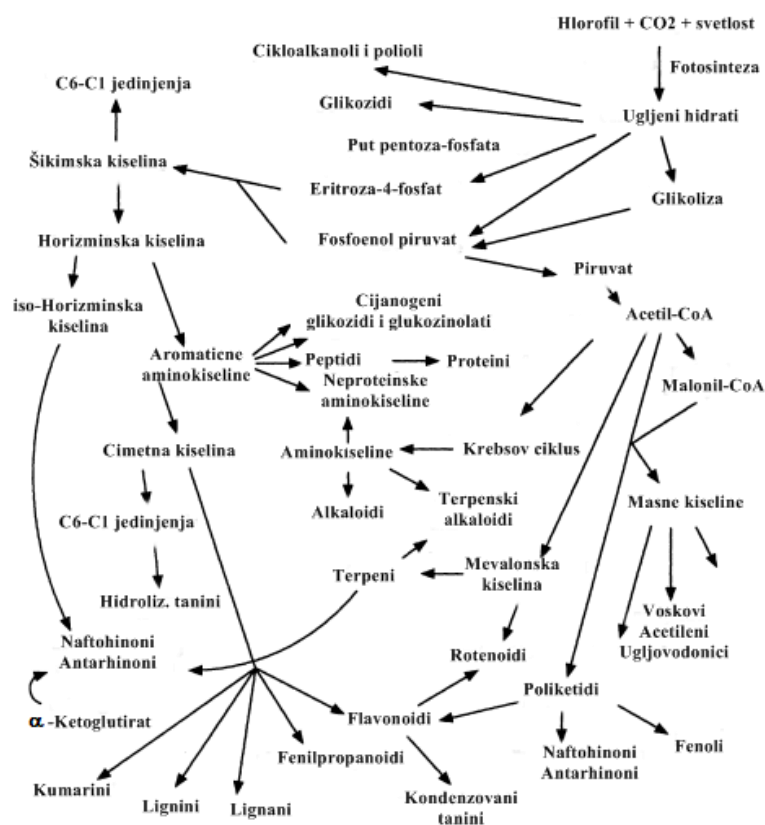


**Tabela 1.** Osnovni aspekti i zadaci sistematike i taksonomije (modifikovano, *Sharma*, 2009)

Aspekti	Zadaci sistematike i taksonomije
<i>Fundamentalnost Struktura</i>	Proučavanje prirode, uzroka, šablona i trendova u varijabilnosti taksona. Proučavanje osnovnih taksonomskih karaktera i evolucije.
<i>Funkcija</i>	Proučavanje karaktera u okviru različitih naučnih oblasti radi valjanog utvrđivanja međusobnih taksonomskih odnosa.
<i>Razvoj</i>	Ispitivanje varijabilnosti taksona sa ciljem određivanja korelacije njihovih karaktera i odnosa.
<i>Teorija</i>	Zasniva se na ideji o velikom diverzitetu živog sveta u kojem postoji potreba da se pojedine nerazjašnjene jedinice identifikuju, klasifikuju, opišu i imenuju na osnovu evolutivnih karaktera.
<i>Identifikacija</i>	Razlikovanje i identifikacija novih taksona i utvrđivanje dijagnostičkih karaktera za poznate taksona.
<i>Deskripcija</i>	Opisivanje taksona prema utvrđenom sistemu klasifikacije.
<i>Nomenklatura</i>	Davanje novih imena ili utvrđivanje korektnih imena postojećim taksonima prema definisanom kodeksu .
<i>Sinteza</i>	Sistematizacija i organizacija grupe karaktera datog organizma ili grupe koji će se koristiti za razvijanje nove klasifikacije i identifikacije.
<i>Generisanje</i>	Generisanje novih efikasnih metoda za sakupljanje, analizu i predstavljanje podataka. Razvijanje novih koncepata na osnovu poznavanja i unapređivanja starih.
<i>Filozofski aspekt</i>	Oblast koja stalno napreduje radi razumevanja taksonomskih i evolucijskih procesa, principa i koncepata.

## 2.3. Hemotaksonomija i hemotaksonomski markeri

Na nivou biljne ćelije, različitim metaboličkim procesima nastaju sekundarni metaboliti (slika 2). Primarni metabolički procesi obuhvataju jenoobrazne procese kojima se obezbeđuje energija za rast, razvoj, reprodukciju, fotosintezu i procese u kojima nastaju i razgrađuju se gradivna jedinjenja poput ugljenih hidrata, masti i proteina. Sekundarni metaboliti nastaju kao rezultat sekundarnog metabolizma koji predstavlja nastavak primarnog metabolizma i odvija se različitim mehanizmima (Kovačević, 2004). Pored činjenice da su i sami biološki aktivni i da postoji konstantan napor od strane naučnika za dokazivanjem novih svojstava (šira primena), sekundarni metaboliti mogu predstavljati početnu sirovinu za sintezu novih aktivnih jedinjenja (Bahmani, et al. 2014), ali i pouzdane taksonomske markere (Marin, 2003).



Slika 2. Shematski prikaz diverziteta sekundarnih metabolita i metaboličkih puteva (Seigler, 1998)

Iako se generalno govori o aktuelnosti i primenljivosti većine hemijskih jedinjenja (metabolita) u taksonomiji biljaka, pojedina jedinjenja mogu imati veći taksonomski značaj u odnosu na ostala (*Singh*, 2004; *Marin*, 2003).

Pored neorganskih jedinjenja, čija je primena u pomenute svrhe znatno manja, dve velike grupe organskih jedinjenja su prepoznate od strane taksonoma:

- primarni metaboliti i sekundarni metaboliti (mikromolekuli, jedinjenja sa molekulskom masom manjom od 1000) i
- semantidi i nesemantidi (makromolekuli, jedinjenja sa molekulskom masom većom od 1000).

Primarni metaboliti su jedinjenja koja učestvuju u metaboličkim procesima od vitalnog značaja: limunska kiselina, akonitinska kiselina, proteinske aminokiseline, itd. Sekundarni metaboliti predstavljaju produkte sekundarnog metabolizma: neproteinske aminokiseline, fenolna jedinjenja, alkaloidi, terpeni, itd.

Semantidi (semantički, informacioni molekuli) jesu različiti tipovi ćelijskih makromolekula, nukleinske kiseline i proteinske strukture koji prenose genetske informacije: DNK (primarni semantid), RNK (sekundarni semantid), različiti polipeptidi, enzimi (tercijarni semantidi), itd. Vrlo često se koriste u filogeniji, jer se karakterišu kao molekuli koji se odlikuju slabijim tempom izmena/modifikacija. Nesemantidi nisu informacioni makromolekuli, ne učestvuju u procesima u kojima učestvuju semantidi; na primer: skrob, celuloza i slično (*Zuckerlandl i Pauling*, 1964; *Zuckerlandl i Pauling* 1965; *Singh*, 2004).

Produkcija sekundarnih metabolita u biljnoj ćeliji se povezuje sa dva preduslova. Prvi se odnosi na produkciju raznovrsnih enzima koji učestvuju u sekundarnom metabolizmu, a drugi na snabdevenost prekursorima iz primarnog metabolizma. Kako se prekursori ne troše samo u sekundarnom metabolizmu već i za sintezu ćelijskih konstituenata, uvek postoji neka vrsta utrivanja između razvića i sekundarnog metabolizma. Krajnji ishod takve kompeticije je da sekundarni metabolizam počinje nakon diferenciranja, onda kada se proces razvića usporava, odnosno prestaje (*van der Plas*, et al. 1995).

Biljni sekundarni metaboliti su predstavljali glavne „mete“ u istraživanjima sa aspekta ispitivanja njihove strukture i sinteze. Rezultati takvih studija omogućili su dalja istraživanja na polju biohemije i enzimologije. Poznavanje distribucije sekundarnih metabolita ima veliku ulogu u rasvetljivanju filogenetskih odnosa biljaka. Sekundarni metaboliti predstavljaju prenosioce informacija, tzv. mesindžere, jer omogućavaju razumevanje ekoloških problema (*Seigler*, 1998). Dok primarni metaboliti imaju znatno manji taksonomski značaj (*Singh*,

2004), vrednost sekundarnih metabolita u taksonomiji poznata je još iz 19. veka. Njihova praktična primena potvrđena je u 20. veku kada je *McNair* (1935), kroz istraživanje distribucije isparljivih i neisparljivih ulja i alkaloida kod skrivenosemenica (*Angiospermae*), dao zvaničnu podršku hemotaksonomiji. Od sredine 20. veka zainteresovanost za sekundarne metabolite kao taksonomske markere bivala je sve veća. Sekundarni metaboliti se iz biljnog materijala izololuju različitim metodama ekstrakcije i hromatografskim metodama, a najčešće identifikuju tehnikama masene spektrometrije (MS), nuklearne magnetne rezonance (NMR), infracrvene spektroskopije (IR) i difrakcijom X-zračenja (*Harborne*, 1993; *Seigler*, 1998; *Wink* i *Waterman*, 1999; *Dunn* i *Ellis*, 2005).

Pored varijabilnosti morfoloških karaktera, koji se tradicionalno koriste u taksonomiji, kod biljaka je uočena i varijabilnost (kvalitativna i kvantitativna) hemijskog sastava, odnosno pojedinih jedinjenja (*Marin*, 2003).

Hemotaksonomija, hemosistematika ili hemijska taksonomija su nazivi koji se odnose na posebnu oblast taksonomije koja se bavi rešavanjem taksonomskih problema korišćenjem hemijskih karaktera. Hemijski karakteri, ili hemijski biomarkeri su jedinjenja čija se distribucija, odnosno varijabilnost u biljnom svetu koristi kao pouzdan parametar za klasifikaciju taksona. U tom smislu postoji veza između fitohemije i klasičnih metoda sistematike/taksonomije (*Hegnauer*, 1986; *Wink* 2003; *Marin*, 2003; *Waterman*, 2007; *Sharma*, 2009).

Varijabilnost osobina se u biljnom svetu pre svega dovodi u vezu sa razlikama u genetičkoj strukturi organizama, ali i sa promenljivim uticajem različitih faktora životne sredine (*Marin*, 2003). Treba naglasiti da biljke na promene pomenutih faktora ne reaguju jenoobrazno. Reakcija biljnih organizama se najčešće ogleda na više nivoa, utičući na varijabilnost većeg broja osobina, uključujući i njihove biohemijske karakteristike. Promene u sastavu sekundarnih metabolita kod biljka nisu svojstvene samo za populacioni nivo, one se mogu posmatrati i na nivou različitih delova iste jedinice, ontogenetskih faza ili pokazuju izvesnu sezonsku varijabilnost. Veliki broj faktora utiče na pojačanu ili smanjenu produkciju sekundarnih metabolita, ali uopšteno se može navesti nekoliko: regulatorni procesi; blokiranje biosintetskog puta zbog određene mutacije i odsustvo prekursora za njihovu sintezu. Strukturno jednostavniji sekundarni metaboliti, opšteprisutni u biljnom svetu, definišu se kao karakteri od manjeg taksonomskog značaja, odnosno njihova upotreba za razumevanje odnosa između viših taksonomskih kategorija je često ograničena. Sa druge strane, komponente koje predstavljaju produkt složenijeg biosintetskog puta mogu se karakterisati kao komponente sa ograničenom i specifičnom distribucijom u biljnom svetu, pa

je samim tim i njihov značaj veći. Kada se radi o konvergenciji, tj. pojavi istog jedinjenja u sklopu različitih biosintetskih puteva, potrebno je pored njegove strukture poznavati i biosintetsko poreklo molekula (Seigler, 1998), jer je definisanje određene strukture, odnosno biosintetskog puta, povezano sa razumevanjem filogenetskih odnosa kod biljaka (Waterman, 2007).

U knjizi „Biohemijska i molekularna sistematika biljaka“ (Marin, 2003) pregledno su navedene klase jedinjenja koje su najčešće razmatrane kao hemotaksonomski markeri na višim i nižim nivoima klasifikacije. U tom smislu se mogu koristiti masne kiseline, alkani, poliacetileni, monoterpeni, seskviterpeni, alkaloidi, flavonoidi, nukleinske kiseline, ali i drugi tipovi jedinjenja.

Biljke, kao produkte svog sekundarnog metabolizma, mogu sintetisati hemijski različite alkaloidne frakcije (Marin, 2003). Na primeru alkaloidne frakcije, prisutne kod nekih predstavnika roda *Sedum*, može se demonstrirati intradisciplinarni odnos prilikom provere, definisanja i potvrđivanja filogenetskih odnosa. Naime, otkako je prvi put izolovana smeša alkaloida (1939. godine), pod nazivom sedamin, među istraživačima se javila želja za detaljnim istraživanjem alkaloida (izolovanje, identifikacija i određivanje konfiguracije) kod predstavnika pomenutog roda. Dominantan izvor alkaloida je najpre bila vrsta *Sedum acre*, a kasnije su alkaloidi, u tragovima ili većoj količini, konstatovani i kod drugih predstavnika. Utvrđeno je da je reč o različito supstituisanim piperidinskim i pirolidinskim alkaloidima, izvedenim iz lizina i ornitina. Osim što se pomenuti, tzv. „sedum alkaloidi“ javljaju kod predstavnika familije Crassulaceae, registrovani su i kod drugih familija viših biljaka. Navedene činjenice su bile od interesa i za hemosistematiku, tako da je ispitivanjem distribucije alkaloida u okviru familije Crassulaceae utvrđeno da je njihova pojava ograničena na *Acre* kladu roda *Sedum*, čiji se vrste karakterišu karakterističnim čašičnim listićima (koji liče na mamuzu) i mrežastom semenjačom. Distribucija alkaloida je u navedenom slučaju u saglasnosti sa filogenijom familije koja se bazira na molekularnim podacima. U filogenetskom smislu, prisustvo alkaloida se vezuje za primitivne članove familije (stav je podržan i postojanjem primitivnih morfoloških karaktera kod istih vrsta), dok je kompletno odsustvo alkaloida konstatovano kod filogenetski naprednijih vrsta familije. Dakle, biosintetski gledano, produkcija navedenih alkaloida se verovatno jednom desila u familiji, u okviru klade *Acre*, a izostanak istih metabolita u drugim sekcijama se može objasniti naknadnim biosintetskim gubitkom. Takođe, strukturna kompleksnost i diverzitet navedenih alkaloida su povezani sa evolucijom taksona. Naime, prisustvo kompleksnijih piperidinskih i pirolidinskih alkaloida kod vrsta koje su izvor alkaloida, npr. *S. acre*, ukazuje

na filogenestki napredniji takson (*Stevens, et al. 1992; Stevens, et al. 1993; Stevens, et al. 1995*).

Sekundarni metaboliti obavljaju niz veoma značajnih funkcija u biljnom svetu. Tu se pre svega misli njihovu funkciju zaštite od herbivora i različitih patogenih mikroorganizama, ali i na uloge koje ostvaruju kao signalizirajući molekuli u alelopatiji i regulaciji kompetitorskih odnosa kod biljaka. Može se reći da sekundarni metaboliti predstavljaju jedan od mehanizama prirodne selekcije koji su se razvili u procesu evolucije, pa samim tim predstavljaju značajne adaptivne karaktere, zbog čega se i vrednuju u taksonomskim studijama (*Gottlieb, 1982; Wink, 2003*). Sekundarni metaboliti se naročito vrednuju na nižim nivoima klasifikacije kao pouzdani parametri koji omogućavaju i praćenje filogenije neke srodničke grupe biljnih organizama. Kada se govori o upotrebi sekundarnih metabolita u hemotaksonomiji biljaka, utvrđeno je da na njihovu varijabilnost i uopšte prisustvo u biljkama utiče veći broj faktora kao što su: starost jedinke ili biljnih organa (ontogenetska faza), genetičke razlike, lokalitet (geografska pozicija), karakteristike staništa (ekološka komponenta), kao i nedoslednost u načinu sakupljanja i tehnikama ekstrakcije i analize materijala (*Marin, 2003*).

Na kvalitativnu i kvantitativnu varijabilnost sekundarnih metabolita utiče čitav niz spoljnih i unutrašnjih faktora koji biljni organizam mogu da uvedu u stanje biotičkog ili abiotičkog stresa. Kao česti primeri koji potvrđuju navedenu činjenicu u literaturi se navode: nivo ugljen-dioksida, temperatura, osvetljenost, sastav podloge i drugi visoko varijabilni abiotički faktori. Sastav zamljišta, tj. sadržaj hranljivih materija u podlozi, može u znatnoj meri da utiče na produkciju pojedinih klasa jedinjenja. Smanjenje nutritivnih komponenti u hranljivoj podlozi dovodi do povećanja produkcije jedinjenja koja nastaju iz ciklusa šikimske kiseline (koja ne sadrže N-atom); osvetljenost staništa pozitivno utiče na produkciju fenolnih jedinjenja; količina vode utiče na produkciju cijanogenih glikozida, kondenzovanih tanina, alkaloida, terpena, itd. (*Seigler, 1998; Mohd Hafiz, et al. 2011*).

U tom smislu se u hemotaksonomskim istraživanjima često nailazi na izvesne probleme koji bacaju senku na primenljivost sekundarnih metabolita u taksonomiji (*Waterman, 2007*), kao što su:

- Prisustvo sličnih ili identičnih sekundarnih metabolita sa istim biosintetskim poreklom;
- Spoljašnji faktori koji utiču na finalne produkte sekundarnog metabolizma;

- Posredovanje sekundarnih metabolita između onog koji ih produkuje i predatora, patogena ili konkurenata;
- Otežano tumačenje evolutivnih procesa kroz promene koje se dešavaju, kako u biosintetskom putu tako i na supstratu i
- Pouzdanost hemijskih karaktera.

Pored klasičnog filogenetskog pristupa koji je zasnovan na morfološkim karakteristikama, u poslednje vreme su sve aktuelnija molekularna filogenetska istraživanja koja se temelje na karakterizaciji molekularnih markera (semantida) radi utvrđivanja genetskih odnosa između pripadnika različitih taksonomskih kategorija. U taksonomskim i filogenetskim istraživanjima se naročito vrednuju sledeći delovi genoma: DNK hloroplasta, ribozomalna DNK, DNK mitohondrija, satelitske sekvence DNK i ribozomalna RNK.

Informacije o odnosima organizama ili gena se dobijaju na osnovu upoređivanja homologa DNK ili sekvenci proteina. Različitosti na nivou sekvence ukazuju na genetsku divergenciju usled molekularne evolucije tokom vremena. Sa razvojem molekularne biologije, osamdesetih godina prošlog veka, razvijen je veliki broj tehnika koje su omogućile razmatranje varijabilnosti na infraspecijskom nivou ili čak unutar pojedinih sojeva. Istovremeno, javila se potreba za utvrđivanjem kooperativnosti ili kontraverznosti između tradicionalne i molekularne taksonomije. Kombinovanjem klasičnih metoda i metoda molekularne analize formira se kompletnija i pouzdanija slika o filogenetskim odnosima organizama (Marin, 2003, Singh, 2012.; Patwardhan, et al. 2014).

## 2.4. Obrada taksonomskih podataka

### 2.4.1. Numerička taksonomija

Pored razmatranja novih informacija, koje značajno doprinose taksonomskim istraživanjima, *Heywood* (1963) je smatrao revolucionarnim uvođenje numeričkih metoda. On je ocenio kao korisno klasifikaciju organizama prema svojoj sličnosti, odnosno različitosti, uzimajući u obzir karaktere jednake „težine“, pri čemu bi numeričke metode i korišćenje kompjutera, odnosno adekvatnih softvera omogućilo lakše manipulisanje podacima, pa bi cela procedura bila operativnija i ponovljiva (*Vernon*, 2001).

Numerička taksonomija (taksimetrija, fenetika) je postupak grupisanja taksonomskih jedinica numeričkim metodama u taksone na osnovu njihovih karakterata, odnosno afiniteta ili sličnosti koji ih karakterišu (*Nogrady*, 1998; *Sneath*, 1995; *Moss* i *Hendrickson*, 1973; *Sokal* i *Sneath*, 1963). *Adanson*, francuski botaničar, se među prvima zalagao za jednoobrazno, numeričko predstavljanje sličnosti među organizmima. U svojoj klasifikaciji, („*Adansonova* klasifikacija“), on se trudio da uvede što veći broj karakterata. Njegova načela su kasnije, naročito posle 1960. godine, predstavljala osnovu za razvijanje novih metoda u taksonomiji, odnosno taksimetriji (*Sharma*, 2009). Pedesetih i šezdesetih godina prošlog veka, sa razvojem informacione tehnologije, pomoću različitih softvera, omogućena je i elektronska obrada taksonomskih podataka. Pored mnogih prednosti, na ovaj način su prevaziđene poteškoće i nepravilnosti u grafičkom prikazivanju multivarijantnih podataka. Taksimetrija omogućava testiranje hipoteza i izvođenje multivarijantnih analiza (razmatranje više varijabli istovremeno) (*Grant*, 1984).

Prema takozvanim neo-*Adansonijanim* principima taksonomija se sagledava i praktikuje kao empirijska nauka u kojoj taksimetrijske sličnosti predstavljaju osnovu svake klasifikacije. Kvalitet i nivo pouzdanosti klasifikacija zavisi od broja karakterata, te u tom smislu treba uključiti što više različitih podataka ( saznanja) o organizmima u postupku njihove klasifikacije. U taksimetrijskom postupku izdvajanja novih taksona svaki karakter nosi jednaku „težinu“ i bliskost dva intetiveta predstavlja funkciju individualnih sličnosti. Takođe, suprotno od moguće bliskosti, između ispitivanih taksona se na osnovu različite korelacije karakterata može prepoznati i udaljenost. Uzimajući u obzir dobijeno klasifikovanje taksona i informacije o putevima i mehanizmima evolucije izvode se zaključci o evoluciji.



Prednost taksimetrije se ogleda u činjenici da je njome moguće izvršiti klasifikaciju bioloških sistema i u tom postupku korelisati veliki broj razlilitih podaka (morfoloških, hemijskih, molekularnih, itd.). Postupak je jednostavan, primenljiv i pouzdan i predlaže fundamentalne promene kod konvencionalnih taksonomskih načela. Nakon izvedenog taksimetrijskog postupka moguće je reinterpretirati postojeće klasifikacije organizama (*Sharma, 2009*).

#### 2.4.2. Hemometrija

Termin „hemometrija“ je prvi put korišćen od strane Volda (*Svante Wold*) i Kovalskog (*Bruce Kowalski*) kako bi se imenovala disciplina koja omogućava selekciju korisnih hemijskih podataka iz jednog kompleksnog eksperimentalnog sistema. Prema međunarodnom udruženju za hemometriju (engl. *International Chemometrics Society*), osnovanom 1974. godine, hemometrija je opisana/definisana kao: a) jedna od disciplina iz oblasti hemije koja koristi matematičke i statističke metode za osmišljavanje ili odabir optimalnih postupaka merenja i eksperimenata za dato istraživanje; b) postupak kojim se iz seta hemijskih podataka crpi i interpretira velika količina informacija od interesa (*dos Santos, et al. 2013*).

Praktičnost hemometrije se ogleda u korišćenju statističkih tehnika za konvertovanje podataka u konkretne informacije. Za razliku od univarijantnih metoda, koje razmatraju jednu varijablu u funkciji vremena, te daju delimične informacije o problemu, tj. objektu istraživanja, multivarijantana analiza omogućava interkorelaciju varijabli (uključuje više aspekata od interesa za dato istraživanje), zbog čega su dobijeni rezultati informativniji (*Oliveri i Forina, 2012*). Povezanost hemometrije i statistike se ogleda u činjenici da se hemometrijski koncepti i tehnike zasnivaju na matematičkim proračunima. Ako se statistika definiše kao proučavanje osobina „nasumičnih“ slučajnih brojeva (*random numbers*), onda hemometrija predstavlja metode obrade podataka koje se primenjuju na podacima značajnih za hemiju uopšteno. Dakle, u osnovi hemometrijskih istraživanja je objedinjenost hemijskih karaktera, statističkih tehnika, primenjene matematike i informatike radi najjednostavnijeg rešavanja zamišljenog ili konkretnog „problema“, odnosno najadekvatnijeg prikaza dobijenih rezultata (*Mark i Workman, 2007*).

U hemometrijskoj analizi je pravilno sagledavanje podataka (obrada i organizacija matrice), a potom i izbor odgovarajuće metode za konvertovanje brojčanih podataka u relevantne hemijske informacije od velikog značaja (*Oliveri i Forina, 2012*). U praksi, veliki

broj „moćnih“ i brzih analitičkih metoda, kao što su hromatografske, spektrofotometrijske i elektroforetske metode, generišu mnoštvo „sirovih“ podataka koji čine osnovu za formiranje obrazaca koji se kroz primenu velikog broja multivarijantnih metoda obrađuju i analiziraju. Najčešće korišćene multivarijantne metode su: analiza glavnih komponenti, multidimenzionalno skaliranje, klaster analiza, diskriminantna analiza, multipla linearna regresija i druge (Parente, 2011).

### 2.4.3. Statističke metode

Statistika predstavlja posebnu naučnu disciplinu, koja u osnovi podrazumeva kvantitativno istraživanje pojava u nekoj oblasti. Obzirom na dinamičnost pojave, odnosno odstupanje od konstantnosti ili utvrđenog kriterijuma, glavni zadatak statistike je ispitivanje i merenje varijabilnosti. Dakle, kada govorimo o statistici, mislimo na manipulaciju podacima koji predstavljaju skup različitih delova neke informacije ili činjenice koje je moguće identifikovati.

U današnje vreme je gotovo nezamislivo izvesti opsežno istraživanje bez statističke obrade podataka. Jedna od prednosti statističke analize je mogućnost svođenja velikog broja podataka na manji obim, smislen za predstavljanje, lakši za interpretaciju i razumevanje. Odabir adekvatne statističke metode zavisi od vrste studije koja se sprovodi, tj. kako ju je istraživač zamislio i dizajnirao, od hipoteze koju je postavio i vrste podataka koji se sakupljaju i dalje obrađuju. Poznavanje statističkih tehnika i prirode podataka omogućava pravilno i objektivno zaključivanje o datom istraživanju.

Među mnogobrojnim statističkim programima koji se sa razvojem informacione tehnologije takođe usavršavaju, mogu se navesti: STATISTICA, XLSTAT (*Statistical Software for Excel*) i SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Svaka statistička analiza podrazumeva fazu statističkog posmatranja i prikupljanja podataka za statističku obradu, zatim, sređivanje statističkih podataka i obradu sređenih statističkih podataka.

Element predstavlja osnovnu statističku jedinicu koja se posmatra u statistici. Grupa elemenata koja se karakteriše nekom zajedničkom osobinom čini statistički skup ili populaciju, a reprezentativni deo, tj. predstavnik populacije se naziva uzorak. Statistički skup treba da poseduje određenu homogenost (elementi populacije karakteriše najmanje jedna zajednička osobina), ali se isti skup treba diferencirati u odnosu na svojstva koja se statistički analiziraju. Varijable ili promenljive su identifikovani delovi nekog skupa, tzv.

statističko obeležje. Statistički skup, zajedno sa obeležjima elemenata datog skupa, predstavlja predmet proučavanja statistike. U tu svrhu se obeležja elemenata datog skupa mere, pri čemu vrednosti variraju u zavisnosti od elemenata skupa. Obeležja se mogu karakterisati kvalitativno, tj. opisno (svojstva kojima se ne dodeljuje numerička vrednost već se elementi sa datim svojstvima svrstavaju u kategorije) i kvantitativno (merljiva obeležja, čije se vrednosti izražavaju realnim brojevima).

Svaku populaciju i uzorak karakteriše broj elemenata ( $N$ ), srednja vrednost ( $\bar{X}$ ) i standardna devijacija ( $\sigma$ ).  $N$ -elemenata nekog skupa okarakterisani  $k$ -obeležjima, od  $x_1$  do  $x_n$ , čini osnovu, tzv. matricu podataka ( $N \times k$ ), i početak statističke obrade podataka (tabela 2).

**Tabela 2.** Tabela organizacija eksperimentalno dobijenih podataka: u redovima se predstavljaju elementi ili individue, a u kolonama se brojčano (kvantitativno) predstavljaju svojstva datog elementa

Elementi	Svojstva					
	S1	S2	S3	S4	...	Sn
<b>E1</b>	S1 <sub>E1</sub>	S2 <sub>E1</sub>	S3 <sub>E1</sub>	S4 <sub>E1</sub>	...	Sn <sub>E1</sub>
<b>E2</b>	S1 <sub>E2</sub>	S2 <sub>E2</sub>	S3 <sub>E2</sub>	S4 <sub>E2</sub>	...	Sn <sub>E2</sub>
<b>E3</b>	S1 <sub>E3</sub>	S2 <sub>E3</sub>	S3 <sub>E3</sub>	S4 <sub>E3</sub>	...	Sn <sub>E3</sub>
⋮						
<b>Em</b>	S1 <sub>Em</sub>	S <sub>Em</sub>	S3 <sub>Em</sub>	S4 <sub>Em</sub>	...	Sn <sub>Em</sub>

Deskriptivnom statistikom se opisuju izmerene pojave u domenu merenja, dok analitičkom statistikom se na osnovu merenja utvrđuju opšte zakonitosti koja važe u domenu onog što nije mereno (*Murray i Marshall, 2009; Bojović i Mitrović, 2010; Perić-Grujić, 2012*).

#### 2.4.3.1 Osnovna analiza podataka, deskriptivna statistika

Deskriptivna statistika predstavlja numeričku ili grafičku tehniku koja se koristi kako bi se organizovali, predstavili i analizirali podaci na smislen način pomoću nekoliko indeksa/parametara. Vrsta deskriptivne statistike koja se primenjuje na određenom setu podataka zavisi od nivoa merenja koji je primenjen.

Statistički parametri kojima se opisuju obeležja datog skupa su srednja vrednost, varijabilnost, simetričnost i spljoštenost.

Srednja vrednost zavisi od svih vrednosti datog obeležja, a predstavlja centralnu vrednost i nalazi se između minimalne i maksimalne vrednosti obeležja (aritmetička sredina, harmonijska sredina, geometrijska sredina, modus i medijana). Izražava se u istim jedinicama kao i osnovni podaci.

Varijabilnost zavisi od ukupnih razlika vrednosti nekog obeležja koje se odnosi na elemente posmatranog skupa (razmak varijacije, kvartilna devijacija, srednja devijacija, varijansa i standardna devijacija, koeficijent varijacije).

Simetričnost i spljoštenost su parametri koji se odnose na raspodelu nekog obeležja na statističkom skupu (koeficijent asimetrije, koeficijent spljoštenosti)

Početna analiza multivarijantnih podataka najčešće podrazumeva izračunavanje: srednje vrednosti, standardne devijacije, koeficijenta varijacije i grafički prikaz podataka (Vuković i Spasić, 2011).

#### 2.4.3.2 Statističko testiranje, analiza varijanse

Gotovo neizostavni deo statističke analize jeste ispitivanje statističke značajnosti. Njome se utvrđuju i razmatraju faktori koji utiču na svojstva posmatranog objekta ili skupa. Procena statističke značajnosti se donosi uz pomoć pretpostavki ili hipoteza.

Analiza varijanse (ANOVA, *Analysis of variance*) svrstava se u univarijantne tehnike analize i upotrebljava se za poređenje više od dve srednje vrednosti, tj. kada se analizira način na koji različiti tipovi i kombinacije faktora (nezavisne promenljive) utiču na srednju vrednost varijable (zavisno promenljiva). Pomoću ove metode se ispituje homogenost podataka, odnosno razlika između srednjih vrednosti ispitivanih grupa. Ukoliko istraživanje započinje sa pretpostavkom ( $H_0$ ) da sve ispitivane grupe imaju istu vrednost, a istraživanje obuhvata više od dve grupe podataka, onda koristimo analizu varijanse (t-test za dve grupe).

Jednosmerna ANOVA (*One-way ANOVA*) je najjednostavnija forma testiranja, jer uključuje uticaj jednog faktora: kontrolisanog efekta, kao što su sistemske greške, ili slučajnog efekta. Variranje se dešava između uzoraka (intervarijabilitet) i unutar uzorka (intravarijabilitet), te ukupna varijabilnost zavisi od obe pojave. Pored srednje vrednosti, kod ovog testiranja se razmatra varijansa ( $\sigma$ ) u zavisnosti od tipa variranja: unutar uzorka ili između uzoraka. F-testom ova dva tipa variranja se svode na jednu vrednost, F vrednost (F vrednost kao količnik variranja između uzoraka i variranja unutar uzoraka). Rezultati jednosmernog ANOVA testa se predstavljaju komentarisanjem statističke značajnosti (*significance*),  $p$  vrednosti i F vrednosti. Obe vrednosti se dobijaju primenom odgovarajućeg statističkog softvera, tj. odabrane metode.

Ukoliko je  $p > 0,05$ , ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti uzoraka ili grupa, te se nulta hipoteza prihvata. Ali, kada je  $p \leq 0,05$ , postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti uzoraka ili grupa, prihvata se alternativna hipoteza koja tvrdi da postoji razlika i da ispitivani faktori imaju uticaja na ispitivano svojstvo. Razlikujemo tri nivoa statističke značajnosti, kada je  $p \leq 0,05$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ . Statistička značajnost je utoliko veća ukoliko je vrednost  $p$  manja. Izračunata F vrednost se upoređuje sa tabličnom. Kad je izračunata F vrednost manja od odgovarajuće tablične vrednosti, nulta hipoteza se prihvata i obratno, kada je izračunata F vrednost veća od odgovarajuće tablične vrednosti prihvata se alternativna hipoteza. U praksi se se najpre sagledava i utvrđuje koje od ispitivanih varijabli doprinose usvajanju alternativne hipoteze, kada je  $p \leq 0,05$ . Nakon toga se među njima utvrđuje čiji je doprinos u diferenciranju grupa najveći, na osnovu tri nivoa statističke značajnosti. Za varijable sa istim nivoom značajnosti, ona koja ima veću F vrednost je statistički značajnija, odnosno u većoj meri doprinosi diferenciranju grupa (*Bewick, et al. 2004; Bojović i Mitrović, 2010; Perić-Grujić, 2012*).

#### 2.4.3.3 Multivarijantne tehnike analize podatka

Kada istraživanje zahteva sagledavanje multivarijantne prirode podataka, pribegava se primeni multivarijantnih tehnika analize (MVA). Multivarijantnost se odnosi na postupak praćenja nekoliko promenljivih po uzorku istovremeno. Što je veći broj varijabli to je grafički prikaz informacija složeniji. MVA tehnika se temelji na različitim matematičkim modelima i omogućava analizu odnosa između više od jedne nezavisne promenljive i jedne ili više zavisno promenljivih. Korišćenje MVA se razmatra još u toku dizajniranja istraživanja;

njome je moguće kontrolisati i modifikovati različite efekte, ali i sumirati mnoštvo nezavisnih varijabli u konačnu varijablu koja je od interesa za dato istraživanje (*Daszykowski, et al. 2007; Sheen, et al. 2011; Perić-Grujić, 2012*).

Izbor metode za obradu prikupljenih podataka (matrica) zavisi od vrste problema, tipa podataka, metode i cilja istraživanja.

Prednost MVA se ogleda u mogućnosti da se veliki broj podataka svede na obim koji se lakše interpretira; omogućava sortiranje i grupisanje podataka, sagledavanje multivarijantnosti i „predviđanja“ na osnovu dobijenih rezultata, postavljanje i testiranje hipoteza.

#### 2.4.3.3.1. Faktorska analiza i analiza glavnih komponenti

Faktorska analiza (FA, engl. *Factor Analysis*) i analiza glavnih komponenti (PCA, engl. *Principal Component Analysis*) su procedure koje se koriste kako bi se redukovao broj podataka, vizuelizovala i olakšala interpretacija istih. Pomenute tehnike omogućavaju da se pomoću manjeg broja varijabli, koje su označene kao faktori (kod FA) ili glavne komponente (kod PCA), sumiraju informacije sadržane u mnoštvu promenljivih. Faktori ili glavne komponente predstavljaju linerne kombinacije originalnih varijabli ( $X_1, X_2, X_3, \text{ itd.}$ ):

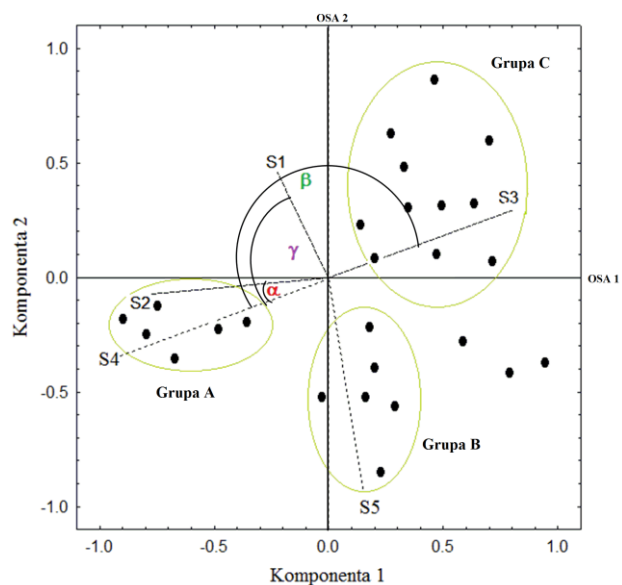
$$\begin{aligned} F1 &= a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1n} X_n \\ F2 &= a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2n} X_n \\ &\dots \\ Fm &= a_{m1}X_1 + a_{m2}X_2 + a_{m3}X_3 + \dots + a_{mn} X_n \end{aligned}$$

Faktorska analiza je usko povezana sa PCA. Razlika između FA i PCA je metodološke prirode. Naime, PCA uzima u obzir sve vrste varijabilnosti iz seta inputovanih (ulaznih) varijabi, dok FA uzima u obzir samo zajedničke vrste varijabilnosti iz seta inputovanih (ulaznih) varijabi, tj. ignoriše varijabilnost jedne varijable koja nije u vezi sa varijabilnošću bilo koje inputovane varijable (dok je PCA uzima u obzir). Bez obzira na pomenute razlike, interpretacija podataka dobijenih iz FA i PCA je ista (*Gleason, et al. 2015*).

Analiza glavnih komponenti je deskriptivna metoda, kojom se, iz mnoštva podataka, vizuelizuje tendencija odnosa, grupisanja i izdvajanja. To je analiza bez predubeđenja, hipoteza i verovatnoće. U zavisnosti od istraživanja, ona može biti dovoljno informativna, ali takođe može predstavljati etapu koja prethodi primeni specifičnijih metoda analiza. Iako ne spada u *a priori* analizu, smatra se uspešnom ukoliko krajni rezultat (prve dve ose) objašnjava više od 50 % ukupne varijabilnosti.

Dakle, nakon pravilne sistematizacije podataka i izvođenja analize korišćenjem odgovarajućeg softverskog paketa, sledi interpretacija dobijenih podataka koja je olakšana zahvaljujući dvodimenzionalnom grafikonu (*scatter plot*) koji se najčešće formira u prostoru prve dve ose, koje nose najveći deo ukupne varijabilnosti (*cumulative percentage*). To je u stvari slikovit, prikaz skorova (*scores*) i opterećenja (*loadings*) glavnih komponenti po svakoj osi. Drugačije rečeno, koeficijenti linearnih kombinacija formiraju glavne ose (PA1 i PA2). Svojstvo koje se karakteriše najvećom apsolutnom vrednošću (pozitivna ili negativna vrednost, svejedno), u najvećoj meri doprinosi formiranju te ose. Interpretiranje podataka predstavlja postupak opisivanja grupisanjem objekata/elementa (tačkaste formacije) u odnosu na varijabilnost svojstva sa najvećim doprinosom.

Ukoliko su svojstva prikazana kao vektori koji se ukrštaju u preseku glavnih komponenti (osa), prilikom tumačenja i predstavljanje rezultata treba uzetu obzir dužinu, smer i ugao koji međusobno zaklapaju; međusobni položaj elementata i položaj elemenata u odnosu na dato svojstvo (vektor) i presek osa. Pozicija vektora na dijagramu (smer i ugao) pokazuje korelaciju svojstava koja se razmatraju u datom istraživanju. Svojstva su jače korelisana ukoliko je ugao koji zaklapaju vektori manji, bliži nuli, tada se radi o pozitivno korelisanim svojstvima, ili bliži  $180^0$ , kada se radi o negativno korelisanim svojstvima. Slaba korelacija između svojstava se odnosi na ugao jednak ili blizak  $90^0$ . Takođe, ukoliko je ugao između svojstva i ose manji, to svojstvo svojom varijabilnošću više doprinosi formiranju te ose. Na primer, svojstva S2 i S4 ( $\alpha < 90^0$ ) su visoko pozitivno korelisana, a S4 i S3 ( $\beta \sim 180^0$ ) visoko negativno korelisana i S4 i S1 slabo korelisana svojstva ( $\gamma \sim 90^0$ ). Nije uvek pravilo, ali svojstva sa dužim vektorima su vernije prikazana. Ispitivani elementi koji su međusobno slični u odnosu na neko ispitivano svojstvo su i na dijagramu bliski, tj. imaju tendenciju ka grupisanju. Elementi grupe A su bliski svojstvu S4 i S2, što ukazuje da se ova grupa karakteriše povišenim sadržajem pomenutih svojstava, ali istovremeno i nižim sadržajem svojstva S3, jer je položaj grupe u istom pravcu ali suprotnom smeru u odnosu na dati vektor (slika 3). Elementi dalji od koordinatnog početka su vernije prikazani od onih u njegovoj blizini. Prilikom tumačenja rezultata preporučuje se konsultovanje osnovne tabele radi što je moguće pravilnijeg sagledavanja odnosa elemenata na dijagramu (Miller i Miller, 2010; Bojović i Mitrović, 2010).



**Slika 3.** Pojednostavljen prikaz grupisanja ispitivanih elemenata u odnosu na vektore svojstava S1, S2, S3 i S4 na dvodimenzionalnom dijagramu (modifikovano, Bojović i Mitrović, 2010)



#### 2.4.3.3.2. Diskriminantna analiza

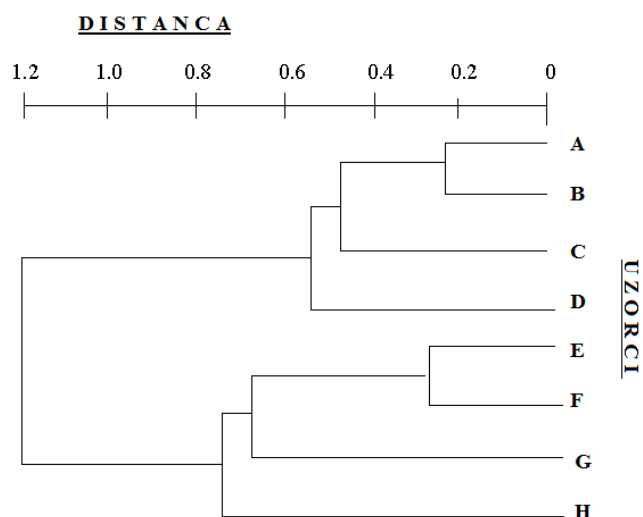
Osnovni zadatak diskriminantne analize (DA, engl. *Discriminant Analysis*) jeste, kao što i sam naziv metode poručuje – diskriminacija, tj. razdvajanje različitih grupa i izmeštanje objekata u unapred definisane (*a priori*) grupe. Diskriminacija ili razdvajanje između grupa se odnosi na postupak utvrđivanja statistički značajnih razlika između dve ili više grupa. Ukoliko se grupe statistički razlikuju, dalje se utvrđuje koja od varijabli najviše doprinosi utvrđenoj razlici. Klasifikacija ili izmeštanje objekata je utvrđivanje postupka radi klasifikacije objekata na osnovu vrednosti više varijabli, u dve ili više razdvojenih, unapred definisanih grupa. Kao i kod FA ili PCA, cilj analize je da se veliki broj varijabli transformiše u nove, tzv. diskriminantne varijable (linearne kombinacije originalnih varijabli) na osnovu kojih se grupe diskriminišu. Prvi korak linearne diskriminantne analize (LDA) je definisanje linearne diskriminantne funkcije, koja predstavlja linearnu kombinaciju originalnih varijabli ( $Y = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_nX_n$ ). Na ovaj način se veliki broj n-merenja svodi na jednu vrednost (Y), odnosno sa n-dimenzija na jednu. Y predstavlja različitost u što je moguće većoj meri; objekti jedne grupe imaju sličnu vrednost funkcije, dok objekti iz različitih grupa se veoma razlikuju u odnosu na vrednosti funkcije Y. Generalno, linearna diskriminantna funkcija daje mogućnost diskriminacije između grupa.

Alternativna metoda jeste kanonijska analiza, koja predstavlja ekstenziju LDA i omogućava diskriminaciju više grupa. U okviru kanonijske DA definiše se više linearnih diskriminantnih funkcija Y1, Y2, itd., pri čemu Y1 odražava diskriminaciju u najvećoj meri, a Y2 reflektuje „preostali“ deo različitosti u što je moguće većoj meri. Između Y1 i Y2, itd. ne postoji korelacija (Miller i Miller, 2010; Lix i Sajobi, 2010; Perić-Grujić, 2012).

#### 2.4.3.3.3. Klaster analiza

Klaster analiza (AHC, engl. *Agglomerative Hierarchical Clustering*; *cluster*, engl. grupa) podrazumeva metode kojima se vrši grupisanje seta observacija/slučajeva (*cases*) u set klastera na osnovu njihove sličnosti ili različitosti u odnosu na unapred osmišljen set karaktera ili atributa. Grupisanje objekata zavisi od metoda koje se koriste za formiranje klastera (slika 4). Različite metode daju različita rešenja problema, odnosno različit raspored objekata u okviru jednog klastera. Zato eksperimentator u svojoj studiji mora da naglasi kojom metodom (algoritmom) je formirao rezultujući klaster i, naravno, set varijabli koji mu

je to omogućio. Svrha svake metode je udruživanje objekata u sukcesivno veće klasterne. Bliži objekti su međusobno sličniji i, obrnuto, sa distancom između objekata razlika je veća. Sa distancom i udruživanje/agregacija objekata ide u smeru formiranja sve većih klastera dok se svi objekti ne obuhvate jednim klasterom, specifičnim dijagramom koji se naziva dendrogram („hijerarhijsko stablo“). Na dendrogramu, koji vizuelizuje udruživanje objekata, sa horizontalne ose se očitava distanca za svaki čvor u razgranatom sistemu na kojoj su objekti grupisani u odgovarajući klaster (posebna grana). Distanca, koja se koristi za formiranje klastera, se može izračunati na nekoliko matematički definisanih načina Euklidova distanca (*Euclidean distance*) je jedna od najčešće korišćenih za formiranje klastera. Spajanje, aglomeracija objekata u jedan klaster je takođe utvrđeno posebnim metodama/algorithmima (*Gan, et al. 2007; dos Santos, et al. 2013; Gleason, et al., 2015*).



Slika 4. Primer dendrograma (dos Santos, et al. 2013)

#### 2.4.3.3.4. Korespodentna analiza

Korespodentna analiza (CA, engl. *Correspondence Analysis*; *correspondance* – princip ili način udruživanja između elemenata dva seta) predstavlja neparametarsku, multivarijantnu tehniku analize, koja prikazuje asociranost između nominalnih, tj. kodiranih svojstava. U slučaju kada se prati asociranost između parova nominalnih varijabli reč je o jednostavnoj dvosmernoj (*two-way*) CA, dok multipla (*multy-way*) korespodentna analiza (MCA) uzima u obzir obrazac koji obuhvata odnose nekoliko nominalnih varijabli. Metoda omogućava da se na jednostavan način predstavi informacija sadržana u frekvenciji, tj. učestalosti različitih stanja više nominalnih promenljivih. Matrica je ispunjena kodiranim podacima, tj. varijable su najčešće označene kao dve kategorije: 1 ili 0, što označava prisustvo ili odsustvo datog svojstva. Rezultati se najčešće prikazuju grafički u dve dimenzije, interpretiranje podataka je u skladu sa međusobnom asociranošću ispitivanih grupa/elementa sa svojstvima na dvodimenzionalnom grafikonu, u odnosu na prvu i drugu korespodentnu osu.

Na ovaj način se može analizirati mali ili obimniji set podataka, gde podaci mogu biti različitog tipa, uniformno kodirani. Metoda nije osetljiva na varijacije broja ili veličine, ali je njome omogućen skrining obimnog, nestrukturisanog seta podataka, sugerišući koja varijabla (ili više njih) diskriminiše uzorak, najudaljenije vrednosti (*outlier*) i greške u setu. Analiza takođe daje mogućnost konstruisanja identifikacionih rešenja i selekciju grupa varijabli prema značaju za diskriminisanje uzorka. Ono što je jako značajno za taksonomska istraživanja je da korespodentna analiza pruža mogućnost simultanog razmatranja odgovarajuće varijable i ordiniranje taksona, odnosno, utvrđivanje njihovog odnosa (*Sieber, et al. 1998; Abdil i Valentin, 2007; Yelland, 2010*).

## 2.5. Epikutikularni voskovi

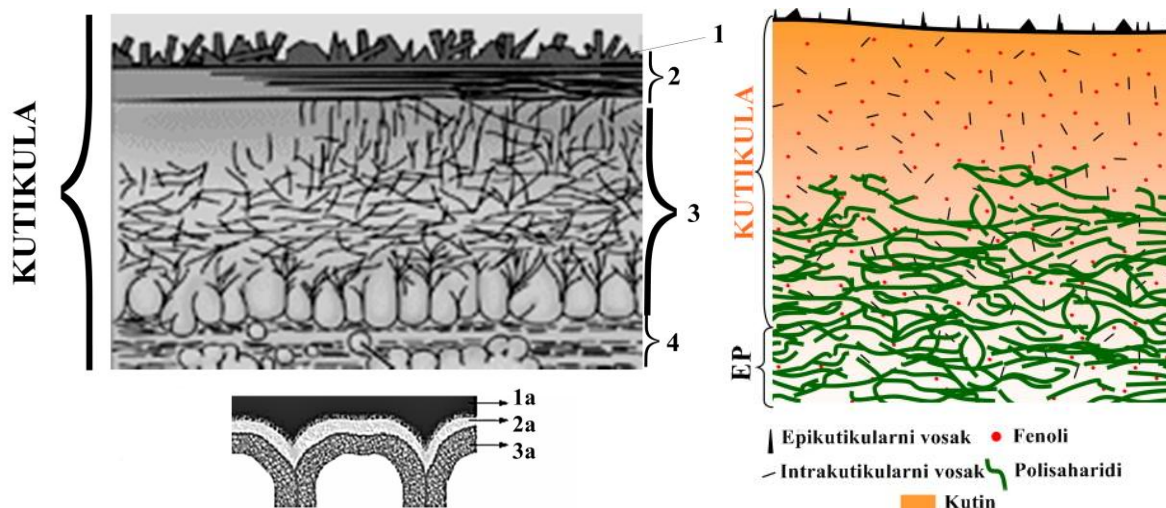
### 2.5.1. Građa kutikule kod biljaka

Kao što koža predstavlja omotač tela preko kojeg ljudski organizam ostvaruje neposredni kontakt sa svojom okolinom, štiti organizam i učestvuje u različitim procesima od esencijalnog značaja za jedinku, tako su i drugi organizmi obavijeni slojem koji vrši iste ili vrlo slične funkcije za dati organizam. Između ostalog, različitost se ogleda u specifičnom sastavu i strukturi zaštitnog omotača, odnosno dominantne komponente u njemu. Tako, na primer, polimerne strukture koje čine najveći deo zaštitnog pokrovnog tkiva (epidermisa) kod biljaka jesu biopoliestar, voštani polimer sagrađen od ćelijskih lipida – kutina (*Kolattukudy*, 2005).

Kada su prve biljke, pre 460 miliona godina, napustile vodenu sredinu i „preselile se“ na kopno, za novu, „suvu“ sredinu, razvile su zaštitni omotač – intaktnu ekstracelularnu membranu, tj. kutikulu. Latinska reč iz koje je izveden termin kutikula (*cuticula*) znači tanka koža. Sam naziv je prošao kroz jednu vrstu evolucije i promenu značenja. Najpre se primarno pokrovno tkivo ili epidermis označavalo kutikulom, uz naglašavanje bliskosti sa životinjskom kožom koja je takođe ćelijske prirode. *Candolle* (1827) je insistirao da se koristi francuska reč *cuticule* koji označava spoljašnji film, tanak sloj ili ekstracelularnu membranu koji obavija spoljne zidove epidermalne ćelije. Najzad, reč je 1852. godine uvedena i u engleski jezik, *cuticle*, nakon prevoda knjige sa nemačkog (*H. von Mohl – Principles of the anatomy and physiology of the vegetable cell*) (*Koch, et al.* 2009; *Rieder*, 2006).

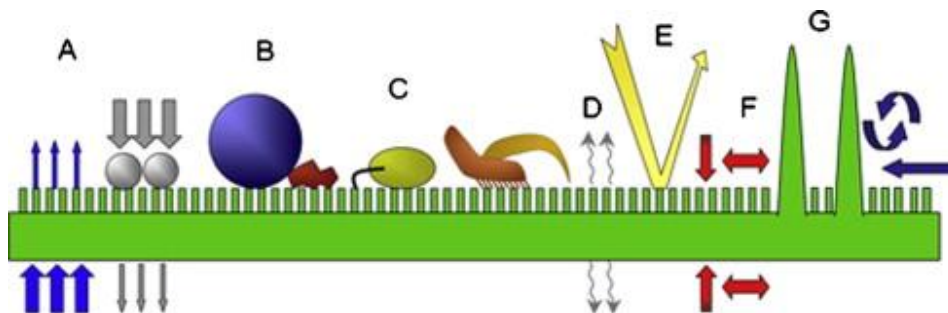
Biljka ostvaruje kontakt sa svojom okolinom preko kutikule. Njome su najčešće obavijeni listovi, plodovi, zeljasti delovi stabla, ređe cvetovi i drške, dok koren nije prekriven kutikulom (*Barthlott i Neinhuis*, 1997). Iako je kutikula karakteristična za evolutivno razvijenije grupe biljaka, ona se može javiti i kod jetrenjača, mahovina i paprati. Kutikula je vezana za epidermis pomoću pektinskog sloja (polisaharid). Njena debljina varira u zavisnosti od biljne vrste i biljnog organa. Sastoji se iz epikutikularnog voska, lamela (kutin i vosak) i retikularnog dela koji predstavlja vezu između kutikularne membrane i ćelijskog zida (slika 5). Struktura kutikule varira u zavisnosti od biljne vrste, organa biljke i faze razvića. Najvažnije uloge kutikularne membrane su: kontrola transpiracije, kontrola unosa i gubitka polarnih supstanci, kontrola razmene gasova i isparavanja, transport lipofilnih supstanci,

kontrola vlažnosti, zaštita od štetnog zračenja, zaštita od mehaničkih oštećenja i učešće u biotičkim interakcijama (slika 6) (Heredia, 2003; Heredia i Domínguez, 2009; Kolattukudy, 2005; Riederer, 2006).



Slika 5. Struktura kutikule

1 – Epikutikularni vosak, 2 – lamelarni kutin, 3 – kutin i polisaharidi, 4 – sekundarni ćelijski zid; 1a – kutikula, 2a – pektin, 3a – epidermalni ćelijski zid (Heredia i Domínguez, 2009; Kolattukudy, 2005); EP – spoljni zid epidermalnih ćelija (Domínguez, et al. 2011).



Slika 6. Shematski prikaz procesa koji se odigravaju na hidrofobnoj površini kutikule (Koch, et al. 2009)

A – transportna barijera, ograničenje u nekontrolisanom gubitku vode iz tkiva i suprotno, folijarni unos vode; B – održavanje vlažnosti; C – anti-adhezivne i osobine samočišćenja, smanjenje kontaminacije, zaštita od napada patogenih organizama i insekata; D – signalizacija u odnosu sa saprofitnim mikroorganizmima i insektima; E – optičke osobine, zaštita od štetnog zračenja; F – mehaničke osobine, postojanost prema mehaničkom stresu i održavanje integriteta; G – termoregulacija, snižavanje temperature na površini lista turbulentnim strujanjem vazduha na površini (Koch, et al. 2009).

Kao što je već pomenuto, najveći deo kutikule čini voodootporni poliestar – kutin, koji kao gradivna komponenta čini između 40 i 80% mase kutikularne membrane. Smeša lipofilnih molekula povezanih pomoću estarskih veza u polimer čini kutikulu hidrofobnom strukturom, odnosno složenom lipidnom barijerom. Detaljnije, polimer čine C<sub>16</sub> i C<sub>18</sub> oksigenovane masne kiseline umrežene estarskim vezama koje vode poreklo od oleinske i linoleinske kiseline, dobijene ω-hidroksilacijom ili epoksidacijom dvostruke veze koja je praćena hidroksilacijom epokisida uz učešće enzima kao katalizatora. U sastav polimernog matriksa takođe ulazi i glicerol. Sastav kutina se utvrđuje nakon izolovanja i depolimerizacije, raskidanja estarskih veza i dobijanja monomernih jedinica i njihovih derivata. Oba postupka se služe specifičnim hemijskim reagensima i enzimima. NMR, FT-IR (*Fourier-transform infrared*) spektroskopska analiza i rentgenska strukturna analiza (*X-ray diffraction*) su tehike koje se najčešće koriste za strukturnu analizu komponenti kutina (*Heredia*, 2003; *Heredia i Domínguez*, 2009; *Kunst i Samuels*, 2009).

### 2.5.2. Epikutikularni vosak: sastav i funkcija

Kutikularna membrana, tj. polimerni matriks obavijen je i impregniran intrakutikularno voštanim komponentama. Voštani sloj u vidu filma na površini kutikule se naziva epikutikularni ili kutikularni vosak, dok je intrakutikularni vosak amorfnu smeša lipida ugrađena u kutin. Epikutikularni vosak može biti kristaloidnog izgleda (kod lista lotosa ili kupusa) i glatkog izgleda (kod lista vinove loze). Strukturna i razlika u hemijskom sastavu između ova dva voštana sloja se može napraviti nakon selektivnog izolovanja i analize, najpre epikutikularnog, a potom i intrakutikularnog voska: mehanički, pomoću guma arabike ili krio-adhezionom tehnikom sa vodom (*Taylor*, 2011, *Riederer*, 2006; *Kunst i Samuels*, 2003; *Riedel*, et al. 2003; *van Maarseveen i Jetter*, 2009). Epikutikularni vosak predstavlja dvodimenzionalne i trodimenzionalne strukture, debljine od nekoliko nanometara pa do nekoliko mikrometara. Vosak ima veoma značajnu ulogu u životu svake vaskularne biljke. U najširem smislu, biljka preko njega ostvaruje kontakt sa svojom okolinom: funkcionalni i ekološki aspekt (*Reicosky i Hanover*, 1978; *Post-Beittenmiller*, 1996; *Kunst i Samuels*, 2003; *Maffei*, et al. 2004; *Koch*, et al. 2008).

Štiteći biljku od štetnih uticaja sredine/staništa, njegova struktura i sastav se menjaju. Među mnogobrojnim faktorima sredine koji mogu uticati na produkciju i strukturu voska, najprimetnije promene izazivaju temperatura i intenzitet svetlosti. Interesantno je da se

promene u strukturi voska pod uticajem faktora sredine češće dešavaju kod epikutikularnih voskova sačinjenih od predstavnika različitih klasa jedinjenja u odnosu na voskove u kojima dominira samo jedna klasa jedinjenja. Pojedine studije su pokazale da je veliki broj gena uključen u produkciju voskova, kao i to da su epikutikularni voskovi uglavnom inertni u pogledu biološke aktivnosti (Lemieux, 1996; Seigler, 1998).

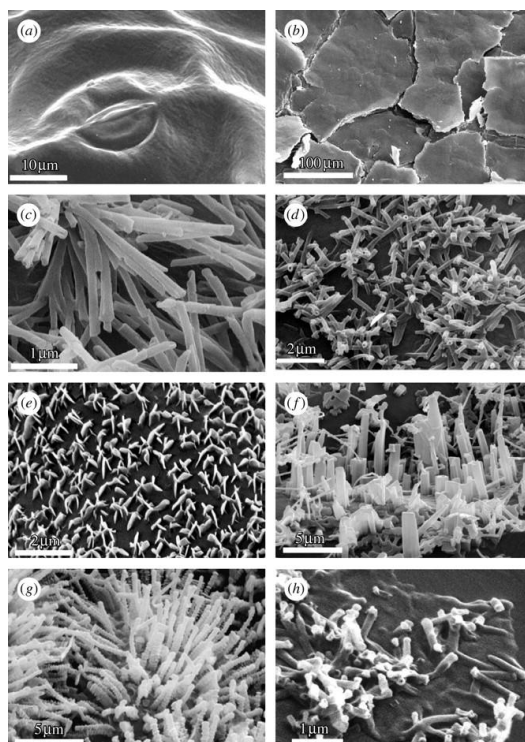
Sinteza konstituenata voska se odigrava u epidermalnim ćelijama odakle putem kutikularne membrane (kutikularnih pora) migriraju do spoljašnjosti biljnog organa formirajući finu kristalnu strukturu (Jefree, et al. 1976). Sa aspekta hemijskog sastava, epikutikularni vosak predstavlja složenu smešu različitih organskih jedinjenja. Dominantno prisutna klasa jedinjenja su dugolančani *n*-alkani, i to C<sub>27</sub>-C<sub>31</sub>. Pored alkana, u vosku se mogu naći i drugi derivati, npr. nezasićeni ugljovodonici, alkoholi, aldehidi, ketoni, kiseline, estri i druga srodna jedinjenja (Marin, 2003). Takođe se mogu naći ciklična jedinjenja: triterpeni, derivati hidroksicimetne kiseline, steroli i flavonoidi (Kunst i Samuels, 2003; Heredia i Domínguez, 2009). Forma struktura koje čine epikutikularni vosak u velikoj meri zavisi od njegovog hemijskog sastava (slika 7). Zavisno od toga koja klasa ili tip jedinjenja dominira, vosak može imati lamelarni (visok sadržaj primarnih alkohola), amorfni (dominantno prisutni alkani), igličasti ( $\beta$ -diketoni, asimetrični sekundarni alkoholi), glaukozni izgled (triterpeni i sekundarni alkoholi); tabela 3. (Jefree, et al. 1976; Stevens, et al. 1994; Lemieux, 1996; Osborne i Stevens, 1996). Na slici 8. je prikazan izgled površine epidermisa lista vrste *S. album* koji je snimljen pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (uvećanje 1000 puta, razmera 10  $\mu$ m). Beličaste ljuspice na epidermisu lista predstavljaju epikutikularni vosak.

**Tabela 3.** Voštane strukture koje se često sreću kod biljaka: tip strukture, biljna vrsta i dominantne komponente voska (Koch, et al. 2009; Koch i Barthlott, 2009)

Tip voska	Biljna vrsta	Dominantne komponente
Ljuspe (ljuspast izgled)	<i>Crassula ovata</i>	Aldehidi C <sub>30</sub> , C <sub>32</sub>
<i>Slika Bb)</i>		Alkani C <sub>31</sub>
Diketonski-tip tubula (cevčice)	<i>Eucalyptus globulus</i>	β-diketoni C <sub>33</sub>
<i>Slika Bc)</i>	<i>Leymus arenarius</i>	β-Diketon C <sub>31</sub> Hidroksi-β-diketon C <sub>31</sub>
Film (ravna prevlaka)	<i>Hedera helix</i>	1° alkoholi, aldehidi
<i>Slika Ba)</i>	<i>Magnolia grandiflora</i>	Masne kiseline C <sub>24</sub> -C <sub>30</sub> , 1° Alkoholi C <sub>24</sub> -C <sub>28</sub>
	<i>Prunus laurocerasus</i>	Alkani C <sub>29</sub> , C <sub>31</sub>
	<i>Ginkgo biloba</i>	2° Alkohol C <sub>29</sub>
	<i>Juniperis communis</i>	2° Alkohol C <sub>29</sub> Hidroksi-masne kiseline
Nonakozanol-tip tubula (cevčice)	<i>Nelumbo nucifera</i>	2° Alkandioli C <sub>29</sub>
<i>Slika Bd)</i>	<i>Thalictrum flavum</i>	2° Alkohol C <sub>29</sub>
	<i>Tropaeolum majus</i>	2° Alkohol C <sub>29</sub>
	<i>Tulipa gesneriana</i>	2° Alkohol C <sub>29</sub>
	<i>Convallaria majalis</i>	1° Alkohol C <sub>26</sub> , C <sub>28</sub> Aldehidi
Platele (pločast)	<i>Euphorbia myrsinites</i>	1° Alkohol C <sub>26</sub> Aldehidi
<i>Slika Be)</i>	<i>Galanthus nivalis</i>	1° Alkohol C <sub>26</sub>
	<i>Iris germanica</i>	1° Alkohol C <sub>26</sub>
	<i>Triticum aestivum</i>	1° Alkohol C <sub>28</sub>
Transverzalne grebenaste štapičaste strukture	<i>Aristolochia tomentosa</i>	Ketoni
<i>Slika Bg)</i>	<i>Gypsophila acutifolia</i>	Alkani C <sub>31</sub>
	<i>Liriodendron chinense</i>	Ketoni
Longitudinalne grebenaste štapičaste strukture	<i>Benincasa hispida</i>	Triterpenil-acetati
<i>Slika Bf)</i>		

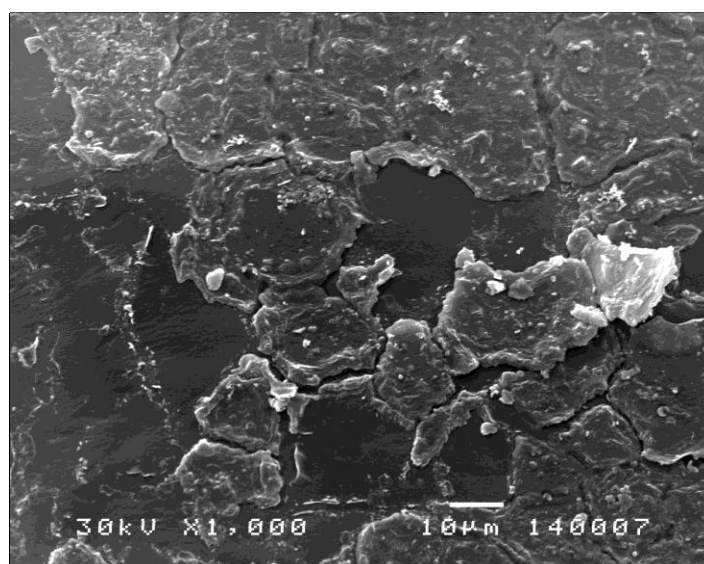
†1° Alkoholi – primarni alkoholi; 2° alkoholi – sekundarni alkoholi.





**Slika 7.** SEM mikrografije na kojima se mogu uočiti različiti tipovi epikutikularnih voštanih struktura (Koch i Barthlott, 2009)

Tanak voštani film (a), jedva vidljiv mikroskopom, prisutan kod mnogih vrsta, npr. *Hydrocotyle bonariensis*; voštane ljupe sa fisurama na listu vrste *Crassula ovata* (b);  $\beta$ -diketonski voštani tubuli (cevaste strukture) *Eucalyptus gunnii* (c), nonakozanol-tip tubula na listu *Thalictrum flavum* (d); pločaste strukture na listu, *Robinia pseudoacacia* (e); jednostavne štapičaste strukture na listu vrste *Brassica oleracea* (f); transverzalne, grebenaste štapičaste strukture na listu vrste *Sassafras albidum* (g); tubularna struktura na voštanom filmu (h) (mehanički izolovan vosak sa lista vrste *Thalictrum flavum*).



**Slika 8.** SEM mikrografija voštanih struktura na površini epidermisa lista vrste *S. album*

Proučavanje morfologije voska različitih biljnih vrsta je nezamislivo bez posebnih mikroskopskih metoda. TEM (*Transmission Electron Microscopy*) i SEM (*Scanning Electron Microscopy*) su metode koje se veoma dugo i uspešno koriste u te svrhe. Ispitivanjem površine listova različitih biljaka pomoću SEM tehnologije predstavljen je čitav spektar raznovrsnih voštanih mikrostrukture (*Barthlott i Neinhuis, 1997*). U većini istraživanja došlo se do zaključka da na glatkom ili amorfnom voštanom filmu postoje čestice kristalne strukture. Ipak, kod nekih vrsta primećeno je odsustvo takvih čestica (*Jefree i Sandford, 1982*).

Analiza hemijskog sastava epikutikularnog voska se izvodi nakon njegovog izolovanja. Najčešće korišćena metoda za izolovanje/ekstrakciju voskova je tzv. spiranje sa površine biljnog organa pogodnim rastvaračem (heksan, hloroform ili metilen-hlorid), ili potapanjem materijala u rastvarač. Obzirom na isparljivost voštanih jedinjenja, gasna hromatografija i masena spektrometrija (GC i MS, respektivno) su tehnika koje se najčešće koriste za analizu/identifikaciju konstituenata smeše voska (*Seigler, 1998; Stevens, et al. 1994; Bojović, et al. 2012; Jovanović, et al. 2015*).

### 2.5.3. Epikutikularni vosak kao hemotaksonomski kriterijum

Fina struktura voska predstavlja konstantnu ili relativno nepromenljivu karakteristiku date biljne vrste, pa se stoga može koristiti kao veoma pouzdan parametar u taksonomiji biljaka. Drugim rečima, jedinke iste vrste koje se razvijaju pod uticajem istih sredinskih faktora karakterišu se sličnom morfološkom strukturom i hemijskim sastavom voska. Do odstupanja, odnosno varijabilnosti u morfološkim i hemijskim karakteristikama voska kod biljaka najčešće dolazi usled promene intenziteta različitih ekoloških faktora (klimatski, edafski i orografski faktori<sup>3</sup> (*Jefree, et al. 1976*)). Hemijski sastav epikutikularnog voska može da varira i u zavisnosti od biljne vrste, organa biljke (npr. različiti listovi mogu imati različit sastav voska), ali takođe varira i u zavisnosti od ontogenetske faze u kojoj se nalazi jedinka (*Koch, et al. 2008*).

Među prvim botaničkim istraživanjima, koja su se bavila strukturom epikutikularnog voska, je i de Berijeva studija (*de Bery, 1981*) koja je obuhvatala voskove 60 biljnih vrsta ispitivanih pomoću svetlosnog mikroskopa. Na osnovu dobijenih rezultata on je voskove klasifikovao u 4 kategorije/grupe: ljustasti slojevi, štapičaste strukture, granule i nagomilane

---

<sup>3</sup>Klimatski faktori: svetlost, temperatura, vlaga, vazduh. Edafski faktori – fizičke, hemijske i biološke osobine podloge. Orografske faktori: osobine reljefa, npr. nadmorska visina.

pločice. Kasnije, sa otrčićem SEM metode, kao brže i jednostavnije tehnike, istraživači su dopunili de Berijevu klasifikaciju sa još 19 tipova voštanih struktura kod biljaka (*Barthlott, et al. 1998*). Uzimajući u obzir klasifikaciju koju su predložili *Jefree (2006)*, odnosno *Barthlott i saradnici (1998)*, najčešći morfološki tipovi voskova su: tanak voštani film/sloj ili različite trodimenzionalne strukture. Drugi tip se javlja u vidu krupnih ljuspi, ravnih položenih ili uspravno postavljenih pločica, filamenata, šiljatih struktura ili šupljih cevčica na kutikuli (*Koch, et al. 2008*).

Značaj epikutikularnih voskova ogleda se u praćenju i merenju morfoloških i hemijskih karaktera u okviru date taksonomske kategorije. Obzirom da voštani depoziti mogu varirati u pogledu veličine, oblika i frekvenciji/brojnosti, morfologija epikutikularnog voska predstavlja izvor mnoštva, za taksonomiju korisnih, karaktera. Dodatno, razmatranje karakteristika voska zajedno sa drugim karakteristikama biljaka omogućava razjašnjavanje i razumevanje evolutivnih odnosa između taksona. Na primer, SEM metodom je ispitivan obrazac epikutikularnih voskova 12 gajenih taksona *Sedum* sect. *Gormanina* i hibrida, na populacionom nivou (*Denton, 1994*). Generalno, taksoni su se odlikovali morfološkom sličnošću sa taksonima iz prirodnih populacija. Iako je utvrđen jednoličan obrazac u pogledu tipa voštanih depozita (pločast izgled), utvrđena su i izvesna odstupanja. Veličina pločica nije varirala značajno u okviru populacije istog taksona, ali jeste između različitih taksona. Kod jednog taksona je primećeno da su voštane pločice jedva razvijene, dok su tri diploidna, reliktna taksona diferencirana u odnosu na ostale taksonne iste sekcije zbog većih dimenzija pločica. Kod hibridnih taksona je uočena tendencija da se voštane strukture formiraju po obrascu koji se intermedijaran u odnosu na odgovarajuće roditeljske vrste.

Veliki broj hemotaksonomskih istraživanja je ukazao na značaj metabolita iz epikutikularnog voska u diferenciranju i sistematici taksona na nivou različitih taksonomskih kategorija. Varijabilnost u sastavu i strukturni diverzitet komponenti epikutikularnog voska predstavlja važnu osnovu u taksonomiji biljaka na osnovu koje se može razmatrati grupisanje taksona u okviru različitih taksonomskih kategorija. Moguće je izvršiti diferenciranje taksona, razlikovanje grupa u okviru sekcija, ili čak identifikaciju vrsta, čime se stiče uvid u evolutivne i filogenetske odnose u biljnom svetu (*Stevens, et al. 1994a; Stevens, et al. 1994b; Maffei, 1994; Maffei, 1996a; Maffei, 1996b; Maffei, et al. 2004; Medina, et al. 2006; Bojović, et al. 2012; Jovanović, et al. 2015*).

Iako je veliki broj biljnih vrsta do danas bio predmet fitohemijskih i botaničkih istraživanja, aktuelnost epikutikularnih voskova koji se široko koriste kao specifični karakteri u taksonomiji biljaka, još uvek traje. Fitohemičare i botaničare i dalje intrigira eventualni

nedostatak podataka značajnih za rešavanje taksonomskih problema u sistematici biljka, kao i povezanih morfoloških i biohemijskih promena, koje su u korelaciji sa faktorima sredine, a predstavljaju neizostavni deo evolucije biljnog sveta. U svim pomenutim slučajevima, istraživanje sastava epikutikularnih voskova i njihove distribucije kod biljaka pruža veliki naučni doprinos fitohemiji, hemotaksonomiji i srodnim naučnim disciplinama.

#### 2.5.3.1. Distribucija komponenti epikutikularnog voska i njihov hemotaksonomski značaj

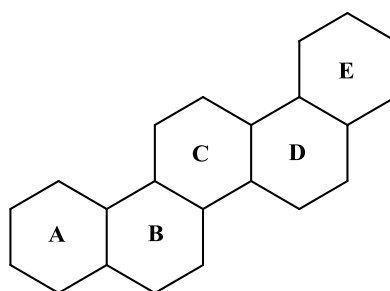
##### 2.5.3.1.1. Alkani kao hemotaksonomski markeri

Alkani doprinose hidrofobnosti epikutikularnog voska. Štiteći biljne organe od gubitka vode isparavanjem, oni predstavljaju primarnu barijeru ka spoljašnjoj sredini. Biljke sintetisu dugolančane alkane češće sa nepranim nego li sa parnim brojem C-atoma, pri čemu je sadržaj jednog ili dva predstavnika dominantan u vosku. Obzirom da ne sadrže funkcionalne grupe, karakteriše ih izuzetna stabilnost, pa ih je moguće detektovati u svežem biljnom materijalu, ali i u fosilnom materijalu, zemljištu, sedimentima i slično. Pored hemijske stabilnosti, *n*-alkani su favorizovani markeri jer se lako izoluju i identifikuju (Marin, 2003; *Bush i McInerney*, 2013). *n*-Alkani (C<sub>21</sub>–C<sub>37</sub>) iz epikutikularnog voska su najčešće korišćeni biomarkeri. Sadržaj alkana u voskovima varira u zavisnosti od doba godine, tj. faze razvića. U toku proleća i ranog leta, u toku sazrevanja, tj. intenzivnog razvoja listova na biljci, količina *n*-alkana je u stalnom porastu; dok je sadržaj ovih uljovodnika relativno konstantan tokom daljeg razvića. Kao i kod većine sekundarnih metabolita, varijabilnost *n*-alkana je uslovljena različitim ekološkim faktorima (*Bush i McInerney*, 2013). Najzad, sadržaj *n*-alkana varira u zavisnosti od biljne vrste, roda, familije, pa se identifikovanje, kvantifikovanje i predstavljanje distribucije *n*-alkana u voskovima vrlo često koristi u hemotaksonomskim studijama. U studijama *Maffei* i saradnika, *n*-alkani iz voskova kod predstavnika familija Asteraceae, Lamiaceae, Boraginaceae, Verbenaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Umbelliferae, Cruciferae, Leguminosae, reda Coniferales, itd. su se pokazali kao dobri markeri na različitim taksionomskim nivoima (*Maffei*, 1994; 1996a; 1996b, *Maffei*, et al. 2004). Na primer, kod četinara *n*-alkani su se pokazali kao dobri markeri na nivou familije i subfamilije (*Maffei*, et al. 2004). *Stevens* i saradnici su, ispitujući epikutikularne voskove odabranih predstavnika roda *Sedum* i subfamilije Sempervivoideae (Crassulaceae), okarakterisali varijabilnost *n*-alkana kao značajnu za sistematiku, jer su se

zajedno sa triterpenima pokazali kao najvarijabilnije komponente epikutikularnog voska (Stevens, et al. 1994a). Generalno, alkani se mogu okarakterisati kao dobri markeri na nižim nivoima klasifikacije, osim u slučajevima njihove velike varijabilnosti u uzorcima (na nivou vrste i nižim nivoima klasifikacije). Kada se taksoni na nivou vrste morfološki teško razlikuju, karakterističan sadržaj pojedinih alkanskih nizova može da bude od koristi u njihovom diferenciranju. Alkani se mogu koristiti kao pouzdani markeri i na višim nivoima klasifikacije, kao što su tribusi, potfamilije i familije (Marin, 2003).

#### 2.5.3.1.2. Triterpeni kao hemotaksonomski markeri

Triterpeni su sekundarni metaboliti aliciklične strukture sa značajnom distribucijom u biljnom svetu. Osnovni skelet čini trideset C-atoma (slika 9), organizovanih u policikličnu strukturu (prsten A, B, C, D i E). Značaj triterpena se ogleda u činjenici da su konstituenti membrana (steroidi kod eukariota i hopani kod prokariota), hormoni (steroidi biljaka i životinja) i da učestvuju u odbrambenim mehanizmima biljke protiv patogena i herbivora (pentaciklični triterpeni kod biljaka). Značajan strukturni diverzitet triterpena je uočen kod viših biljaka zbog različitosti u pogledu osnovnih struktura, mogućnosti eliminacije i adicije bočnih nizova, oksidativne modifikacije, itd. Mogu se podeliti u četiri grupe: pravi triterpeni, steroidi, saponini i kardiotonični glikozidi (Harborne, 1998; Wang, et al. 2010).



**Slika 9.** Osnovna struktura triterpena ( $C_{30}H_{48}$ )

Distribucija triterpena u biljnim tkivima ima višestruk značaj, evolutivni i funkcionalni. Osim njihovog prisustva u epikutikularnim voskovima, izolovani su i iz etarskih ulja, nepolarnih i polarnih ekstrakata i smola (Hernández Vázquez, et al. 2012; Tomaszewski i Zielinski, 2014; Harborne, 1998). Pravi triterpeni, na primer,  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirini kao i derivati kiselina (ursanske i oleanske), su najčešće prisutni kod biljaka u voštanom sloju lišća i plodova i imaju zaštitnu ulogu od insekata i mikroba (Harborne, 1998). Pored navedenih uloga, pojedini derivati triterpena se karakterišu ograničenom distribucijom kod

biljaka zbog čega se smatraju pouzdanim taksonomskim markerima. Pravi triterpeni su detektovani i izolovani iz velikog broja biljnih vrsta. Na primer, kod različitih predstavnika iz familije trava (Gramineae) prisutni su oleani, hopani, lupani, ursani, itd. (Ohmoto i Ikuse, 1970; Pant i Rastogi, 1979; Mallavadhani, et al. 1998). Pentaciklični triterpeni su detektovani i kod predstavnika familije Celastraceae, roda *Ziziphus* (Rhamnaceae), *Salvia* (Lamiaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Diospyros* (Ebenaceae), itd. (Mallavadhani, et al. 1998; da Silva, et al. 2008; Grecco, et al. 2010; Guo, et al. 2011; Lakhal, et al. 2014). Prema istraživanju Lavrieux i saradnika, Asteraceae, Amaranthaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Moraceae, Apocynaceae, Acearaceae, Crassulaceae i Betulaceae su familije koje se karakterišu sadržajem triterpenil-acetata: lupeil-acetat, neolupenil-acetat,  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirenil-acetat, taraksteril-acetat, multiflorenil-acetat i dr. (Lavrieux, et al. 2011). Prisustvo i odsustvo metil etara triterpena (lupeol-metil-etar) u epikutikularnim voskovima predstavnika familije palmi (Arecaceae) ukazalo je na značaj triterpena za njihovu hemotaksonomiju (García, et al. 1995). Pouzdani su i kao karakteri na nižim nivoima klasifikacije; prema sadržaju triterpena izvršeno je diferenciranje vrsta roda *Clusia* (Clusiaceae) na one koje ne sadrže triterpene i one koje ih sadrže u većem ili manjem procentu (Medina, et al. 2006), odnosno varijetete na osnovu distribucije triterpenskih alkohola i kiselina (amirinski skelet) u epikutikularnim voskovima lišća masline (Bianchi, et al. 1992). Prisustvo triterpena utiče i na morfološke karakteristike lista, dajući im specifičan oblik obojenosti površine. Distribucija pentacikličnih triterpena kod serije *Ruspestria* (rod *Sedum*, familija Crassulaceae) je pokazala slaganje sa klasifikacijom izvedenom na osnovu molekularnih i biosistematskih podataka (Stevens, et al. 1994b).

#### 2.5.4. Biosinteza komponenti epikutikularnih voskova

Pored fiziološke funkcije i morfološke građe kutikularnog voska, podjednaku pažnju zaslužuje i njegova biosinteza, jer se prilikom razjašnjavanja i diskutovanja evolutivnih promena filogenetska istraživanja osvrću na biosintetske puteve.

Generalno, biosinteza epikutikularnog voska podrazumeva sledeće korake/etape (Lemieux, 1996):

1. Elongacija masnih kiselina;
2. Redukcija masnih kiselina do aldehida i primarnih alkohola;
3. Dekarboksilacija nastalih aldehida do alkana;
4. Hidroksilacija alkana do sekundarnih alkohola i
5. Oksidacija sekundarnih alkohola do ketona.

##### 2.5.4.1. Biosinteza derivata masnih kiselina (DMK)

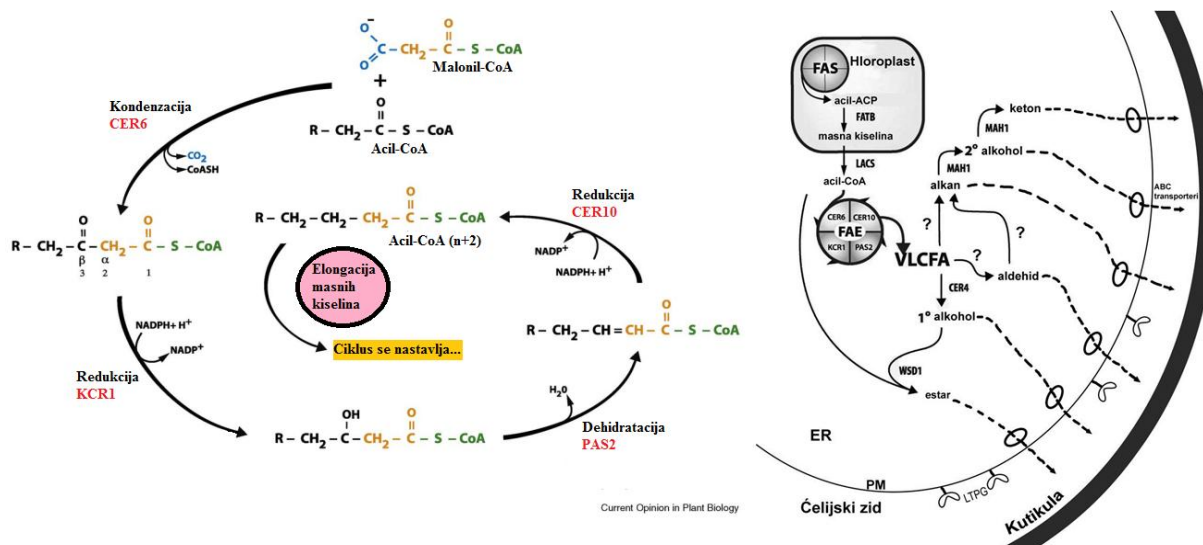
Svi procesi koji se odnose na sintezu komponenti kutikularnog voska se odigravaju u epidermalnim ćelijama. Sinteza podrazumeva mnoštvo složenih biohemijskih mehanizama i transformaciju velikog broja organskih molekula posredstvom multienzimskih kompleksa koji, najuopštenije rečeno, učestvuju u procesima elongacije prekursora masnih kiselina voskova i katalizuju procese nastajanja alifatičnih jedinjenja, tzv. dugolančanih derivata masnih kiselina – DMK (alkani, primarni i sekundarni alkoholi, ketoni, aldehidi, estri, itd.).

U razumevanju biosinteze voskova pomogao je napredak tehnika analize, tj. identifikacije jedinjenja koja ulaze u sastav kutikularnih voskova, gde se pre svega misli na GC-MS tehniku. U nekim genetskim i biohemijskim istraživanjima korišćena je i tehnika sa radioaktivnim markerima (engl. *radiolabeling*).

Mehanizam grupisanja svih lipidnih komponenti ( $C_{16}$  i  $C_{18}$  derivata, glicerola i dugolančanih derivata masnih kiselina) u funkcionalnu kutikulu i dalje nije detaljno objašnjen. Identifikovane su komponente koje učestvuju u elongaciji prekursora masnih kiselina, enzimi koji učestvuju u procesima koji dovode do stvaranja različitih alifatičnih jedinjenja (DMK) i proteini koji učestvuju u transportu voska do površine. Prva faza elongacije je *de novo* sinteza  $C_{16}$  i  $C_{18}$  acil-lanaca. Ona se odigrava u stromi plastida uz učešće enzimskih kompleksa – sintaza masnih kiselina (SMK) I, II i III koji „diktiraju“ dužinu lanca. U toku sinteze acil-lanac je vezan za kofaktor ACP (transportni protein, engl. *acyl carrier protein*). Sinteza protiče kroz četiri faze: kondenzovanje  $C_2$  iz malonil-ACP do

acetyl-CoA, zatim redukcija  $\beta$ -ketoacil-ACP, dehidratacija  $\beta$ -hidroksilacil-ACP i redukcija *trans*- $\Delta^2$ -enoil-ACP. Reakcije su katalizovane  $\beta$ -ketoacil-CoA sintazom,  $\beta$ -ketoacil-CoA reduktazom,  $\beta$ -hidroksil-CoA dehidratazom i enoil-CoA reduktazom. U drugoj fazi se u epidermalnim ćelijama sintetišu DMK prekursori od strane multienzimskih kompleksa elongaza masnih kiselina (EMK) u endoplazmatičnom retikulumu. Slično kao i kod *de novo* elongacije, koristeći  $C_{16}$  i  $C_{18}$  masne kiseline iz plastida i malonil-CoA, enzimski kompleks kroz ponovljene cikluse u kojima se adiraju po dva C-atoma, učestvuje u sintezi zasićenih DMK od 24 do 36 C-atoma. Dakle, u jednom ciklusu dolazi do kondenzacije između malonil-CoA (donor C-atoma) i acil-CoA (CoA-esterifikovana acil grupa iz substrata masne kiseline, tj. akceptor C-atoma), zatim do redukcije  $\beta$ -ketoacil-CoA do  $\beta$ -hidroksilacil-CoA. Njegovom dehidratacijom nastaje *trans*- $\Delta^2$ -enoil-CoA čijom se redukcijom dobija zasićen produkt. Dobijeni produkt jednog ciklusa je acil-CoA (n+2) koji ponovo ulazi u sledeći ciklus za dalju elongaciju. Dugolančani proizvodi dalje učestvuju u sintezi drugih voštanih komponenti. Kod većine biljaka su opisana dva biosintetska puta: acil-redukcija, u kome nastaju primarni alkoholi i estri i dekarboksilacija, u kome nastaju aldehidi, alkani, sekundarni alkoholi i ketoni. Nakon sinteze, odnosno sekrecije, voštane komponente se akumuliraju u ćelijskoj – plazma membrani epidermalne ćelije. Iz ćelijske membrane se pomoću ABC- i LTPG-transportera (grupa proteina), kroz hidrofoban prostor – kutinski matriks, kreću ka površini biljnog organa (slika 10) (*Post-Beittenmiller*, 1996; *Theodoulou*, 2000; *Kunst i Samuels*, 2009).



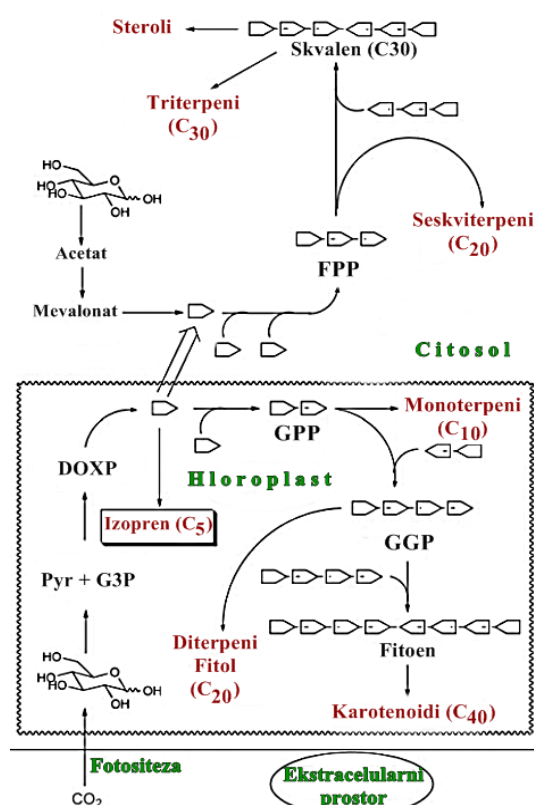


**Slika 10.** Biosinteza voska – postupak elongacije masnih kiselina i transport voštanih komponenti do kutikule (*Kunst i Samuels, 2009*)

**FAS** – Multienzimski kompleks sintaza masnih kiselina, smešten u plastidu, koji generiše najpre dugolančane acil ostatke masnih kiselina ( $C_{16}$ – $C_{18}$ ), potom, preko acil-ACP tioesteraze (**FATB**) i masne kiseline. Masne kiseline, uz učešće **LACS** (acil-CoA sintetaza) se prevode u aktivni CoA tioestar i transportuju iz plastida do endoplazmatičnog retikuluma (**ER**). U ER se dešava proces elongacije uz učešće kompleksa elongaze masnih kiselina (**FAE**=**CER6**+**KCR1**+**PAS2**+**CER10**), tj. produžavanje alifatičnog dela, do nastanka dugolančanih masnih kiselina (**DMK**). Iz **DMK**, učešćem enzima acil-CoA reduktaze masnih kiselina (**CER4**) i sintaze voska (**WSD1**) nastaju primarni alkoholi i estri. Koraci i enzimi koji učestvuju u hemijskim transformacijama **DMK** do alkana nisu razjašnjeni. Sekundarni alkoholi i ketoni nastaju uz učešće srednjelančane alkanske hidroksilaze (**MAH1**). Mehanizam prenosa voštanih komponenti od ER do ćelijske membrane je nepoznat. Komponente se iz ćelije transportuju postupkom koji uključuje ABC- i LTPG-transportere. Multienzimski kompleks (**FAE**): **CER6** ( $\beta$ -ketoacil-CoA sintaza); **KCR1** ( $\beta$ -ketoacil-CoA reduktaza); **PAS2** ( $\beta$ -hidroxiacil-CoA); **CER10** (enoil-CoA reduktaza).

## 2.5.4.2. Biosinteza triterpena

Terpeni su strukturno raznolika klasa jedinjenja koja obuhvata linearna, ciklična i policiklična jedinjenja široko rasprostranjena u biljnom svetu. Biosinteza terpena se kod eukariota odvija na dva načina: preko mevalonske kiseline (MVA-biosintetski put) u citoplazmi (seskvi- i triterpeni) i, alternativno, preko deoksi-ksiloze (DXP-biosintetski put) u plastidima (mono-, di- i tetraterpeni). Kod prokariota se odvija jedan ili oba mehanizma biosinteze. U zavisnosti od broja izoprenskih jedinica  $(C_5H_8)_n$ , postoje sledeće terpenске strukture: hemiterpeni ( $n=1$ ), monoterpeni ( $n=2$ ), seskviterpeni ( $n=3$ ), diterpeni ( $n=4$ ), sesterterpeni ( $n=5$ ), triterpeni ( $n=6$ ), tetraterpeni ( $n=8$ ) i politerpeni (veliki broj  $C_5$  jedinica) (slika 11). Međusobno se razlikuju prema prisustvu funkcionalne grupe i osnovnom skeletu (Dewick, 2002; Kovačević, 2004; Saxena, et al. 2013; Kirby, et al. 2015).

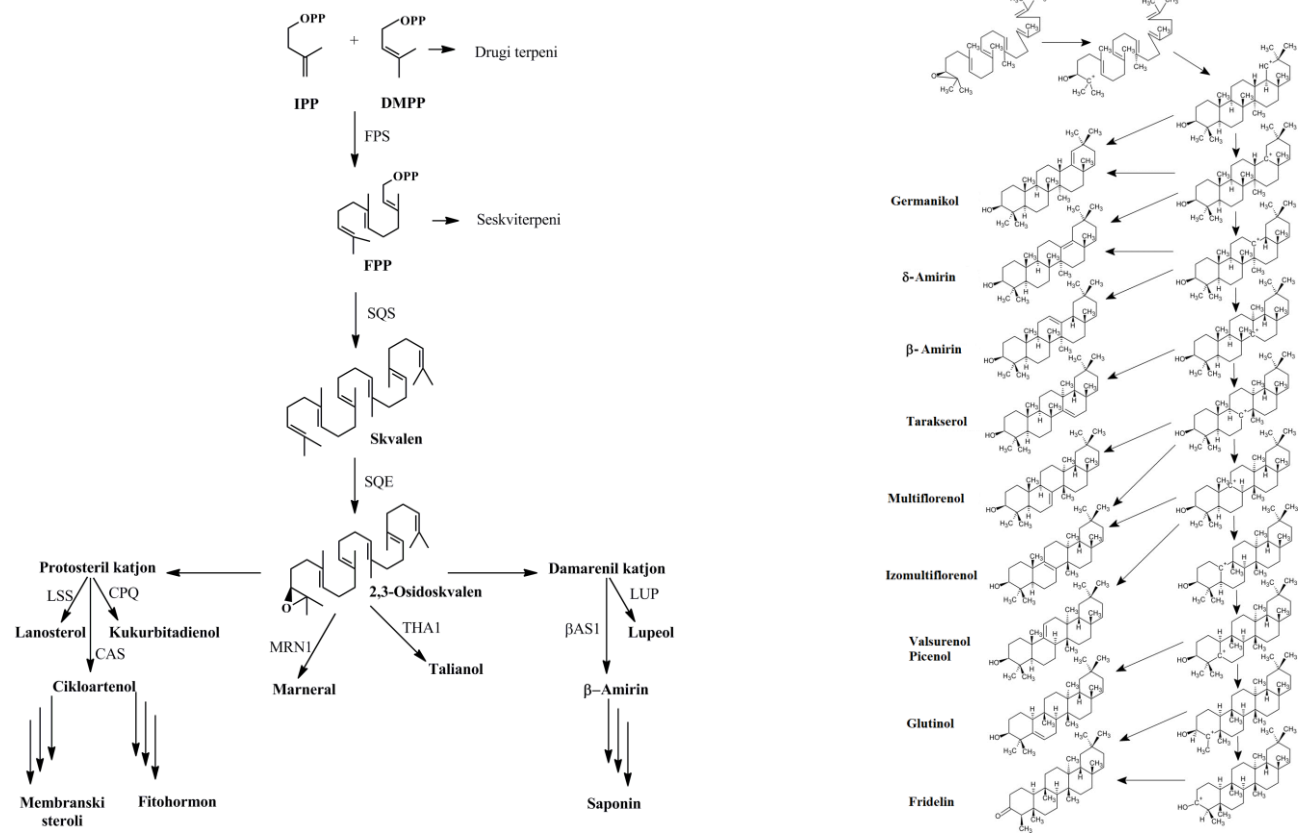


**Slika 11.** Shematski prikaz biosinteze terpena kod viših biljaka (Humphrey i Beale, 2006)

Kvadratici predstavljaju  $C_5$ -izoprenske jedinice (IPP ili DMAPP); Pyr – piruvat; G3P – D-glicerinaldehid 3-fosfat; DOXP – 1-deoksi-D-ksilozo-5-fosfat.

Prema Ružičkom, prilikom biosinteze terpenoidnih struktura najpre nastaju prekursori koji se u različitim biohemijskim procesima hemijski menjaju, tj. usložnjavaju (ciklizacija, uvođenje različitih funkcionalnih grupa i reorganizacija molekula). Iz aktivirane mevalonske kiseline nastaje izopentil-pirofosfat (IPP) i njegov tautomer dimetilalil-pirofosfat (DMAPP). IPP se adira na DMAPP „glava-rep“ vezivanjem pri čemu nastaju fosforilovani alkoholi, prekursori monoterpena (GPP, geranil-pirofosfat), seskviterpena (FPP, farnezil-pirofosfat), diterpena (GGP, geranilgeranil-pirofosfat) i sesterterpena (geranilfarnezil-pirofosfat). Odstupanje od Ružičkinog pravila se javlja kod formiranja tri- i tetraterpenskog skeleta. Biosinteza triterpena i sterola se odigrava preko skvalena (dve FPP jedinice,  $2 \times C_{15}$ ) kao prekursora, a tetraterpena preko fitoena (dve GGPP jedinice,  $2 \times C_{20}$ ) (Kuzuyama, 2002; Kovačević, 2004).

I biosinteza triterpena podrazumeva učešće specifičnih enzima ili enzimskih kompleksa. Slika 11 shematski prikazuje biosintetski put triterpena kod biljaka. Naime, na početku sinteze farnezil difosfat sintaza (FPS) izomerizuje IPP i DMAPP do farnezil difosfata (FPP) koji skvalen sintaza konvertuje u skvalen. Skvalen epoksidaza (SQE) oksiduje skvalen do 2,3-oksidoskvalena. Enzimski kompleks OSC, ciklizuje 2,3-oksidoskvalen, preko intermedijernih katjona (protosteril katjon, damarenil katjon i dr.) i u zavisnosti od učešća datog enzima, do triterpenskih alkohola i aldehida, ili sterola, steroida, saponina i drugih srodnih jedinjenja (Phillips, et al. 2006; Niu, et al. 2014). Ciklizacija oksidoskvalena, koja se dešavanja pod uticajem OSC enzima, vodi do formiranja policikličnih struktura ( $C_{30}H_{50}O$ ) posredstvom sekvence premeštanja karbkatjona iz prstena E u prsten A preko odgovarajućih tercijarnih katjona (slika 12) (Wang, et al. 2010).



**Slika 12.** Pojednostavljena shema biosinteze triterpena kod biljaka i sekvence premeštanja karbkatjona (*Phillips, et al. 2006; Wang, et al. 2010*)

Farnezil-difosfat sintaza (**FSP**) izomerizuje izopentil-difosfat (**IPP**) i dimetilalil-difosfat (**DMAPP**) do farnezil-difosfata (**FPP**), kojeg skvalen sintaza (**SQS**) konvertuje u skvalen. Skvalen epoksidaza (**SQE**) oksiduje skvalen do 2,3-oksidoskvalena koga OSC enzimi ciklizuju preko katjonskih intermedijera (navedena su dva – protosteril katjon i damarenil katjon) do triterpenskih alkohola ili aldehida.

**OSC** enzimi koji su prikazani na shemi: **LSS** (lanosterol sintaza); **CAS** (cikloartenol sintaza); **CPQ** (kukurbitadienol sintaza); **βAS1** (β-amirin sintaza); **LUP** (lupeol sintaza); **MRN1** (marneral sintaza); **THA1** (talianol sintaza).

## 2.6. Fenolna jedinjenja

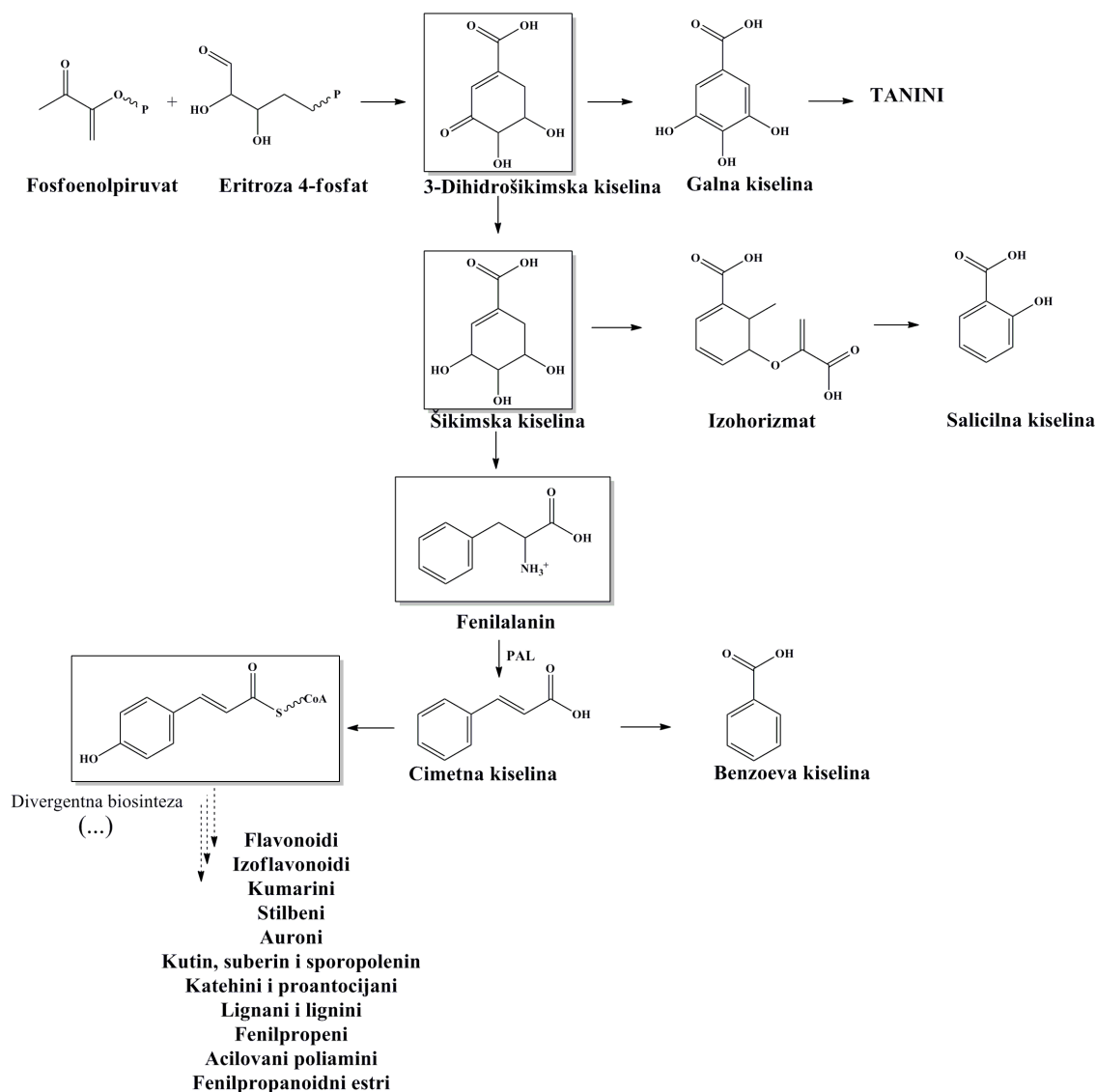
### 2.6.1. Biosinteza, poreklo i značaj fenolnih jedinjenja

Fenilpropanoidi, sekundarni metaboliti različitih struktura i svojstava, predstavljaju neku vrstu indikatora staništa, jer je njihova produkcija stimulisana u stanjima biotičkog i abiotičkog stresa (varijacija faktora staništa), ili usled napada patogena. Strukturni diverzitet fenilpropanoida se vezuje za modifikaciju i amplifikaciju (uz aktivnost specifičnih enzima) ključnih intermedijernih struktura iz ciklusa šikimske kiseline.

Fenilpropanoidni biosintetski put ili put šikimske kiseline se odigrava u ćelijskom plastidu i započinje kondenzacijom molekula fosfoenolpiruvata i eritroza-4-fosfata do nastajanja intermedijera od šest ugljenikovih atoma koji se naknadnim reakcijama konvertuje u šikimsku kiselinu. U ovoj biosintezi, preko intermedijera ciklusa šikimske kiseline, nastaje mnoštvo sekundarnih metabolita (slika 13). Kaskadnim umnožavanjem, iz hidroksicimetne kiseline i estara, a uz aktivnost reduktaza, oksidaza i transferaza, formira se specifičan profil metabolita koji biva karakterističan za dati biljni organ i fazu razvića svake biljne vrste (hemijski fenotipovi). Fenilpropanoidni put nije ograničen samo na biosintezu lignina i flavonoida, već i drugih aromatičnih struktura, kao što su kumarini, isparljivi fenoli i tanini.

Pored puta šikimske kiseline, koji se smatra najznačajnijim za sintezu fenolnih jedinjenja kod biljaka, opisana su još dva: acetatno-malonatni (glavni produkti ovog biosintetskog puta jesu masne kiseline, ali se mogu sintetisati i aromatični molekuli preko poliketida) i acetatno-mevalonatni biosintetski put. Dok acetatno-malonatni put započinje kondenzacijom (glava-rep) acetatnih jedinica i uključuje acetyl-CoA i malonil-CoA kao intermedijere, u acetatno-mevalonatnom putu kondenzacijom acetyl-CoA jedinica se formira mevalonska kiselina, koja se dalje konvertuje u ciklične terpene ili steroide.

Sinteza fenolnih sekundarnih metabolita sa dva ili više aromatičnih prstenova često podrazumeva interakcije preko više od jednog biosintetskog puta. Tako, na primer, izoflavonoidi nastaju uz doprinos šikimskog i acetat-malonatnog puta (Vickery i Vickery, 1981; Vogt, 2010; Mehrotra i Aggarwal, 2003).



**Slika 13.** Fenilpropanoidni biosintetski put ili put šikimske kiseline (Vogt, 2010)

Nakon Kalvinovog ciklusa, fosfoenolpiruvat nastaje glikolizom, a eritroza-4-fosfata potiče iz petoza-fosfatnog biosintetskog puta. Redukcija 3-dihidrošikimske kiseline se odigrava uz učešće NADPH. PAL (fenilalanin-amonijum liaza) katalizuje reakciju nastajanja cimetne kiseline iz aminokiseline fenilalanina (Mehrotra i Aggarwal, 2003).

Fenolna jedinjenja se u literaturi vrlo često opisuju kao opšteprisutna u biljnom svetu (Balasundram, et al. 2006). Zahvaljujući modifikacijama i umnožavanju osnovnih (centralnih) struktura u ciklusu šikimske kiseline, kompleksnost se ogleda u broju i strukturalnoj raznolikosti jedinjenja fenolnog tipa (od jednostavnih fenolnih kiselina do polimernih struktura, tabela 4) (Vogt, 2010). Karakteriše ih jedan ili više aromatičnih prstenova sa jednom ili više fenolnih grupa. Jedinjenja se drugačije nazivaju i polifenoli. Uglavnom egzistiraju u biljnom tkivu kao konjugati mono- ili polisaharida, koji se vezuju za osnovnu strukturu preko jedne ili više fenolnih grupa, ili kao estri.

**Tabela 4.** Osnovna kategorizacija klasa fenolnih jedinjenja kod biljaka (*Balasundram, et al. 2006*).

Klasa jedinjenja	Struktura
Jednostavni fenoli, benzohinoni	C <sub>6</sub>
Hidroksibenzoeve kiseline	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Acetofenoni, Fenilacetatne kiseline	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>
Hidroksicimetne kiseline, fenilpropanoidi (kumarini, izokumarini, hromoni, hromeni)	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>
Naftohinoni	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>
Ksantoni	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>
Stilbeni, antrahinoni	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>
Flavonoidi, izoflavonoidi	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>
Lignani, neolignani	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Bioflavonoidi	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Lignini	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Kondenzovani tanini	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

Fenolne kiseline se javljaju kao derivati hidroksicimetne kiseline, aromatična C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> jedinjenja sa tri C atoma u bočnom nizu (kafena, ferulična, *p*-kumarna kiselina i dr.), i/ili derivati benzoeve kiseline, aromatična C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> jedinjenja sa jednim C-atomom u bočnom nizu (galna, vanilinska, *p*-hidroksibenzoeva kiselina i dr.).

Početak prošlog veka (1930) se smatralo da bi novoizolovanu supstancu iz pomorandže trebalo uvrstiti u klasu vitamina i nazvati je vitamin P. Kasnije, izolovana supstanca je svrstana u klasu flavonoida (rutin). Do danas je identifikovano i do nekoliko hiljada flavonoidnih struktura. Flavonoidi (*flavus*, lat. žut) predstavljaju najbrojniju grupu fenolnih jedinjenja i najznačajnije pigmente kod biljaka (*Kumar i Pandey, 2013*). Flavonoidi su molekuli male mase, čiji osnovni skelet (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) čini 15 ugljenikovih atoma; dva aromatična prstena (A i B) povezana (sa tri ugljenikova atoma) tako da grade heterociklični prsten C. Prsten A nastaje u acetatno-malonatnom biosintetskom putu, a prsten B iz fenilalanina (put šikimske kiseline). Zavisno od supstitucija prstena C, flavonoidna jedinjenja se dele u klase: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli (katehini), izoflavoni, flavanonoli i antocijani.

Tanini predstavljaju treću grupu biljnih polifenola, molekule relativno velike molekulske mase, koji u biljnom svetu mogu postojati kao hidrosolubilni tanini (poliestri galne kiseline njenih derivata i šećera), kondenzovani tanini (nastaju kondenzacijom flavanskih struktura) i florotanini (nastaju polimerizacijom floroglucinola). Pored navedenih, mogu se javiti i mešoviti i pseudotanini (*Kovačević, 2004; Balasundram, et al. 2006*).

Strukturna raznolikost, tj. hemijska priroda polifenola zavisi od klase, stepena hidroksilacije i supstitucije, konjugacije i polimerizacije, stereohemije tri hiralna centra i interflavanske veze, glikolizacije (veza između aglikona i šećerne komponente), metilovanja

(*O*-metilovanje) i esterifikacije galoil ostataka (Dai i Mumper, 2010). Javljaju se kao aglikoni, heterozidi, estri i metilovani derivati (Kumar i Pandey, 2013).

Poznat je višestruki značaj fenola za samu biljku. Osim što imaju ulogu pigmenata i signalizirajućih komponenti, fenoli je štite od štetnog UV-zračenja, patogena, insekata i predatora, kao i od stanja abiotičkog i biotičkog stresa (Kovačević, 2004; Dai i Mumper, 2010). Rezultati velikog broja istraživanja pokazuju da su fenolna jedinjenja zastupljena u ljudskoj ishrani koja uključuje konzumiranje voća, povrća i lekovitog bilja, kao i namirnica koje iste koriste kao sirovine (začini, čajevi, čokolade sa većim ili manjem udelom kakaa, pivo, itd.). Pored tradicionalnog stava o hranljivosti i lekovitosti biljnih sirovina, evaluacijom velikog broja bioloških testiranja dokazano je pozitivno dejstvo fenolnih sekundarnih metabolita. Najveći broj istraživanja prikazuje fenolna jedinjenja kao antioksidanse koji imaju sposobnost helacije metalnih jona i „hvatanja“ reaktivnih slobodnoradikalnih vrsta koje dovode do oštećenja DNK, proteina i lipida izazivajući stanje oksidativnog/nitrozativnog stresa – medijator inflamacije, proliferacije i odumiranja ćelija (Dedon i Tannenbaum, 2004; Roberts, et al. 2010; Veljković, et al. 2013, Brčanović, et al. 2013; Kumar i Pandey, 2013; Mitić, et al. 2014; Stojanović, et al. 2014). Takođe je dokazana i sposobnost fenolnih jedinjenja da inhibiraju akumulaciju lipida u jetri, da deluju antikancerogeno, antiproliferativno, antiinflamatorno, antiholinesterazno, antimikrobno, kardioprotektivno, vazodilatatorno, itd. (Balasundram, et al. 2006, Dai i Mumper, 2010; Morikawa, et al. 2012; Bai, et al. 2014; Hoang, et al. 2015; Catchpole, et al. 2015; Sevindik, et al. 2015).

### **2.6.2. Izolovanje i karakterizacija fenolnih jedinjenja**

Fenoli se mogu ekstrahovati iz svežeg, osušenog ili smrznog materijala/uzorka. Najčešći vid ekstrakcije je rastvaračima, procedura koja se može modifikovati radi većeg prinosa odabirom rastvarača različite polarnosti, variranjem temperature ili odnosa rastvarača i uzorka, dodavanjem slabih organskih ili razblaženih mineralnih kiselina i slično. Rastvarač za ekstrakciju se bira u odnosu na karakteristike i polarnost fenolnih jedinjenja i njihovih derivata koji se ekstrahuju iz materijala. Na primer, nepolarniji aglikoni i metilovani flavoni i flavonoli se obično ekstrahuju nepolarnijim rastvaračima (etil-acetat, etar, hloroform, metilen-hlorid), dok se polarniji aglikoni (veći stepen hidroksilacije) i heterozidi najčešće ekstrahuju jako polarnim rastvaračima, kao što su: etanol, metanol, aceton i njihove smeše. Maceracija, sokslet-ekstrakcija, ultrazvučna i superkritična ekstrakcija su neke od mnogobrojnih tehnika ekstrakcije.



Dobijeni ekstrakt je neretko složena smeša fenolnih jedinjenja ali i nefenolnih komponenti (šećeri, organske kiseline, lipidi i proteini). Kako bi se uprostila ekstrahovana smeša i povećala koncentracija fenolnih komponenti, pribegava se frakcionisanju smeše. U zavisnosti od polarnosti i kiselosti željenih i neželjenih metabolita, frakcionisanje se najčešće izvodi tečno-tečno (uklanjanje nepolarnih, lipidnih komponenti) ili SPE (*solid phase*) ekstrahovanjem (uklanjanje organskih kiselina i šećera). Preparativne metode, kolonska hromatografija (klasična ili preparativna HPLC tehnika) i preparativa TLC tehnika, omogućavaju izolovanje „čistih“ komponenti iz smeše ili pak bolje frakcionisanje smeše: dobijene frakcije su koncentrovane u pogledu sadržaja ciljnih metabolita (fenola), čime se olakšava dalje izolovanje i identifikacija. Najčešće korišćeni adsorbenti su silika gel, poliamid, sefadeks i celuloza.

Analiza i kvantifikacija fenolnih jedinjenja se najčešće izvodi spektrofotometrijski i kolorimetrijski. Međutim, složenost fenola u pogledu strukture i reaktivnosti prema reagensima koji se koriste u datoj metodi, kao i zbog različitosti raspoloživih procedura, dobijeni rezultati su često neuporedivi. Gasna hromatografija je takođe često korišćena tehnika za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja. Nedostatak tehnike se odnosi na pripremu neisparljivih fenolnih jedinjenja, tj. prevođenje istih u svoje isparljivije derivate, metilovanjem ili sililovanjem. HPLC tehnika se najčešće primenjuje za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja. Najpouzdaniji vid karakterizacije izolovanih fenolnih jedinjenja se vrši metodama spektralne analize (NMR, IR, UV, MS) (*Robards, 2003; Kovačević, 2004; Dai i Mumper, 2010; Saltan Çitoğlu i Bahadır Acıkara, 2012*).

### 2.6.3. Fenolna jedinjenja kao hemotaksonomski markeri

Distribucija fenolnih jedinjenja je ispitivana u okviru brojnih hemotaksonomskih studija (*Wilkins i Bohm, 1976; Pedersen, 1982; Julkunen-Tiitto, 1986; Okuda, et al. 1992; Stevens, et al. 1995; Mallavadhani, et al. 1998; Petrović, et al. 1999; Zgórka i Głowniak, 2001; Švehliková, et al. 2002; Ieri, et al. 2011*). Mnoge studije, zahvaljujući dobijenim fenolnim profilima biljaka, sugerisale su reorganizaciju taksona u okviru date taksonomske kategorije, ali i ukazala na korelaciju fenolnih jedinjenja sa drugim tipovima taksonomskih makera.

Imajući u vidu strukturni diverzitet i značajnu varijabilnost pomenute klase sekundarnih metabolita (manje stabilni od produkta primarnog metabolizma), neophodno je da se u hemotaksonomska istraživanja uključuje standardizovan biljni materijal, gde se pre svega misli na uniformnost u pogledu uslova u kojima je biljka rasla (podjednak uticaj faktora sredine) i faze razvića u trenutku uzorkovanja materijala. Ponekad se dešava da fenolni karakteri variraju čak i u okviru jedne populacije, kada se izdvajaju posebne hemijske rase koje se morfološki teško razlikuju. U hemotaksonomskoj studiji trava (Gramineae), na obrascu, baziranom na fenolim kiselinama koje ne ulaze u sastav ćelijskog zida, tzv. nestrukturne komponente, demonstrirana je pozdanost datih sekundarnih metabolita na nižim nivoima klasifikacije. Iako su kao klasa vrlo prisutni u biljnom svetu, njihova vrednost se ogleda u postojanju derivata koji su specifični za određeni takson (*Singh i Jain, 1981; Marin, 2003; Mika, et al. 2005*). Kod familije Crassulaceae, na osnovu varijabilnosti aglikonskih komponenti, rod *Sedum* se jasno izdvojio u odnosu na rod *Sempervivum*. Varijabilnost kod vrsta roda *Sempervivum* je minimalna u odnosu na vrste roda *Sedum* koji se karakteriše priličnim hemijskim diverzitetom, gde se pre svega misli na metilovane i hidrosilovane derivata flavonola (*Stevens, et al. 1996*). Kod familije Lamiaceae razmatrano je prisustvo fenolnih markera na različitim nivoima klasifikacije, pri čemu je ukazano je na slaganje rezultata sa postojećim sistemima klasifikacije (*Pedersen, 2000*).

Flavonoidi se smatraju taksonomski najznačajnim fenolima iz više razloga. Oni su hemijski stabilni, mogu se izolovati iz herbarskog materijala, karakteriše ih visok strukturni diverzitet, opšteprisutni su kod biljaka pri čemu svaka vrsta sadrži bar nekoliko flavonoida i na kraju, relativno lako se mogu identifikovati. U sistematici biljaka su intenzivno istraživani na nižim i na višim nivoima klasifikacije. Pouzdanost flavonoida kao hemotaksonomskih markera je najveća na nivou roda, međutim njihov značaj je smanjen na nivoima višim od

familije. Na primer, plava ili crvena boja cvetova ukazuje na prisustvo posebne klase flavonoida – antocijanidina. Antocijanini, heterozidi antocijanidina, su okarakterisani kao pouzdani markeri kako na nižem tako i na višem nivou klasifikacije. Bilo kao aglikoni ili heterozidi, ovi pigmenti su rasprostranjeni kod cvetnica, ali su odsutni kod nekih familija dikotiledona, gde su umesto njih detektovani pigmenti drugačije strukture, posebna klasa koja ne pripada flavonoidima- betacijanini (Stace, 2010; Marin, 2003).

## 2.7. Familija Crassulaceae

### 2.7.1. Karakteristike, rasprostranjenost i praktični značaj predstavnika familije

Familija Crassulaceae (red Saxifragales) je familija bobovnika, sukulenata, srednje veličine, koja broji između 1300 i 1500 biljnih vrsta (oko 35 rodova), široko rasprostranjenih, najčešće u umerenim i subtropskim delovima severne hemisfere (Mort, et al. 2001; Mort, et al. 2005).

U filogenetskom smislu, familija Crassulaceae spada u red relativno primitivnih familija, čiji su predstavnici zadržali visok stepen sličnosti vegetativnih i generativnih karaktera (van Ham i 't Hart, 1998). To su uglavnom jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke. Ređe se javljaju predstavnici s formom žbuna, nisko drveće ili epifitski oblici. Stabljike su obično debele, sočne, zaobljene na poprečnom preseku. Listovi su celi, bez zalistaka, naizmenični ili naspramni, izrazito sukulentni, na preseku ravni do okruglasti, obično na obodu celi. Cvetovi su pravilne simetrije, u pogledu morfološke građe potpuni, većinom hermafroditni, retko dvopolni, u cimoznim, ređe klasastim ili grozdastim cvastima, najčešće pentamerni. Plod mešak ili čaura, sa mnogo semena (Thiede i Eggli, 2007; Kunjin i Ohba, 2001; Gajić, 1972). Epidermis lista se najčešće sastoji iz jednog, a u nekim slučajevima i od dva ili tri sloja; kutikula je obično glatka ili sa finim, pravilim urezima (*Aichryson*), ili je naborana (*Aeonium*). Zbog visoke varijabilnosti citoloških i karioloških, a pre svega morfo-anatomskih karaktera, familija Crassulaceae spada u red taksonomski najkompleksnijih familija skrivenosemenica. Mnoge vrste lako hibridizuju, kako u prirodi tako i hortikulturi, što je i potvrđeno pojavom brojnih hibridnih taksona (Carrillo-Reyes, et al. 2009).

Familija Crassulaceae se odlikuje skoro kosmopolitskim rasprostranjenjem, pri čemu se naročito veliki broj predstavnika sreće u severnoj hemisferi i Severnoj Africi. Sadrži oko 1400 vrsta i 32 roda (Thiede i Eggli, 2007). Kao centri distribucije familije Crassulaceae izdvajaju se Meksiko (325 vrsta) i Južna Afrika (250 vrsta); pored njih, brojne vrste su rasprostranjene i u Severnoj Americi (300 vrsta), Aziji (oko 200 vrsta) i Evropi. Raznovrsnost familije Crassulaceae u Evropi posebno se odnosi na njene južne i jugoistočne delove. Šire područje Mediterana (obuhvatajući Severnu Afriku i Malu Aziju) predstavljeno je kao jedan od centara taksonomskog diverziteta pomenute familije na svetskom nivou

(tabela 5). Pritom, u mediteranskom regionu se javlja oko 177, dok je u Makroneziji zabeleženo više od 200 vrsta. Većina vrsta se sreće na izrazito suvim, osunčanim i toplim staništima kao što su stene, kamenjari i otvorene peskovite površine, ali se brojni predstavnici javljaju u planinskim, umereno sušnim do vlažnim područjima, na većim nadmorskim visinama. ('t Hart, 1997; van Ham i 't Hart, 1998; Thiede i Egli, 2007; Mort, et al. 2001).

Specifičan niz metaboličkih puteva koji karakteriše većinu sukulentnih biljka, CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), omogućavaju predstavnicima familije Crassulaceae da žive na veoma negostoljubivim staništima (*Cushman*, 2001; *Reinert i Blankenship*, 2010; *Iglesias*, et al. 1987), kao što su termofilni kamenjari i stene, vertikalne litice, pustinjska staništa, ali i hladna staništa planinskih vrhova sa čestim mrazovima (*Gontcharovaa i Gontcharov*, 2009; *Byalt*, 2011). Uz optimizaciju uslova, neke vrste se mogu gajiti u kulturi, na kamenitoj ili peskovitoj podlozi, kao i na netravnatim površinama.

**Tabela 5.** Taksonomski diverzitet familije Crassulaceae u mediteranskom području ('t Hart, 1997).

Subfamilija	Rodovi	Broj vrsta
Crassuloideae	<i>Crassula</i> L.	3
Kalanchoideae	<i>Kalanchoe</i> Adan.	1
	<i>Mucizonia</i> (DC.) Batt. & Trabut	2
Cotyledonoideae	<i>Pistorinia</i> DC.	4
	<i>Umbilicus</i> DC.	12
	<i>Aeonium</i> Webb & Berth.	1
Sempervivoideae	<i>Jovibarba</i> (DC.) Opiz	4
	<i>Sempervivum</i> L.	33
	<i>Rhodiola</i> L.	1
	<i>Rosularia</i> (DC.) Stapf	18
Sedoideae	<i>Sedum</i> L.	97
	<i>Telmisa</i> Fenzl	1
	Ukupno	12

Različite vrste rodova *Echeveria*, *Sempervivum* i *Sedum* su naročito vrednovane sa hortikulturnog aspekta (*Mort*, et al. 2005). Pored brojnih dekorativnih svojstva, sukulente iz familije Crassulaceae se gaje i zbog njihove sposobnosti da vezuju teške metale i isparljive zagađivače (*Williams*, et al. 2010; *Ya*, et al. 2013; *Soreanu*, et al. 2013). Takođe je poznata upotreba većeg broja predstavnika ove familije u tradicionalnoj medicini i donekle u ishrani, zbog čega su njeni predstavnici danas u fokusu brojnih fitohemijskih istraživanja, odnosno ispitivanja različitih bioloških aktivnosti (*Chianga*, et al. 2015; *Bopda*, et al. 2014; *Chiang*, et al. 2014; *Senthilkumar*, et al. 2014; *Mekonnen*, et al. 2013)

### 2.7.2. Sistematska pripadnost i taksonomska struktura porodice Crassulaceae

Familija Crassulaceae, u skladu sa tradicionalnom podelom vaskularnih biljaka (Cormophyta), pripada grupi cvetnica (Magnoliophyta), odnosno klasi dikotila (Magnoliopsida) i redu Saxifragales, pri čemu je najčešće opisivana kao morfološki raznolika i kompleksna grupa. Familija je takođe smatrana monofiletskom i tradicionalno je, u skladu sa morfologijom cveta i embriološkim karakteristikama, tretirana kao primitivniji predstavnik dikotila iz potklase Rosidae, koji je blizak grupi porodice koju čine Saxifragaceae, Haloragaceae i Penthoraceae (Denton, 1982; van Ham i 't Hart, 1998). Sadrži 41 rod i od 1550 do 1600 različitih vrsta, dok se kao centar rasprostranjenja porodice navodi područje Južne Afrike (Tahtajan, 2009).

U odnosu na nekoliko različitih sistema klasifikacije, koji su se paralelno razvijali, taksonomska struktura porodice Crassulaceae se danas i dalje smatra kompleksnom, odlikujući se većim brojem nerešenih problema i nerasvetljenih taksonomskih odnosa. Tradicionalna podela na šest potporodica predložena od strane Bergera (1930), je najvećim delom bila zasnovana na veštačkim principima, dok revidiran sistem klasifikacije, baziran na molekularnim i morfološkim podacima, predložen od strane 't Harta prepoznaje samo dve potporodice, Crassuloideae i Sedoideae (slika 14).

Kao jedan od prvih modela, Bergerova klasifikacija (1930) deli porodicu Crassulaceae na šest potporodica (slika 14), koje su grupisane u dve glavne filogenetske linije. Prva linija, Crassula, obuhvata potporodice Crassuloideae, Kalanchoideae i Cotyledonoideae, dok druga linija, Sedum koja se odnosi na potporodice Sempervivoideae, Sedoideae i Echeveroideae. Glavni nedostatak navedenog sistema klasifikacije ogleda se u lošem izboru karaktera za razlikovanje rodova koje je u okviru pojedinih subporodica bilo teško definisati i klasifikovati. Većina pomenutih subporodica je u morfološkom, ali i geografskom smislu jasno definisana. Međutim, subporodica Sedoideae, obuhvatajući *Sedum* kao tipski rod, okarakterisana je kao taksonomski nedovoljno jasna i morfološki izuzetno varijabilna (Mort, et al. 2001; Mort, et al. 2005).

Klasifikacija porodice se dalje kretala u pravcu redukcije broja izdvojenih subporodica. Na primer, Thorne (1983) je predložio da se broj smanji na svega tri subporodice: Crassuloideae, Cotyledonoideae i Sedoideae. Savremeni sistemi klasifikacije porodice Crassulaceae su postali u znatnoj meri „prirodniji“, jer se baziraju na većem broju biosistematskih karaktera (morfološki, filogenetski, embriološki, fitohemijski, i dr.), čime se

stiče bolji uvid u filogeniju i pruža razumno objašnjenje za više taksonomske nivoe. Prema nešto novijim shvatanjima, familiju čine dve subfamilije: Sedoideae i Crassuloideae, pri čemu je u okviru subfamilije Sedoideae izdvojen veći broj tribusa i subtribusa ('t Hart, 1995). Naknadnim istraživanjem subtribusa Sedinae (van Ham, 1995) izdvojene su filogenetske klade: *Sempervivum*, *Aeonium*, *Leucosedum* i *Acre*, dok *Mayuzumi* i *Ohba* (2004) naglašavaju individualnost rodova *Hylotelephium*, *Rhodiola*, *Phedimus* i *Umbilicus* u okviru subtribusa Telephiinae (slika 14).

*Thorne* i *Reveal* (2007) su na osnovu molekularnih dokaza prepoznali samo dve subfamilije: Crassuloideae i Sempervivoideae, dok su *Thiede* and *Eggl* (2007) predložili priznavanje i treće subfamilije, Kalanchoideae (slika 15), čime je promenjena organizacija subfamilije Sempervivoideae (*Carrillo-Reyes*, et al. 2009). Većina savremenih studija ipak prepoznaje postojanje tri potfamilije (*Thiede* i *Eggl*, 2007; *Tahtajan*, 2009; *Gontcharova* i *Gontcharov*, 2009), koje se odlikuju specifičnim karakteristikama:

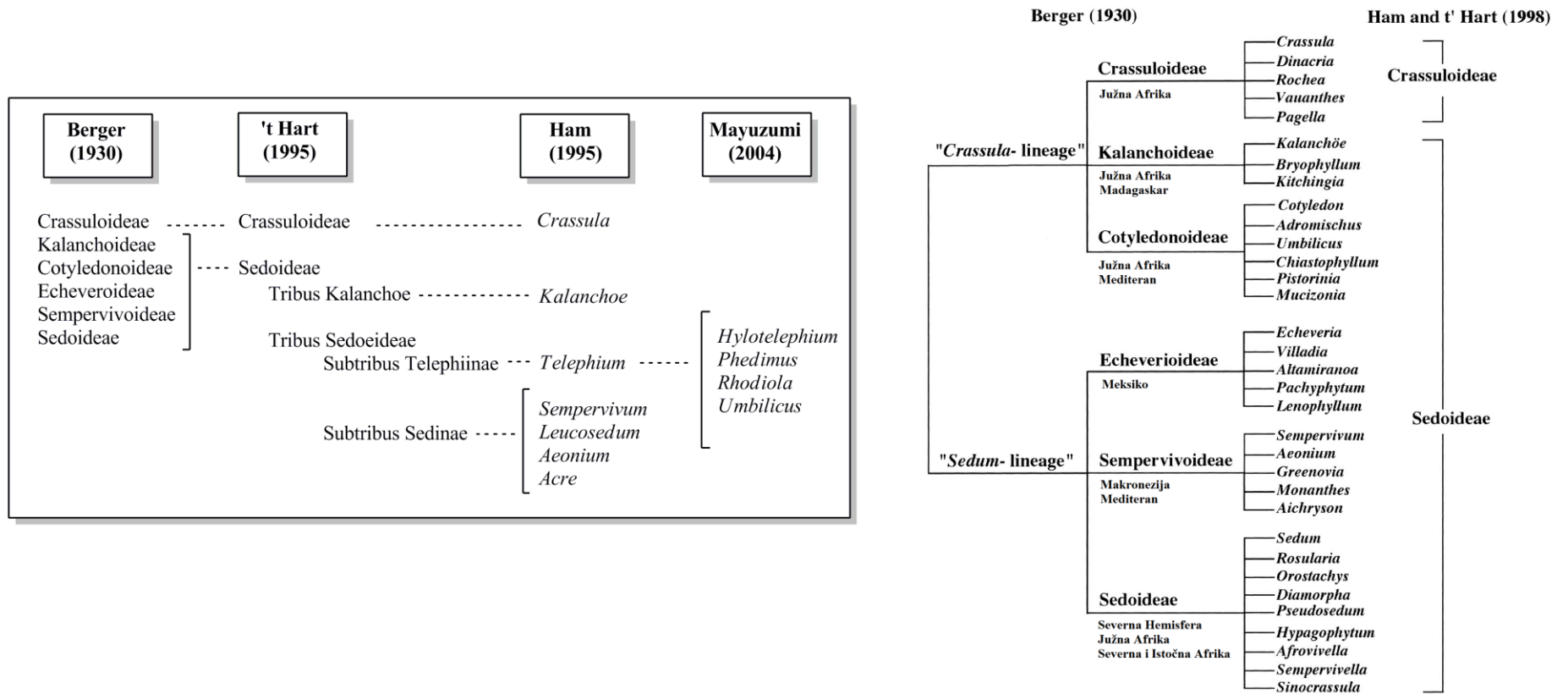
1) Crassuloideae: Latice slobodne ili u bazi srasle, ponekad formiraju dugačku kruničnu cev ili zvonastu krunicu sa režnjevima; Andreceum haplosteman (prisutan jedan jedn krug prašnika); Semenjača valovito naborana ili sa pojedinačnim papilama. Glavni rodovi: *Crassula* (uključujući *Tillaea*, *Rochea*, *Dinacria*, *Pagella*) i *Hypagophytum*.

2) Kalanchoideae: Cvetovi pentamerni do tetramerni, formiraju u manjoj ili većoj meri, izraženu kruničnu cev ili zvonastu krunicu; Andreceum obdiplosteman (prašnici unutrašnjeg kruga srasli sa kruničnim listićima, spoljni prašnici postavljeni nasuprot kruničnih listića); semenjača rebrasta, sa malim brojem rebara; Glavni rodovi: *Adromischus*, *Kalanchoe* (uključujući *Bryophyllum*), *Cotyledon* i *Tylecodon*.

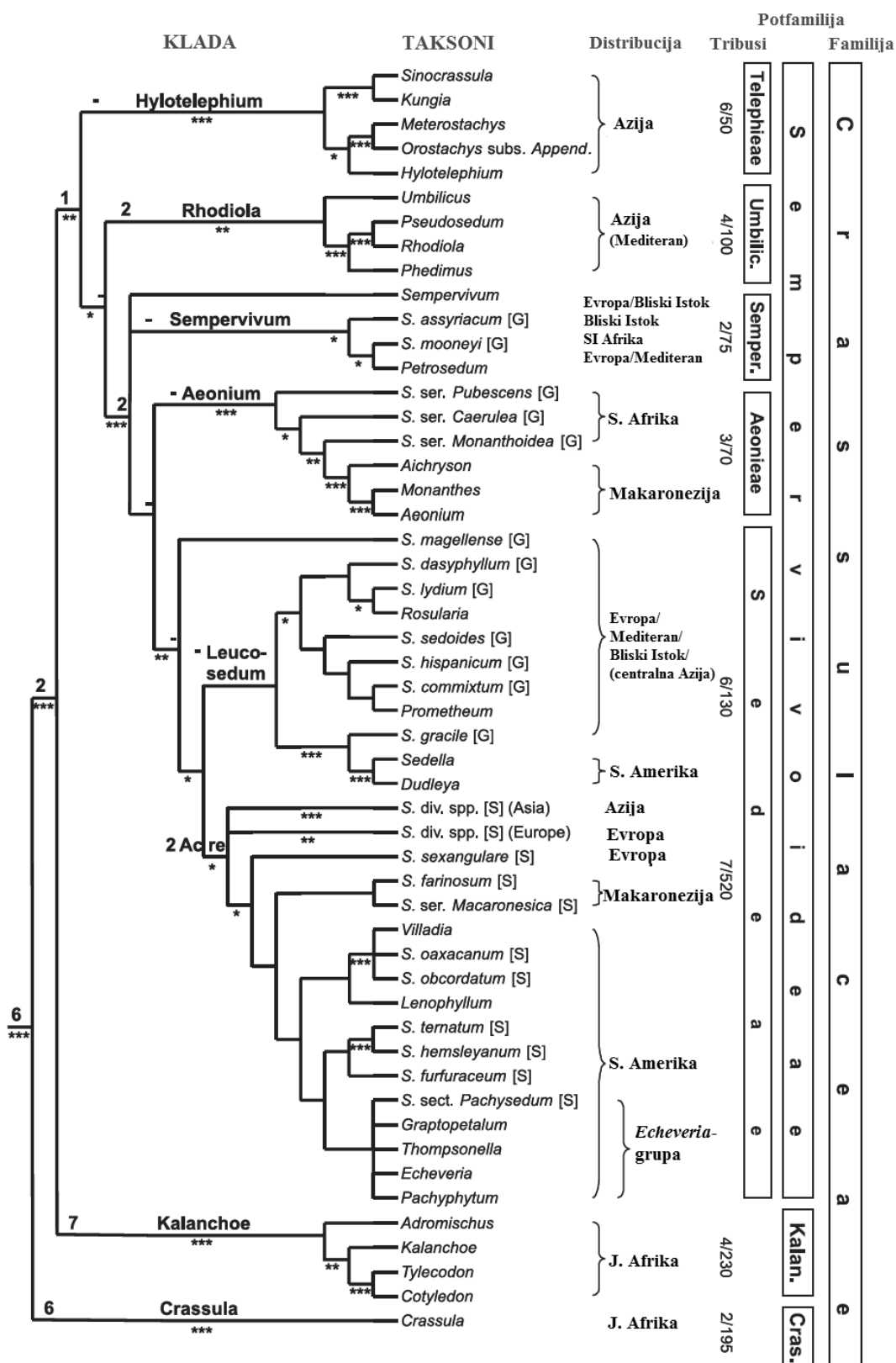
3) Sempervivoideae (uključujući Sedoideae i Echeverioideae):. Cvetovi uglavnom pentamerni ali se sreću predstavnici sa većim ili manjim brojem segmenata u određenim ciklusima cveta. Latice slobodne ili ponekad samo u bazi srasle, retko je krunica simpetalna; andreceum najčešće obdiplosteman; semenjača rebrasta, sa većim brojem rebara. Obuhvata tribuse Telephieae: sa rodovima *Sinocrassula*, *Kungia*, *Meterostachys*, *Orostachys*, *Hylotelephium*; Umbiliceae: sa rodovima *Umbilicus* (uključujući *Chiastophyllum*), *Pseudosedum*, *Rhodiola*, *Phedimus*; Semperviveae: sa rodovima *Sempervivum*, *Petrosedum*; aeonieae: *Aichryson*, *Monanthes*, *Perrierosedum*, *Aeonium* (uključujući *Greenovia*), Sedeae: *Pistorinia*, *Rosularia*, *Prometheum*, *Afrovivella*, *Sedella* (uključujući *Parvisedum*), *Dudleya*, *Sedum* (uključujući *Diamorpha*, *Cremonophyla*, *Mucizonia*), *Villadia*, *Lenophyllum*, *Graptopetalum* (uključujući *Tacitus*), *Thompsonella*; i Echeverieae: sa rodovima *Echeveria* i *Pachyphytum*.

Poslednja potfamilija je izdvojena kao glavna evolutivna grupa, pri čemu navedeni tribusi, zajedno sa odgovarajućim rodovima, čine glavne evolutivne grupe u okviru familije Crassulaceae (slike 14. i 15). U okviru potfamilije Sempervivoideae i tribusa Sedeae, kao jednog od najvećih u familiji, se na osnovu morfoloških karaktera cveta, semenjače i molekularnih pokazatelja prepoznaju dve nezavisne evolutivne grupe taksona, Leucosedum i Acre. Rodovi kao što su *Rosularia*, *Dudleya*, *Sedella* i *Prometheum*, zajedno sa još nekoliko manje značajnih rodova i oko 30 severnoameričkih vrsta roda *Sedum* (subgen. *Gormaniana*) pripadaju kladi Leucosedum. Sa druge strane klada Acre obuhvata veliki broj vrsta (526), pri čemu većinu čine vrste roda *Sedum* subgen. *Sedum*, ali i nekoliko drugih rodova familije Crassulaceae (*Graptopetalum*, *Echeveria* i dr.). Klada Acre se u fitohemijskom smislu odlikuje odsustvom tanina, ali se alkaloidi idvajaju kao karakteristični hemotaksonomski markeri za čitavu grupu. Evolutivna linija Acre se smatra grupom koja se odlikuje nejasno nedefinisanim taksonomskim odnosima, što se pre svega odnosi na *Sedum*, kao njen najveći rod. Razjašnjavanje taksonomskih odnosa u okviru pomenutog roda predstavlja pravi izazov u savremenim istraživanjima familije Crassulaceae (Carrillo-Reyes, et al. 2009).





**Slika 14.** Sistemi klasifikacije familije Crassulaceae (levo) i filogenetsko stablo sa centrima distribucije (desno) (Mort, et al. 2001; Mayuzumi i Ohba, 2004)



Slika 15. Revidirano filogenetsko stablo familije Crassulaceae (Thiede i Eggl, 2007)

Molekularne filogenetske studije, koje su sve više zastupljene u taksonomskim istraživanjima biljnog sveta, menjaju odnose između grupa na različitim taksonomskim nivoima. One su unapredile razumevanje odnosa između taksona i navele na preispitivanje postojećih hipoteza o evoluciji biljaka. Prve molekularne analize porodice Crassulaceae su izdvojile nekoliko evolutivnih klada i predstavile njenu strukturu drugačijom u odnosu na onu koja je proistekla iz tradicionalnih taksonomskih istraživanja. Istraživanja bazirana na molekularnim podacima su potvrdila pripadnost porodice Crassulaceae redu Saxifragales, kao i njenu bliskost sa porodicama Penthoraceae, Haloragaceae, Podstamaceae i Cynomoriaceae (Carrillo-Reyes, et al. 2009; Gontcharova i Gontcharov, 2007; Gontcharova i Gontcharov, 2009). Detaljnije filogenetsko stablo (slika 15), formirano na osnovu molekularnih dokaza, je značajno unapredilo saznanje o intrafamilijarnim odnosima, međutim, odnos glavnih evolutivnih linija je ostao delimično nerazjašnjen i pre svega, nedovoljno podkrepljen morfološkim dokazima (van Ham i 't Hart, 1998; Mort, et al. 2001; Gontcharova, et al. 2006; Gontcharova i Gontcharov 2007; Gontcharova i Gontcharov 2009; Carrillo-Reyes, et al. 2009).

Prisustvo određenih hemotaksonomskih markera takođe ukazuje na originalnost određenih evolutivnih grupa, dok je prisustvo drugih prikazano kao univerzalno. Na primer, najveći broj taksona u okviru porodice Crassulaceae se odlikuje prisustvom sedoheptuloze i izocitrata. Proantocijanidini (kondenzovani tanini), su distribuirani u svim evolutivnim linijama porodice, ali ne i u krugu taksona koji čine kladu Acre, u kojoj su zamenjeni prisustvom alkaloida. Prisustvo galoil-estara i flavonoida (nemetilovani i metilovani, od kojih je najređe prisutan miricetin) takođe pokazuje određenu filogenetsku pravilnost. Uloga komponenata epikutikularnih voskova (derivati masnih kiselina i triterpeni), cijanogenih jedinjenja i toksičnih bufadienolida se u navedenom smislu se takođe pokazala značajnom (Thiede i Eggli, 2007).

## 2.8. Opšte karakteristike, rasprostranjenje i značaj roda *Sedum*

Rod *Sedum* predstavlja jedan od najbrojnijih rodova porodice Crassulaceae u flori Balkanskog poluostrva, Evrope i umerenih područja severne polulopte ('t Hart, 1991). Pored navedenih regiona, određeni broj vrsta se sreće i u subtropskim područjima Sveta. U skladu sa analizom taksonomskog bogatstva rodova, *Sedum* se sa svojih približno 420 vrsta, izdvaja u odnosu na sve druge rodove porodice Crassulaceae (Thiede i Eggli, 2007). Rod čine sukulente, žlezdasto dlakave ili gole biljke, koje u najvećoj meri pripadaju jednogodišnjim ili višegodišnjim zeljastim, ređe polužbunastim formama. Podzemni deo biljaka iz ovog roda je najčešće u vidu slabo razvijenog, žiličastog korena, ređe se javljaju krtolasta zadebljanja ili rizom. Stabla su takođe sukulenta, ponekad pri bazi puzeća, ukorenjujuća ili sekundarno odrvenela. Odlikuju ih sočni, obično naizmenični, naspramni, ređe pršljenasto raspoređeni, ravni ili valjkasti listovi. Pojava sukulentnosti organa se često uočava i u generativnom regionu biljaka iz pomenutog roda. Cvetovi su u najvećem broju slučajeva pentamerni i potpuni, sa pravilnom simetrijom, dvopolni. Najčešće formiraju razgranate, cimosne cvasti izgrađene od većeg broja cvetova, ponekad sa siromašnijim bočnim cvastima. Plod je u vidu zbirnih, zvezdasto raširenih meškova, sa sitnim semenom. Semenjača sa papiloznim, mrežastim ili rebrastim izraslinama koje se koriste kao karakteri u taksonomiji roda.

Većina, pretežno egzotičnih vrsta roda *Sedum* je zbog izrazito atraktivnog izgleda našla primenu u hortikulturi, dok se nekoliko vrsta koristi u tradicionalnoj medicini (Gajić, 1972). Zbog svoje izrazite morfološke plastičnosti, većina vrsta ovog roda pokazuje veliku infraspecijsku varijabilnost, što rod *Sedum* svrstava u grupu kompleksnijih rodova, sa nedovoljno rasvetljenom taksonomskom problematikom.

U Evropi je rod zastupljen sa 30 do 50 vrsta ('t Hart, 1991). Mediteransko područje, obuhvatajući Severnu Afriku i Bliski Istok, u širem smislu se izdvaja kao jedan od centara taksonomskog diverziteta pomenutog roda, na nivou Evrope i Sveta. Balkansko poluostrvo, pre svega njegov južni deo sa ostrvima egejskog arhipelaga, se izdvaja kao centar diverziteta serija *Acria* i *Alpestria* ('t Hart, 1995).

### 2.8.1. Sistematika roda *Sedum* L.

Sa morfo-anatomskog i taksonomskog aspekta, rod *Sedum* se najčešće pominje u kontekstu problematičnog i kontroverznog roda familije Crassulaceae, pri čemu se posebno izdvaja evolutivna linija *Acre* (Carrillo-Reyes, et al. 2009). Prema Schönland-u (1891) rod *Sedum* predstavlja i jedan od najprimitivnijih i najstarijih rodova familije Crassulaceae. Po Bergeru (1930), u okviru ovog roda je bilo opisano oko 500 taksona, dok je prema drugim autorima taj broj daleko manji i iznosi oko 350 vrsta (Fröderström, 1930). U skladu sa svim navedenim činjenicama, rod *Sedum* se često izdvaja kao „centralna osovina“ iz koje su se potencijalno razvili mnogi drugi rodovi parafiletske familije Crassulaceae (parafiletsko svojstvo – taksoni se izvode/odvajaju od zajedničkog potomka). Filogenetski nedefinisane, parafiletske grupe, gde spada čitav niz taksona familije Crassulaceae, predstavljaju veliki izazov kada se vrši istraživanje njihove klasifikacije.

Prve zvanične klasifikacije roda *Sedum* predložene su u XVIII veku od strane Koch-a (1843) i Boisser-a (1872) koji su svoje studije bazirali na morfološkim karakteristikama vrsta. U brojnim taksonomskim studijama teorije o klasifikaciji roda *Sedum* su se menjale, zavisno od primene novih metoda u istraživanjima. Prema Bergeru, nijedna od primenjenih metoda nije bila dovoljno dobra za klasifikaciju pomenutog roda. Ipak, može se reći da je Bergerov sistem klasifikacije, odnosno koncept da se familija Crassulaceae raščlani na više bliskih, malih taksona, kako bi se pojednostavilo njihovo prepoznavanje, bio prihvaćen u praksi naučnika XX veka kao što su Ohba, Grulich i Löve & Löve ('t Hart, 1991) sa idejom da raščlane heterogeni rod *Sedum*.

Klasifikacija prema 't Hartu (1991) je bila zasnovana na evolutivnim odnosima evropskih vrsta roda *Sedum* (tabela 6). Ona uključuje morfološke, citološke i molekularne karaktere, tj. njihovu varijabilnost u okviru roda; hibridizacioni obrazac i distribuciju taksona. Odnosi između serija su određeni na osnovu odabranih karaktera koji su bili kladistički analizirani (AHC).

Prema aktuelnom taksonomskom konceptu koji prihvata većina recentnih studija rod *Sedum* se deli na dva podroda, *Sedum* subgen. *Gormania* rasprostranjen pretežno u Severnoj Americi i subgen. *Sedum*, čije su vrste karakteristične za deo areala koji se odnosi na Evropu, Afriku i Aziju. Poteškoće u infrageneričkoj taksonomiji se ogledaju u činjenici da rod obuhvata veliki broj taksona, od kojih mnogi nisu jasno razgraničeni čak ni u morfološkom smislu. Citološke studije i hibridizacioni eksperimenti su pokazali da se broj hromozoma kod vrsta pomenutog roda karakteriše širokim opsegom, stoga je citološki kriterijum, zbog

izraženog diverziteta, manje favorizovan u sistematici. Sa druge strane, hibridizacioni obrazac evropskih vrsta roda *Sedum* nije u saglasnosti sa morfološkim karakteristikama koji su se tradicionalno koristile u infrageneričkoj klasifikaciji. Na osnovu specifičnih morfoloških karaktera pojedini rodovi su izdvojenii iz roda *Sedum* (npr. *Rhodiola*, *Hylotelephium*, *Phedimus*), zbog čega je od interesa razjašnjavanje porekla grupa koje su izdvojene. Samim tim je neophodno definisati i filogenetske odnose izdvojenih taksona u odnosu na rod *Sedum*. Molekularne studije (cpDNA) su potvrdile visoku parafiletičnost datog roda ('t Hart, 1991; Mayuzumi i Ohba, 2004). Prema Mayuzumi i Ohba (2004), iz roda *Sedum* su opravdano izdvojeni rodovi *Rhodiola*, *Hylotelephium*, *Phedimus* i *Umbilicus*, ali monofiletsko poreklo klade *Telephium* nije dokazano, što otvara nova pitanja u filogeniji ove evolutivne linije.

**Tabela 6.** Klasifikacija evropskih vrsta roda *Sedum* ('t Hart, 1991)

<i>Sedum</i> L. subg. <i>Sedum</i>	
<i>Sedum</i> sect. <i>Sedum</i>	
1.	S. ser. <i>Acria</i> Berger: <i>S. acre</i> L.
2.	S. ser. <i>Macrosepala</i> (Regel & Schmalh) Borissova : <i>S. aetnense</i> Tineo.
3.	S. ser. <i>Anglica</i> Hart: <i>Sedum anglicum</i> Hudson.
4.	S. ser. <i>Melananthera</i> Hart: <i>S. melanatherum</i> DC:
5.	S.ser. <i>Alpestris</i> Berger: <i>S. alpestre</i> Vill., <i>S. annum</i> L., <i>S. apoleipon</i> Hart, <i>S. borissovae</i> Balk, <i>S. grisebachii</i> Boiss & Heldr., <i>S. laconicum</i> Biss. & Heldr., <i>S. multiceps</i> Cosson & Durieu, <i>S. sexangulare</i> L., <i>S. tuberiferum</i> Stoj. & Stef., <i>S. tuberosum</i> Cosson & Letourn, <i>S. ursi</i> Hart, <i>S. urvillei</i> DC.
6.	S. ser. <i>Samia</i> Hart: <i>S. samium</i> Runemark & Greuter.
7.	S. ser. <i>Litorea</i> Hart: <i>S. litoreum</i> Guss.
8.	S. ser. <i>Aithales</i> (Werb & Berth) Hart: <i>S. pallidum</i> MB., <i>S. rubens</i> L.
9.	S. ser. <i>Alba</i> Berger: <i>S. album</i> L., <i>S. gypsicola</i> Boiss & Reuter.
10.	S. ser. <i>Caerulrea</i> Fröderström: . <i>S. caerulreum</i> L.
11.	S. ser. <i>Confertiflora</i> Hart: <i>S. confertiflorum</i> Boiss.
12.	S. ser. <i>Dasyphylla</i> Hart: <i>S. dasyphyllum</i> L., <i>S. garnatense</i> Pau, <i>S. mucizonia</i> (Ortega) Hamet.
13.	S. ser. <i>Hirsuta</i> Fröderström: <i>S. hirsutum</i> All.
14.	S. ser. <i>Glauco-rubens</i> Fröderström: <i>S. hispanicum</i> L., <i>S. steudelii</i> Boiss.
15.	S. ser. <i>Monregalensia</i> Hart: <i>S. mongrelense</i> Balb.
16.	S. ser. <i>Pedicellata</i> Hart: <i>S. andeganavse</i> (DC.) Desv., <i>S. brevifolium</i> DC., <i>S. candollei</i> Hamet, <i>S. pedicellatum</i> Boiss. & Reuter.
17.	S. ser. <i>Propontica</i> Berger: <i>S. stellatum</i> L., <i>S. stoloniferum</i> S. G. Gmelin, <i>S. obtusifolium</i> C.A. Meyer.
18.	S. ser. <i>Rubra</i> Borissova: <i>S. caespitosum</i> (Cav.) DC.
19.	S. ser. <i>Rupestris</i> Berger: <i>S. ampexicaule</i> DC., <i>S. forsterianum</i> Sm., <i>S. montanum</i> Song. & Perrier, <i>S. ochroleucum</i> Chaix, <i>S. pruitanum</i> Brot., <i>S. rupestre</i> L., <i>S. sediforme</i> (Jacq.)Pau.
20.	S. ser. <i>Sedella</i> (Fourr. ) Hart: <i>S. atratum</i> L.
21.	S. ser. <i>Sempervivodes</i> (Boiss.) Fröderström: <i>S. pilosum</i> Fischer. Ex MB., <i>S. sempervivodes</i> Fischer. Ex MB., <i>S. typhaeum</i> Quézel & Contadriopoulos.
22.	S. ser. <i>Stefco</i> Hart: <i>S. stefco</i> Stef.
23.	S. ser. <i>Subulata</i> Hart: <i>S. subulatum</i> (C.A.Meyer) Boiss.
24.	S. ser. <i>Alsinefolia</i> Berger: <i>S. alsinefolium</i> All., <i>S. fragrans</i> Hart.
25.	S. ser. <i>Cepaea</i> (Koch) Fröderström: <i>S. ceapaea</i> L., <i>S. creticum</i> C. Presl, <i>S. cyprium</i> Jackson & Turrill, <i>S. lampusae</i> (Kotschy) Boiss., <i>S. microtachium</i> (Kotschy) Boiss., <i>S. tristriatum</i> Boiss. & Heldr.
26.	S. ser. <i>Magellensia</i> Hart: <i>S. magellense</i> Ten.
27.	S. ser. <i>Subrosea</i> Hart: <i>S. lagascae</i> Pau, <i>S. nevadense</i> Cosson, <i>S. villosum</i> L.

## 2.8.2. Fitohemijska istraživanja i tradicionalna upotreba predstavnika roda *Sedum*

Veći broj savremenih fitohemijskih istraživanja, među kojima se izdvajaju studije 't Harta i Stivensa (i njihovih saradnika), bio je posvećen istraživanju sekundarnih metabolita vrsta roda *Sedum*, ali i definisanju različitih hemotaksonomskih markera koji se mogu koristiti u rasvetljavanju složenih taksonomskih relacija, kao na nivou roda, tako i u okviru čitave familije Crassulaceae (tabela 7).

U taksonomske svrhe su pre svega razmatrani metaboliti epikutikularnih voskova, ali i druge grupe jedinjenja izdvojene iz tkiva većeg broja predstavnika koje nastanjuju šire područje Evrope i Azije. Najčešće istraživani fitokonstituenti roda *Sedum* su: alkaloidi, fenolne kiseline i njihovi derivati, flavonoidi i odgovarajući heterozidi, tanini i kumarini. U epikutikularnim voskovima (nepolarni ekstrakti), pored derivata masnih kiselina (alkani, alkoholi, estri i sl.) konstatovano je i značajno prisustvo triterpenoidnih komponenti (tabela 7).

Za razliku od alkana, koji se smatraju opšteprisutnim taksonomskih markerima, sa manje ili više varijabilnom distribucijom, triterpeni iz epikutikularnih voskova su se pokazali kao dobri taksonomski karakteri, zbog ograničene distribucije u okviru roda. Njihovo prisustvo u epikutikularnim voskovima se dovodi u vezu sa pojedinim kvalitativnim osobinama površine lista (izgled površine lista). Kao što je već napomenuto, distribucija alkaloida je ograničena na taksone iz serije *Acria*, a njihova varijabilnost je usklađena sa obrascem koji prati promenljivost morfoloških karaktera i pruža potporu u podeli roda zasnovanoj na molekularnim podacima (*Stevens, et al. 1992; Stevens, et al. 1993; Stevens, et al. 1995*). Prisustvo alkaloida je takođe u korelaciji sa odsustvom galne kiseline, tj. značajne količine kiseline su detektovane kod taksona koji ne sadrže alkaloide. Prisustvo ili odsustvo galne kiseline prati infrageneričku klasifikaciju, hibridizacioni obrazac i varijabilnost morfoloških karaktera. Primećeno je da se galna kiselina može koristiti karakter u fitohemijskoj diferencijaciji roda *Sedum*, što demonstrirano na primeru serija *Aithales* i *Atratum* ('t Hart, et al. 1999).



**Tabela 7.** Fitohemijski profil roda *Sedum*

Klasa jedinjenja	Primeri	Izvor
FENOLI	Hidrohinon Floroglucinol Pirokatehol	Pirogalol Arbutin [1] [2]
FENOLNE KISELINE	Galna kiselina Kafena kiselina Ferulična kiselina Siringinska kiselina	Gentizinska kiselina Vanilinska kiselina <i>o</i> -Kumarna kiselina [1] [3] [4]
FLAVONOIDI (I njihovi heterozidi)	Kemferol Herbacetin Seksangularetin Kvercetin Gosipetin	Kornikulatusin Izoramnetin Limocitrin Miricetin Hibiscetin [6] [3] [4] [2] [5] [7] [8] [9]
TANINI	Hidrolizujući tanini (estri galne i elaginske kiseline)	[1] [10] [3] [5]
KUMARINI	Kumarin 4,5-Dihidroksikumarin	7-Hidroksikumarin [1]
ALKALOIDI	Pirolidinski alkaloidi 2-Monosupstituisani piperidinski alkaloidi 2-Monosupstituisani hidrosipiperidinski alkaloidi	2,6-Disupstituisani piperidinski [11] [6] [10] [12] [5] [13]
UGLJENI HIDRATI	Glukoza Ramnoza Fruktoza Maltoza	Fruktoza Maltoza Arabinoza Ksiloz [1]
AMINOKISELINE	Cistein Triptofan Treonin Glutamin Arginine	Glutaminska kiselina Asparginska kiselina Metionin Aspargin [1]
KOMPONENTE EPIKUTIKULARNIH VOSKOVA	Alkani (normalni i račvasti) Primarni alkoholi (min., C <sub>16</sub> -C <sub>34</sub> ) Masne kiseline (min., C <sub>16</sub> -C <sub>34</sub> ) Dugolančani aldehidi (dom. C <sub>30</sub> , C <sub>32</sub> i C <sub>34</sub> ) i estri (C <sub>40</sub> -C <sub>50</sub> )	Triterpene (ursani, oleani, multiflorani, tarakserani, lupani i fernani) [14] [15] [16]
CIJANOGENA JEDINJENJA	Sermantozin	Sermantozin-epoksid [17] [18]

†Skracenicice: dom. – dominantne komponente, min. – zastupljene u najmanjem procentu (konkretno, u epikutikularnim voskovima). [1] *Korul'kin*, 2001, [2] *Sakar*, et al. 1993; [3] *Thuong*, et al. 2007; [4] *Xu*, et al. 2015; [5] *Carrascoa*, et al. 2014; [6] *Stevens*, et al. 1996; [7] *Tanye*, et al. 2015; [8] *Wolbis*, 1989; [9] *Wolbis i Królikowska*, 1988; [10] *Stevens*, et al. 1995; [11] *Stevens*, et al. 1993; [12] *Stevens*, et al. 1992; [13] *Kim*, et al. 1996; [14] *Niu*, et al. 2011; [15] *Stevens*, et al. 1994a i 1994b; [16] *Heb*, et al. 1998; [17] *Fang* et al., 1979; [18] *Nahrstedt*, et al. 1982.

Flavonoidni obrazac je okarakterisan kao nestalan zbog izraženog diverziteta u sastavu (flavonoidi izolovani iz lista). Hidroksilacija i *O*-metilovanje položaja C<sub>8</sub> osnovnog skeleta predstavlja čestu iliti zajedničku karakteristiku koja odlikuje velikog broj vrsta roda *Sedum*. Fenomen 8-*O*-Supstitucije je primećen i kod drugih simpetalnih predstavnika subfamilije Sedoideae, predstavljajući karakter koji može da ukaže na njihovu taksonomsku povezanost. Generalno, vrlo je teško definisati filogenetske odnose na osnovu flavonoidnog obrasca u okviru roda *Sedum*, ali u odnosu na specifičan kvalitativni i kvantitativni sadržaj,

odnosno prisusto jedinstvene kombinacije flavonola moguće je vršiti izdvajanje grupa na infrageneričkom nivou. Retki su slučajevi da se na osnovu prisustva jednog jedinjenja flavonoidnog tipa može izdvojiti određeni takson. Najzad, klasifikacije dobijene na osnovu fitohemijskih karaktera su u određenoj meri podržale rezultate dobijene iz hibridizacionih eksperimenata i molekularnih studija (Stevens, et al. 1992; Stevens, et al. 1993; Stevens, et al. 1995; Kim, et al. 1996, 't Hart, et al. 1999).

Biološka aktivnost vrsta roda *Sedum* se vezuje za bogat sadržaj raznovrsnih sekundarnih metabolita u tkivima biljka iz ovog roda. Tradicionalna upotreba pojedinih predstavnika roda *Sedum* inspirisala je mnoge naučnike da istražuju ovaj rod ne samo sa fitohemijskog, već i sa etnofarmakološkog aspekta. Pomenute studije su u najvećoj meri imale za cilj otkrivanje izvora biološki aktivnih supstanci ispitivanjem ekstrakta različite polarnosti ili pojedinačnih jedinjenja izolovanih iz biljnog materijala. Na primer, *S. sarmentosum* iz Kine i Koreje, se koristi u tradicionalnoj medicini, jer poseduje antioksidativne, antiupalne i antikancerogene osobine. Ekstrakt pomenute biljke je ispitivan na renalnu antifibrotičku *in vivo* i *in vitro* aktivnost. Zbog upotrebe biljke za lečenje hroničnog virusnog hepatitisa, ispitivana je i antiproliferativna aktivnost njenog alkaloidnog ekstrakta i hepatoprotektivna aktivnost izolovanih triterpena. Ispitivana je i antiinflamatorna, antiangiogenična i antinoseptivna aktivnost metanolnog ekstrakta pomenute vrste (Wang, et al. 1998; Kang, et al. 2000; Jung, et al. 2008; Bai, et al. 2014).

---

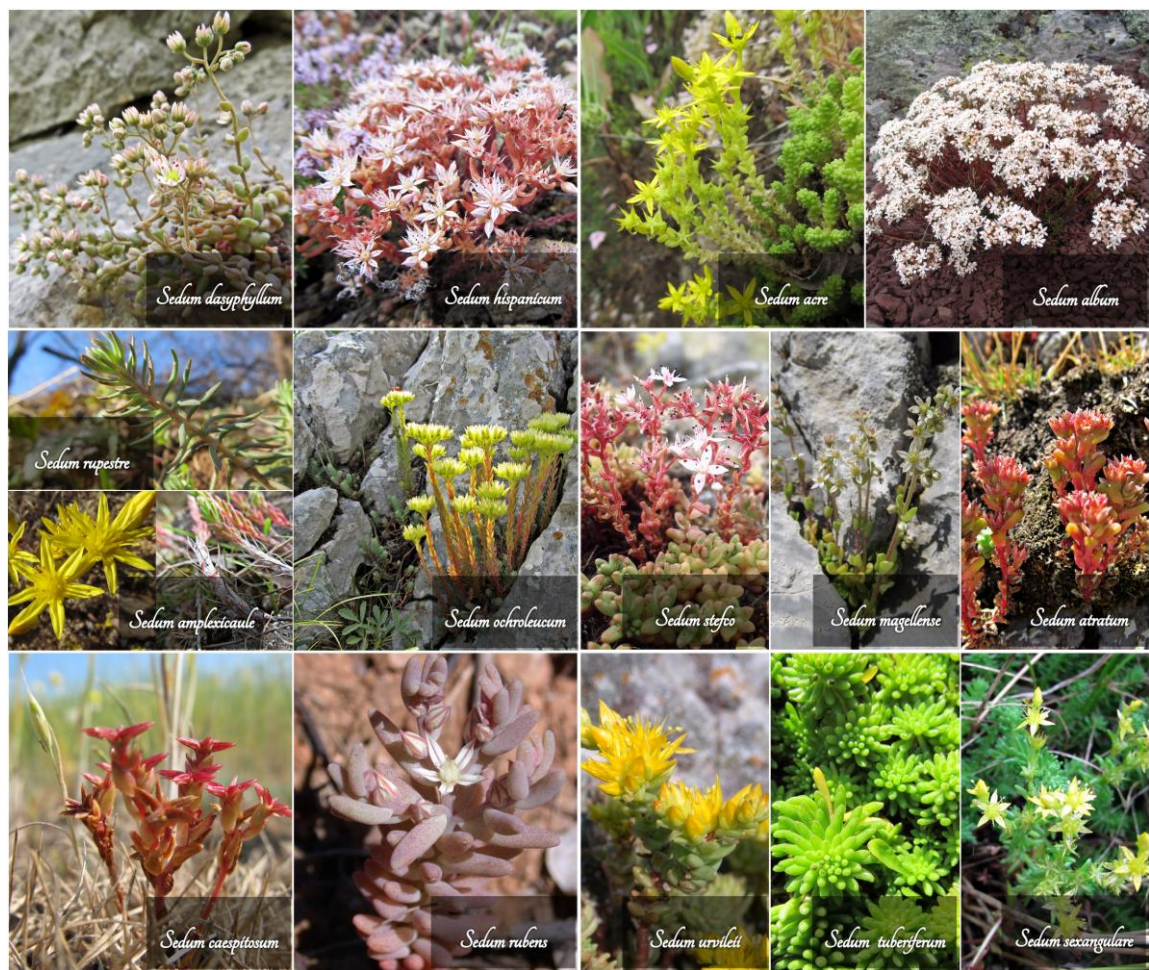
## 3. EKSPERIMENTALNI DEO

---

### 3.1. Biljni materijal

Distribucija hemijskih karaktera epikutikularnih voskova je praćena kod ukupno 26 vrsta (74 uzorka) iz sledećih rodova familije Crassulaceae: *Sedum* L., *Hylotelephium* H. Ohba, *Crassula* L., *Echeveria* DC. i *Kalanchoe* Adans. Distribucija karaktera metanolnih ekstrakata praćena je kod 24 vrste (52 uzorka) iz rodova: *Sedum*, *Crassula*, *Echeveria* i *Kalanchoe*. Vrste iz rodova *Hylotelephium*, *Crassula*, *Echeveria* i *Kalanchoe* su odabrani kao spoljna grupa taksona u odnosu na rod *Sedum* u analizi.

Biljni materijal je sakupljen tokom 2012. i 2013. godine na različitim lokalitetima centralnog dela Balkanskog poluostrva. Identifikacija je vršena prema ključu za određivanje vrsta roda *Sedum* u Flori Evrope (Tutin, et al. 2010). Ispitivane vrste su sistematizovane u skladu sa serijom kojoj pripadaju. Takođe su prikazane informacije o lokalitetima i godini prikupljanja biljnog materijala (prilog 1). Primerici analiziranih taksona su deponovani u Herbarijumu Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu (HMN). Taksoni spoljne grupe su zavedeni pod vaučer brojevima: 11972 (*Hylotelephium*), 7245 (*Crassula*), 7142 (*Echeveria*) i 7141 (*Kalanchoe*). Vaučer brojevi dokumentovanog biljnog materijala iz roda *Sedum* su navedeni uz adekvatne taksonu u sledećem poglavlju. Reprezentativni predstavnici roda *Sedum* su predstavljeni na slici 16.



**Slika 16.** Fotografije odabranih vrsta roda *Sedum* iz centralnog Balkanskog poluostrva (foto: Bojan Zlatković)

## **3.2. Izolovanje i analiza epikutikularnih voskova**

### **3.2.1. Ekstrakcija epikutikularnih voskova**

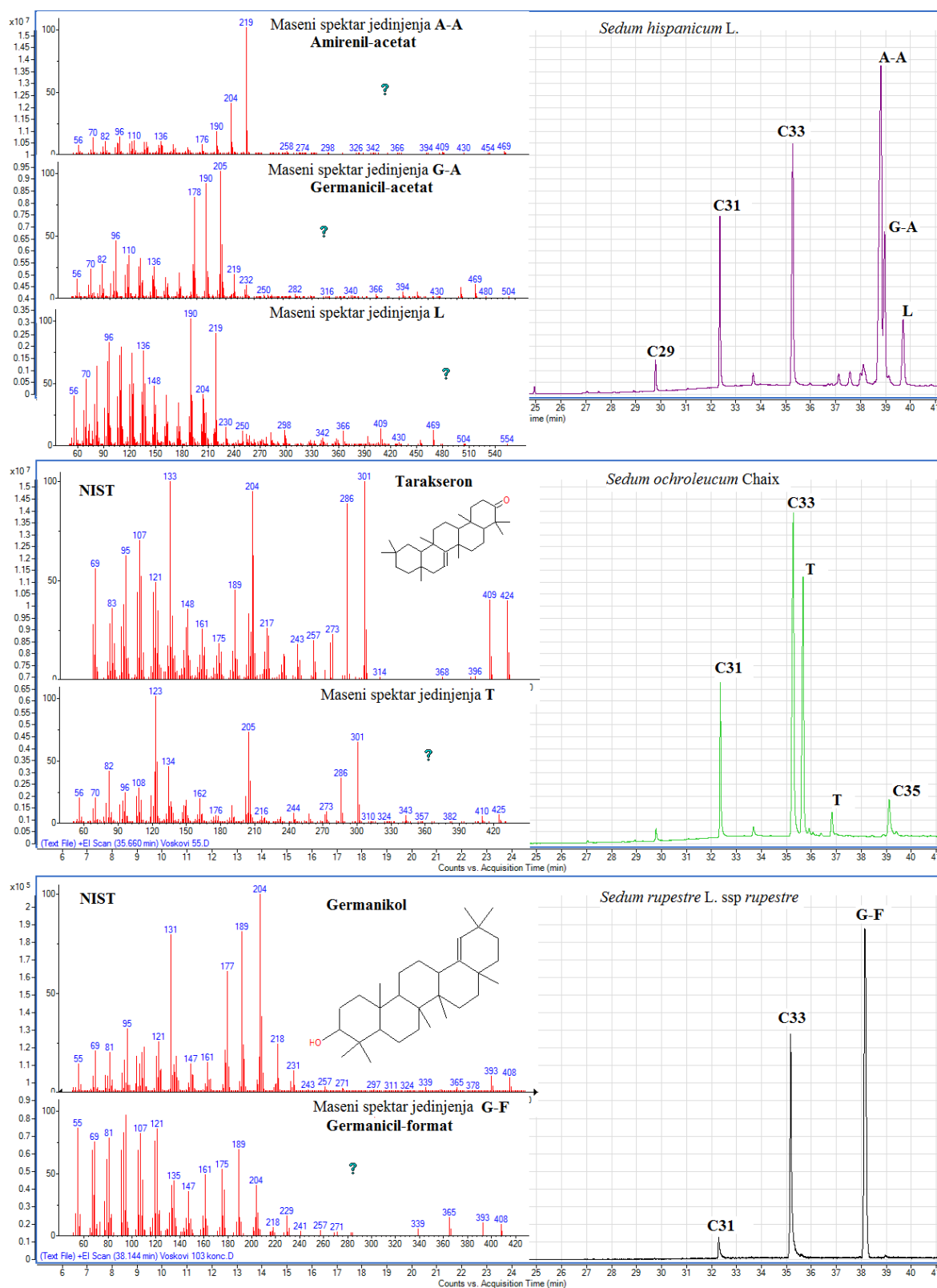
Pre izolovanja, tj. spiranja epikutikularnih voskova, svaki uzorak je najpre očišćen, a zatim izmeren. Masa uzoraka se kretala od 2 do 13 g. Za ekstrakciju je korišćena modifikovana procedura Stivensa (*Stevens, et al. 1994a*). Epikutikularni vosak je izolovan tako što je pripremljen i odmeren materijal potapan u heksanu u trajanju od 30 sekundi. Heksanski ekstrakt je zatim proceđen kako bi se uklonile mehaničke/nerastvorne primese. Heksanski ekstrakt je zatim sušen pomoću bezvodnog magnezijum-sulfata i nakon ponovnog filtriranja uparen do suva na vakuum-uparivaču. Suvi ostatak je odmeren i pripremljen za GC-FID i GC-MS analizu (koncentracija ekstrakta je iznosila 10 mg/mL). Prinosi voskova su se kretali u opsegu od 0.01 do 0.98 % (w/w) (prilog 1).

### **3.2.2. GC-MS i GC-FID analiza epikutikularnih voskova**

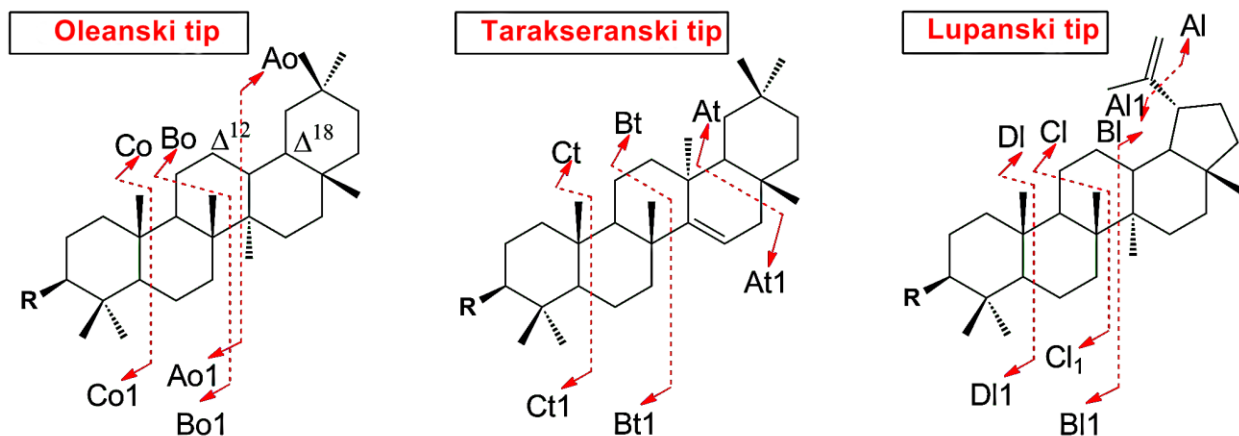
Heksanski ekstrakti su snimani odmah nakon ekstrakcije sa biljnog materijala. Pre injektovanja, svaki uzorak je filtriran kroz celulozni mikrofiltrar (0.45 mm PTFE). Svi uzorci su snimani u triplikatu, na 7890B GC hromatografu (Agilent Technologies, USA) sa Combi PAL auto-semplerom i HP-5 MS kolonom (5% fenil metil siloksan, 30 m x 0.25 mm i.d. i 0.25 µm debljina filma) kuplovanom sa 7890A plameno jonizacionim (FID) detektorom i 5977A masenim (MS) detektorom iste kompanije.

Temperaturni program: najpre izotermalno na 150 °C, prvih 2.25 minuta, zatim linearni porast temperature, od 150 do 300 °C (gradijent 5 °C/min), potom izotermalno na 300 °C, zadnjih 10 minuta programa. Temperatura injektora 250 °C, interfejsa 300 °C; protok nosećeg gasa – helijuma 1.0 mL/min. Uzorci su injektovani u tzv. splitless modu. Bekfleš 1.89 min, na 280 °C, sa helijumom pod pritiskom od 50 psi. MS uslovi: jonizacija -70 eV, opseg masa 50 – 650 amu, vreme skenova 0.32 sekunde. GC-FID analiza je izvedena pod istim eksperimentalnim uslovima kao što je već navedeno za GC-MS analizu. Procentni sastav je preračunat na osnovu površine GC-FID pikova, bez korekcionih faktora. Komponente voskova su identifikovane pomoću AMDIS softvera (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, Ver. 2.1, DTRA/NIST, 2011*), na osnovu lineranih retencionih indeksa (RI), koji su određeni na osnovu retencionih vremena standardne serije *n*-alkana (C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>), snimljene na istom aparatu i pod istim uslovima kao i uzorci. RI su

upoređivani sa literaturnim vrednostima (*Van Den Dool i Kratz*, 1963; *Stein*, 1990; *Adams*, 2007; NIST Chemistry WebBook); identifikacija je izvršena na osnovu upoređivanja masenih spektara komponenti voska sa literaturnim/bibliotečkim masenim spektrima Wiley 6, NIST02, MassFinder 2.3 (*Stein*, 1990) i MS bibliotekama dobijenih na osnovu snimanja čistih supstanci. Na slici 17. su dati TIC hromatogrami i maseni spektari komponenti voska nekih ispitivanih vrsta. Slika 18. pokazuje osnovnu fragmentaciju ispitivanih triterenskih serija i njihove fragmente. Literaturni podaci o fragmentaciji triterpena i masenim spektrima su dati u prilogu 2.



**Slika 17.** Prikaz TIC-a epikutikularnih voskova vrsta *S. hispanicum*, *S. ochroleucum* i *S. rupestre* kao i MS-spektara dominantno prisutnih triterpena (NIST – baza podataka)



Oznaka fragmenta	m/z	Formula fragmenta
Ao	190	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub>
Ao1	220 + R	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> + R
Bo	218	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub>
Bo1	192 + R	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> + R
Co	286	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub>
Co1	124 + R	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> + R
At	124	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub>
At1	286 + R	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> + R
Bt	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Bt1	206 + R	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> + R
Al	41	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>
Al1	369 + R	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> + R
BI	190	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub>
BI1	220 + R	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> + R
Cl	218	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub>
Cl1	192 + R	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> + R

R: =O, -OH, -OCOCH<sub>3</sub>, -OCOMe

Ct i Ct1, kao i DI i DI1 fragmenti se ne razlikuju od Co i Co1 framenata

Slika 18. Fragmentacija predstavnika triterpenskkih serija i njihovi karakteristični fragmenti



### **3.3. Izolovanje i analiza metanolnih ekstrakata**

#### **3.3.1. Dobijanje metanolnih ekstrakata**

Nakon spiranja epikutikularnih voskova sa površine biljnog materijala, svaki uzorak je fino usitnjen i ekstrahovan metanolom (1/5, w/v). Ekstrakcija je najpre vršena postupkom maceracije, u toku 24 h, a potom 30 minuta pomoću ultrazvuka na sobnoj temperaturi. Nakon filtriranja (0.45 µm membranski PTFE filtri) metanolni ekstrakti su snimani i analizirani korišćenjem HPLC tehnike.

#### **3.3.2. HPLC analiza i identifikacija komponenti metanolnih ekstrakata**

Analiza je izvedena na tečnom hromatografu *Agilent 1200* koji je opremljen C18 kolonom (*Zorbax Eclipse XDB-C18*, 5 µm, 4.6×150 mm), DAD detektorom (*diode array detector*), softverom *Chemstation (Agilent Technologies)*, kvaternom pumpom, vakuum degazerom, autosemplerom i opcijom za termostatiranje kolone. Eluiranje uzoraka je izvedeno u gradijentnom modu, variranjem zampraminskih odnosa (v/v) eluenta A (0.27 M rastvor mravlje kiseline) i eluenta B (metanol): inicijalno 70 % A (0-5 min), 70-30 % A (5-20 min), 30-10 % A (20-25 min). Temperatura kolone je bila 25 °C, injektovana zapremina uzorka 5 µL, opseg talasnih dužina 190–400 nm, a talasna dužina detekcije 254 i 350 nm. Identifikacija komponenti ekstrakata je izvedena na osnovu retencionih vremena i apsorpcionih spektara komercijalno dostupnih standarda i prethodno izolovanih jedinjenja (Stojanović, et al. 2014) koji su rastvarani u metanolu i snimani pod istim uslovima kao i analizirani uzorci (apsorpcioni spektri pojedinih standarda su predstavljeni na slici 21).

U tabeli 8. su prikazane komponente metanolnih ekstrakata vrsta roda *Sedum* i spoljnih grupa, čiji je relativan sadržaj (izražen kao udeo površine pika u odnosu na površinu svih pikova sa hromatograma) uzet u obzir prilikom formiranja matrice za statističku analizu. Poznato je da su polarni ekstrakti, kao što je metanolni, bogati u najvećoj meri polarnim fenolnim jedinjenjima različitog tipa, zastupljenih u različitoj koncentraciji. Za analizu je napravljena selekcija i u matricu su unošeni sadržaji za dominantne komponente (čiji je sadržaj makar u jednom uzorku iznosio 10% ili više procenata).

**Tabela 8.** Dominante komponente metanolnih ekstrakata analiziranih vrsta roda *Sedum* i spoljnih grupa taksona: retenciona vremena i talasne dužine karakterističnih UV-maskimuma

Oznaka jedinjenja	Karakteristike komponenti		Jedinjenje	
	Rt (min)	$\lambda_{max}$ (nm)		
<b>I</b>	2.800	230	K1	OPK
<b>II</b>	2.888	234	Hininska kiselina	CK
<b>III</b>	3.665	272	Galna kiselina	DBK
<b>IV</b>	4.556	260, 360	$\alpha$ -Rezorcilna kiselina	DBK
<b>V</b>	6.372	230, 252, 300	Protokatehinska kiselina	DBK
<b>VI</b>	8.244	239, 276	Epikatehin	Flavanol
<b>VII</b>	10.424	260, 360	H1	Heterozid
<b>VIII</b>	11.591	256, 356	H2	Heterozid
<b>IX</b>	12.500	265, 360	H3	Heterozid
<b>X</b>	14.291	258, 360	H4	Heterozid
<b>XI</b>	16.503	262, 353	H5	Heterozid
<b>XII</b>	18.000	255, 355	Rutin	Heterozid kvercetina
<b>XIII</b>	18.388	258, 377	F	Flavonoid
<b>XIV</b>	18.938	270, 355	H6	Heterozid
<b>XV</b>	19.775	264, 364	Kvercitrin ili miricetin	Heterozid kvercetina ili Flavonol
<b>XVI</b>	20.330	265, 345	H7	Heterozid

†**Skraćenice:** Rt- retenciono vreme;  $\lambda_{max}$  – talasna dužina koja odgovara maksimumu apsorpcije datog jedinjenja (aporspciona traka); DBK – derivat benzoeeve kiseline; K – kiselina; CK – zasićena ciklična kiselina; OPK – organska polikiselina; H – heterozid; F – flavonoid.

†**Selekcija komponenti** je izvršena na osnovu zastupljenosti datog jedinjenja. Ukoliko je komponenta bila zastupljena 10% ili više procenata makar u jednom uzorku/vrsti, sadržaj iste je praćen i unošen u matricu za svaki uzorak.

†**Identifikacija** je izvršena upoređivanjem retencionih vremena i apsorpcionih spektara komponenti ekstrakta sa komercijalno dostupnim standardima, već izolovanim i identifikovanim jedinjenjima (snimljeni pod istim uslovima kao i uzorci) i sa literaturnim podacima (*Lake*, 2016; *Zhang*, et al. 2013; *Stojanović*, et al. 2013; *Sato*, et al. 2011; *Tumbas*, et al. 2004; *Slimestad*, 2003; *Wojtaś-Wasilewska*, et al. 1983).

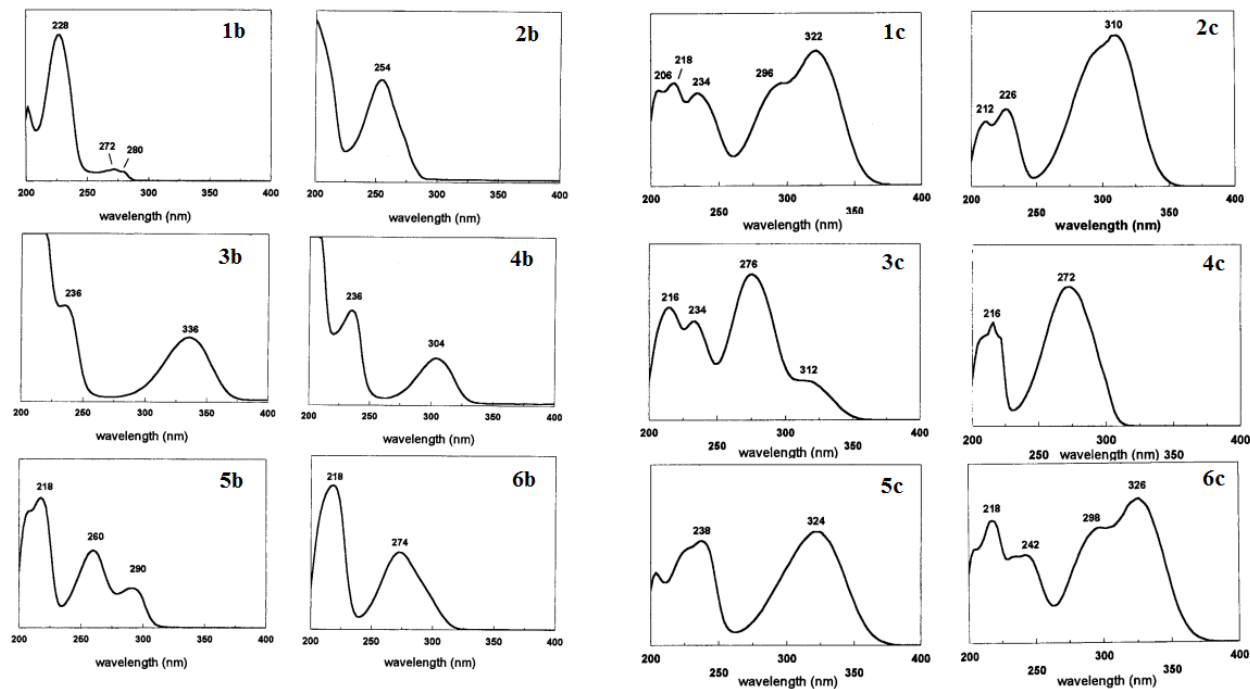
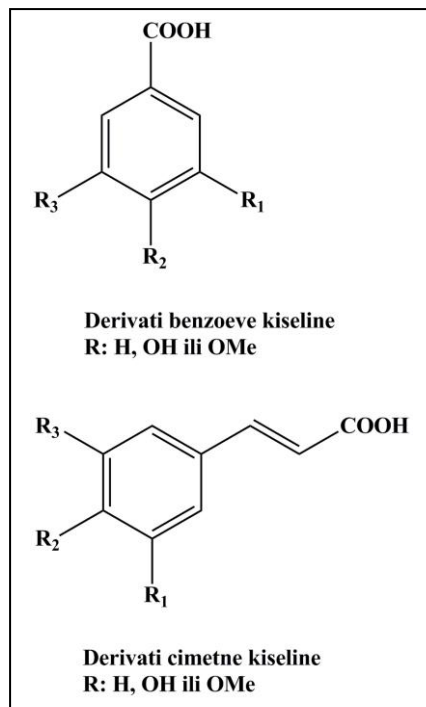
†K1 i K2 – komponente koje eluiraju na istom retencionom vremenu kao i hininska, tartarna i limunska kiselina, a čiji se apsorpcioni maksimumi u velikoj meri slažu sa apsorpcionim maksimumima pomenutih kiselina. H1-H7 – komponente koje su identifikovane na nivou klase i prema apsorpcionim spektrima označene kao heterozidi. F – komponenta koja se prema aporspcionom spektru svrstava u flavonoid (tentativno miricetin).

†Standardi su rastvarani u metanolu.

Na osnovu spektralnih karakteristika fenolnih jedinjenja moguće je izvršiti njihovu identifikaciju. Fenolna jedinjenja jednim imenom obuhvata klasu strukturno različitih jedinjenja koja, u najopštem slučaju, sadrže najmanje jedan aromatičan prsten i najmanje jednu hidroksilnu koja je direktno vezana za isti (osnovne strukture flavonoida su predstavljene na slici 20). Strukturna raznolikost potiče od stepena hidroksilacije i mogućnosti esterifikacije, alkilovanja i glikozilovanja. Obzirom na nezasićenost, fenolna jedinjenja imaju sposobnost apsorpcije zračenja u UV/VIS oblasti spektra.

Fenolne kiseline se mogu sistematizovati u dve grupe (slika 19): derivati benzoeeve kiseline ( $C_6-C_1$  skelet) i derivati cimetine kiseline ( $C_6-C_3$  skelet). Fenolne kiseline intenzivno apsorbuju u UV oblasti. Derivati benzoeeve kiseline pokazuje maksimum apsorpcije ( $\lambda_{max}$ ) između 246 i 262 nm (i 290-315 nm, tzv. rameni, iliti engl. *shoulder*, maksimum); dok su galna kiselina sa  $\lambda_{max}$  271 nm i siringinska kiselina sa  $\lambda_{max}$  275 nm predstavljaju izuzetke iz pomenute klase. Derivati cimetine kiseline apsorbuju u dve UV oblasti: 225-235 nm i 290-330 nm.  $\lambda_{max}$  ferulične, sinapinske, kafene i *p*-kumarne kiseline se nalazi na talasnoj dužini od 300 nm;  $\lambda_{max}$  hlorogene i *p*-kumarne kiseline 310 nm sa ramenim maksimumom između 270 i 290 nm (slika 19) (Lee, 2000). ApSORPCIONI SPEKTRI flavonoida se najčešće karakterišu prisustvom dva apSORPCIONA maksimuma (apSORPCIONE trake): I traka odgovara apSORPCIJI prstena B (325-400 nm), II traka odgovara apSORPCIJI prstena A (240-295 nm). Spektroskopska istraživanja su pokazala da se pomenute trake flavona i flavonola najčešće nalaze u oblasti talasnih dužina 320-385 nm (I traka) i 250-285 (II traka). Strukturna različitost ova dva tipa flavonoida odražava se i na njihove spektralne karakteristike. Naime, prisustvo slobodne hidroksilne grupe u položaju 3 kod flavonola utiče da se traka i nalazi na većoj talasnoj dužini (360-380 nm) u odnosu na istu traku kod flavona ili 3-metoksiflavona (325-355 nm). Promene u strukturi, tj. uvođenje novih grupa/supstituenata dovodi do promene položaja apSORPCIONIH maksimuma. Tako, na primer kemferol, kvercetin i miricetin su flavonoli koji se razlikuju po broju hidroksilnih grupa u prstenu B. ApSORPCIONI maksimumi prstena B se pomeraju ka većim talasnim dužinama sa povećanjem broja hidroksilnih grupa (batohromni efekat), dok apSORPCIONI maksimum prstena A ostaje nepromenjen: kemferol 367 nm, kvercetin 371 nm i miricetin 374 nm. Jači batohromni efekat se javlja kod struktura koje sadrže metoksi grupe, jer je elektron-donorsko svojstvo metoksi grupe intenzivnije nego isto za hidroksilnu grupu. Postoji procena da se za svaku novouvedenu hidroksilnu ili metoksi-grupu apSORPCIONI maksimum pomera batohromno za 10 do 15 nm. Kod flavanona, zbog odsustva dvostruke veze u prstenu C ( $C_2-C_3$ ) – odsustvo konjugacije između prstena A i prstena B, traka I se javlja na nižim talasnim dužinama u oblasti 320-330 nm i traka II u oblasti 280-290 nm (slična situacija i kod flavanonola i izoflavona). Halkoni i auronii se karakterišu veoma intenzivnom trakom i u opsegu 365-390 nm i 390-430 nm, dok je traka II vidno manjeg intenziteta i u opsegu 240-270 nm. Antocijani predstavljaju najuočljiviju grupu flavonoida, jer apsorbuju u vidljivoj oblasti spektra. I kod njih se uočavaju dva apSORPCIONA maksimuma: traka II slabijeg intenziteta, 270-280 nm, i intenzivnija traka I u vidljivoj oblasti 465-560 nm. Boja antocijana, između ostalog, zavisi od broja i pozicije hidroksilnih grupa u prstenu (Bohm, 1998; Lee, 2000; Nollet i Toldra, 2012; Kumar i Pandey, 2013).

Apsorpcioni spektri standarda fenolnih kiselina (metanolni rastavori)



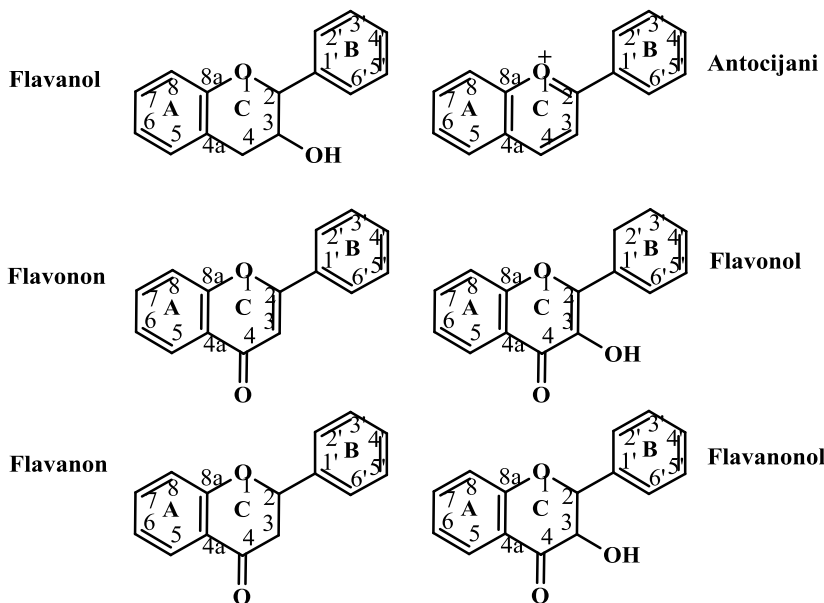
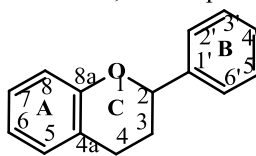
Apsorpcioni spektri derivata benzoeve kiseline

Apsorpcioni spektri derivata cimetine kiseline

Slika 19. Apsorpcioni spektri standarda fenolnih kiselina (metanolni rastavori) (Lee, 2000)

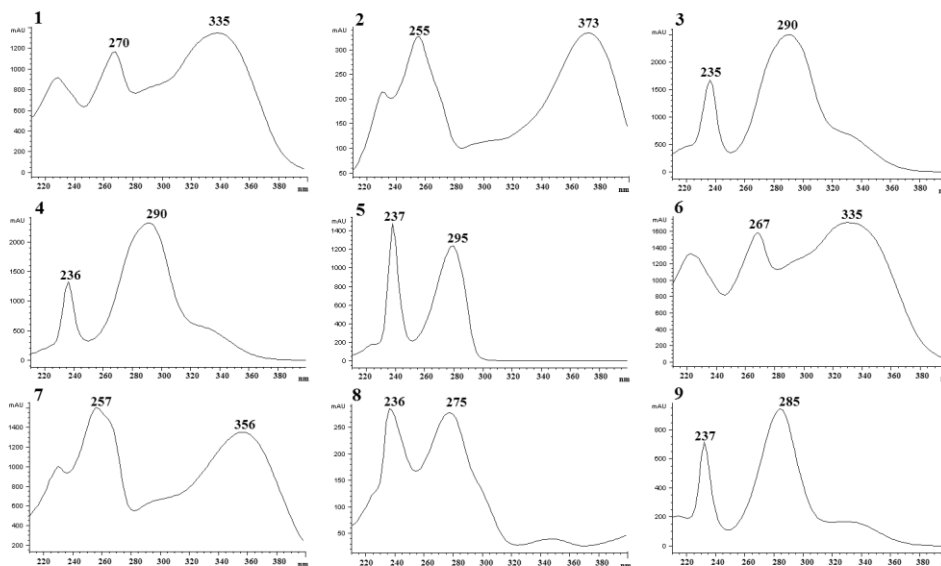
Derivati benzoeve kiseline: 1b – benzoeva kiselina, 2b – p-hidroksi benzoeva kiselina, 3b – gentizinska kiselina, 4b – salicilna kiselina, 5b – vanilinska kiselina, 6b – galna kiselina. Derivati cimetine kiseline: 1c – ferulična kiselina, 2c – p-kumarna kiselina, 3c – m-kumarna kiselina, 4c – cimeta kiselina, 5c – sinapinska kiselina, 6c – kafena kiselina.

Osnovna struktura  
2-Fenil-1,4-benzopiron



Slika 20. Osnovne strukture podgrupa flavonoida

Apsorpcioni spektri standarda flavonoidnih jedinjenja - aglikona i heterozida (metanolni rastvori)



Slika 21. Apsorpcioni spektri standarda flavonoidnih jedinjenja (metanolni rastvori)

**Aglikoni:** 1 – apigenin (flavonon); 2 – kvercetin (flavonol); 3 – hesperitin (flavanon); 4 – naringenin (flavanon); 5 – katehin (flavanol); 6 – acacetin (flavonon). **Heterozidi:** 7 – rutin ili kvercetin 3-*O*-rutinozid; 8 – oenin ili malvidin 3-*O*-glukozid i 9 – hesperidin ili hesperiti 7-*O*-rutinozid

### **3.4. Statistička obrada podataka**

Statističke analize su izvedene korišćenjem softvera STATISTICA 8. Procentualni sadržaji komponenti epikutikularnih voskova (*n*-alkana i triterpenskih serija – isparljive komponente) i metanolnih ekstrakata (u najvećem procentu jedinjenja fenolnog tipa – neisparljive komponente) ispitivanih taksona, kao i ukupni sadržaji *n*-alkana (C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub>), triterpenskih serija (oleanska, lupanska i tarakseranska serija) i komponenti metanolnog ekstrakta (iz opsega retencionih vremena  $\Delta R_t=15-20$  min. u kojem dominantno eluiraju heterozidi i aglikoni fenolnog tipa, tabela 8) jesu eksperimentalni podaci koji su korišćeni za formiranje matrica.

Iz seta statističkih metoda, za obradu i interpretaciju podataka korišćeni su osnovni statistički parametri; univarijantna metoda – analiza varijanse (ANOVA) i multivarijantne statističke metode: analiza glavnih komponenti (PCA), kanonijska diskriminantna analiza (CDA), klaster analiza (AHC) i korespondentna analiza (CA).

---

## 4. REZULTATI

---

U ovom poglavlju su predstavljeni (tabelarno i grafički) rezultati istraživanja predstavnika roda *Sedum* i njemu manje ili više srodnih taksona iz drugih rodova familije Crassulaceae, tzv. spoljne grupe (*Crassula*, *Echeveria*, *Kalanchoe* i *Hylotelephium*).

Deskripcija fitohemijskog profila predstavnika roda *Sedum* je prikazana na osnovu netransformisanih podataka (pojedinačnih i ukupnih sadržaja karaktera), na kojima je vršeno izračunavanje osnovnih statističkih parametara: minimalna i maksimalna vrednost (min i max), srednja vrednost ( $\bar{X}$ ) i standardna devijacija ( $\sigma$ ). Ostale tehnike analize sprovedene su na transformisanim vrednostima. Nakon transformacije, normalnost distribucije podataka je ispitana Kolmogorov-Smirnov testom, koji je pokazalo da većina karaktera pokazuje normalnu distribuciju.

## 4.1. Fitohemijska karakterizacija serija roda *Sedum*

Za deskripciju fitohemijskih profila serija roda *Sedum* korišćeni su osnovni statistički parametri: srednja vrednost ( $\bar{X}$ ), standardna devijacija ( $\sigma$ ), minimalna (min) i maksimalna vrednost (max). Redosled serija je rikazan po filogenetskom principu, poštujući sistem predstavljen od strane 't Hart-a (1997).

### 4.1.1. Zastupljenost pojedinih komponenti u epikutikularnom vosku i metanolnom ekstraktu

Karakterizacija fitohemijskih profila predstavnika serija roda *Sedum* je izvršena na dva različita nivoa: na nivou epikutikularnog voska i na nivou metanolnog ekstrakta. Karakteri koji su korišćeni u opisivanju fitohemijskih profila jesu: sadržaj *n*-alkana (C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub>) i triterpenskih serija (oleanska, lupanska i tarakseranska serija) u slučaju epikutikularnih voskova i sadržaj jedinjenja metanolnih ekstrakata, uglavnom fenolnog tipa (fenolne kiseline, flavonoidi i njihovi heterozidi) ispitivanih vrsta (prilog 3). Za deskripciju sastava voska i metanolnog ekstrakta vrsta zastupljenih samo sa jednim uzorkom su korišćene vrednosti dobijene iz tri ponovljena merenja.

#### *Sedum ser. Acria* A.Berger

Serija *Acria* A.Berger je u analizama predstavljena jednom ispitivanom vrstom, *S. acre* L. (vaučer broj 7327).

*Epikutikularni vosak.* Od ispitivanih komponenti voska, dominantno su prisutni *n*-alkani, a među njima C<sub>31</sub> ( $\bar{X}$ =8,82±5,39; min=1,00; max=13,39) i C<sub>33</sub> ( $\bar{X}$ =70,38±12,59; min=52,00; max=80,35) u najvećem procentu. Od triterpena, registrovana je oleanska serija ( $\bar{X}$ =1,74±2,64; min=0,00; max=5,57).

*Metanolni ekstrakt.* U metanolnim ekstraktima najzastupljenije su komponente II ( $\bar{X}$ =13,25±8,51; min=5,82; max=22,53), III ( $\bar{X}$ =13,08±5,30; min=7,01; max=16,78), VI ( $\bar{X}$ =12,04±10,09; min=0,49; max=19,16) i XII ( $\bar{X}$ =6,57±2,73; min=4,20; max=9,56).

#### *Sedum ser. Alpestris* A.Berger

Serija *Alpestris* A.Berger je u analizama predstavljena sa šest ispitivanih vrsta: *S. alpestre* Vill. (vaučer broj 7345); *S. annuum* L. subsp. *annuum* (vaučer broj 7346); *S.*



*grisebachii* Boiss. & Heldr. (vaučer broj 7347); *S. sexangulare* L. (vaučer broj 11921); *S. tuberiferum* Stoj. & Stef. (vaučer broj 7348); *S. urvillei* DC (vaučer broj 11920).

*Epikutikularni vosak.* Kao i kod serije *Acria*, dominantno su prisutni *n*-alkani, C<sub>31</sub> ( $\bar{X}$ =23,67±12,09; min=4,66; max=45,81) i C<sub>33</sub> ( $\bar{X}$ =46,78±18,73; min=14,39; max=71,94). Od triterpena, registrovane su sve tri serije, ali je oleanska najzastupljenija ( $\bar{X}$ =0,45±0,86; min=0,00; max=3,29).

*Metanolni ekstrakt.* Najzastupljenija komponenta je II ( $\bar{X}$ =14,81±11,79; min=1,59; max=45,26).

### **Sedum ser. Litorea 't Hart**

Serijska *Litorea* 't Hart je u analizama predstavljena jednom ispitivanom vrstom, *S. litoreum* Guss (vaučer broj 7351).

*Epikutikularni vosak.* Dominantno su prisutni *n*-alkani C<sub>31</sub> ( $\bar{X}$ =24,02±0,12; min=23,91; max=24,15) i C<sub>33</sub> ( $\bar{X}$ =59,14±0,27; min=58,84; max=59,35). Od triterpena, registrovana je oleanska serija ( $\bar{X}$ =6,08±0,05; min=6,04; max=6,13).

### **Sedum ser. Aithales (Webb & Berthel.) 't Hart**

Serijska *Aithales* (Webb & Berthel.) 't Hart je u analizama predstavljena jednom ispitivanom vrstom, *S. rubens* L. (vaučer broj 7349).

*Epikutikularni vosak.* Registrovane su oleanska i lupanska serija triterpena, pri čemu oleanska serija dominira u voskovima ( $\bar{X}$ =52,41±3,72; min=49,79; max=59,35). Od *n*-alkana su C<sub>31</sub> ( $\bar{X}$ =7,91±1,84; min=4,47; max=9,22) i C<sub>33</sub> ( $\bar{X}$ =24,18±2,05; min=20,67; max=26,76) prisutni u najvećem procentu.

*Metanolni ekstrakt.* Najzastupljenije komponente su II ( $\bar{X}$ =19,66±0,12; min=19,58; max=19,80), III ( $\bar{X}$ =12,83±0,06; min=12,78; max=12,89) i VIII ( $\bar{X}$ =6,02±0,10; min=5,91; max=6,10).

### **Sedum ser. Alba A. Berger**

Serijska *Alba* A. Berger je u analizama predstavljena jednom ispitivanom vrstom, *S. album*, odnosno dva infraspecijska oblika: *S. album* subsp. *album* (vaučer broj 11976), *S. album* subsp. *micranthum* (DC.) Syme. (vaučer broj 11977).

*Epikutikularni vosak.* Prisustvo triterpena nije detektovano u uzorcima. *n*-Alkani sa neparnim brojem C-atoma su dominantno prisutni, C<sub>29</sub> ( $\bar{X}$ =18,65±3,61; min=14,36; max=23,78), C<sub>31</sub> ( $\bar{X}$ =47,19±5,75; min=42,67; max=56,55) i C<sub>33</sub> ( $\bar{X}$ =21,18±4,47; min=14,82; max=25,28).

*Metanolni ekstrakt.* Najzastupljenije komponente su II ( $\bar{X}=16,55\pm 9,54$ ; min=7,52; max=28,86), VIII ( $\bar{X}=12,07\pm 3,04$ ; min=9,41; max=16,45) i X ( $\bar{X}=6,84\pm 4,78$ ; min=3,72; max=13,96).

#### **Sedum ser. Dasyphylla 't Hart**

Serijska *Dasyphylla* 't Hart je u analizama predstavljena jednom ispitivanom vrstom, *S. dasyphyllum* L. subsp. *dasyphyllum* (vaučer broj 11922).

*Epikutikularni vosak.* Oleanska serija je dominantno prisutna u voskovima ( $\bar{X}=53,50\pm 13,28$ ; min=36,44; max=66,93); slede *n*-alkani C<sub>31</sub> ( $\bar{X}=25,58\pm 10,21$ ; min=15,37; max=43,17) i C<sub>33</sub> ( $\bar{X}=9,89\pm 4,49$ ; min=4,64; max=15,95).

*Metanolni ekstrakt.* Najzastupljenije komponente metanolnih ekstrakata su II ( $\bar{X}=15,25\pm 1,32$ ; min=13,05; max=16,48), III ( $\bar{X}=7,19\pm 2,65$ ; min=4,64; max=11,68) i XIII ( $\bar{X}=8,34\pm 3,25$ ; min=3,95; max=11,51).

#### **Sedum ser. Glauco-rubens Fröd.**

Serijska *Glauco-rubens* Fröd. je u analizama predstavljena jednom ispitivanom vrstom, *S. hispanicum* L., zastupljenu tipskim oblikom (vaučer broj 7333) i varijetetom *S. hispanicum* var. *minus* (vaučer broj 11923).

*Epikutikularni vosak.* Oleanska serija je dominantna ( $\bar{X}=46,64\pm 19,62$ ; min=1,77; max=67,51); detektovana je i lupanska serija, ali u daleko manjem procentu. Od *n*-alkana su C<sub>31</sub> ( $\bar{X}=9,42\pm 3,37$ ; min=3,79; max=15,86) i C<sub>33</sub> ( $\bar{X}=26,35\pm 13,31$ ; min=15,01; max=56,28) prisutni u najvećem procentu.

*Metanolni ekstrakt.* Najzastupljenije komponente su I ( $\bar{X}=10,83\pm 13,49$ ; min=0,00; max=32,10), II ( $\bar{X}=13,48\pm 10,89$ ; min=0,00; max=29,15) i IX ( $\bar{X}=6,27\pm 5,67$ ; min=0,00; max=11,13).

#### **Sedum ser. Rubra Boriss.**

Serijska *Rubra* Boriss. je u analizama predstavljena jednom ispitivanom vrstom, *S. caespitosum* (Cav.) DC (vaučer broj 7335).

*Epikutikularni vosak.* Triterpeni nisu prisutni u vosku. Dominantno su prisutni *n*-alkani C<sub>29</sub> ( $\bar{X}=26,92\pm 10,87$ ; min=19,23; max=34,60), C<sub>31</sub> ( $\bar{X}=31,86\pm 17,83$ ; min=19,25; max=44,47) i C<sub>33</sub> ( $\bar{X}=8,71\pm 2,04$ ; min=7,27; max=10,15).

**Sedum ser. Rupestria A. Berger**

Serijska *Rupestria* A. Berger je u analizama predstavljena sa tri ispitivana taksona: *S. ochroleucum* Chaix (vaučer broj 7352); *S. rupestre* L. subsp. *rupestre* (vaučer broj 7325); *S. amplexicaule* DC. subsp. *tenuifolium* (Sm.) Greuter. (vaučer broj 7337)

*Epikutikularni vosak.* Pored dominantnih *n*-alkana sa neparnim brojem C-atoma, C<sub>29</sub> ( $\bar{X}=5.86\pm 8.18$ ; min=0,01; max=19,41), C<sub>31</sub> ( $\bar{X}=11,25\pm 4,32$ ; min=2,90; max=18,00), C<sub>33</sub> ( $\bar{X}=41,44\pm 9,81$ ; min=28,69; max=62,81) i C<sub>35</sub> ( $\bar{X}=6,57\pm 4,87$ ; min=0,00; max=13,94), u vosku je registrovan i relativno visok sadržaj triterpena iz oleanske ( $\bar{X}=12,22\pm 21,01$ ; min=0,00; max=61,01) i tarakseranske ( $\bar{X}=12,58\pm 16,34$ ; min=0,00; max=46,72) serije.

*Metanolni ekstrakt.* Najzastupljenije komponente su II ( $\bar{X}=18,42\pm 13,89$ ; min=4,55; max=43,70), III ( $\bar{X}=6,69\pm 3,60$ ; min=3,41; max=12,25), V ( $\bar{X}=12,33\pm 19,39$ ; min=0,62; max=42,61) i XI ( $\bar{X}=9,20\pm 5,71$ ; min=1,65; max=17,13).

**Sedum ser. Sedella (Fourr.) 't Hart**

Serijska *Sedella* (Fourr.) 't Hart je u analizama predstavljena sa jednim taksonom, *S. atratum* L. subsp. *carinthiacum* (Pacher) D.A.Webb (vaučer broj 7342), koji je zastupljen samo jednim uzorkom.

*Epikutikularni vosak.* Dominantna komponenta u vosku je *n*-alkan C<sub>33</sub> ( $\bar{X}=79,04\pm 0,24$ ; min=78,77; max=79,20).

*Metanolni ekstrakt.* Komponente II ( $\bar{X}=12,23\pm 0,82$ ; min=12,14; max=12,30), III ( $\bar{X}=8,75\pm 0,10$ ; min=8,65; max=8,84), VII ( $\bar{X}=9,40\pm 0,42$ ; min=9,00; max=9,83) i XII ( $\bar{X}=7,02\pm 0,10$ ; min=6,91; max=7,10) dominiraju u metanolnom ekstraktu.

**Sedum ser. Stefcó 't Hart**

Serijska *Stefco* 't Hart je u analizama predstavljena jednom ispitivanom vrstom, *S. stefco* Stef. (vaučer broj 7353).

*Epikutikularni vosak.* *n*-Alkani C<sub>29</sub> ( $\bar{X}=19,34\pm 3,86$ ; min=16,85; max=23,78), C<sub>31</sub> ( $\bar{X}=57,28\pm 3,71$ ; min=55,12; max=61,56) i C<sub>33</sub> ( $\bar{X}=9,90\pm 0,07$ ; min=9,84; max=9,98) predstavljaju dominantne komponente voskova ispitivanih uzoraka. Prisustvo triterpena nije registrovano.

*Metanolni ekstrakt.* VI ( $\bar{X}=11,76\pm 0,79$ ; min=10,85; max=12,23) i XII ( $\bar{X}=22,98\pm 1,78$ ; min=21,05; max=24,54) su dominantne komponente metanolnih ekstrakata.

**Sedum ser. Cepaea (Koch) Fröd.**

Serijska *Cepaea* (Koch) Fröd. je u analizama predstavljena jednom ispitivanom vrstom, *S. cepaea* (vaučer broj 7350).

*Epikutikularni vosak.* Dominantne komponente epikutikularnih voskova su *n*-alkan C<sub>33</sub> ( $\bar{X}$ =39,31±9,48; min=32,61; max=46,01) i triterpeni oleanske serije ( $\bar{X}$ =24,49±5,88; min=20,33; max=28,65).

*Metanolni ekstrakt.* Dominantne komponente ekstrakata su: II ( $\bar{X}$ =8,49±0,40; min=8,20; max=8,77), XI ( $\bar{X}$ =14,51±1,46; min=13,48; max=15,54), i XIV ( $\bar{X}$ =23,93±6,00; min=19,68; max=28,17).

**Sedum ser. Magellensia 't Hart**

Serijska *Magellensia* 't Hart je u analizama predstavljena sa jednim ispitivanim taksonom, *S. magellense* Ten. subsp. *olympicum* (Boiss.) Greuter & Burdet (vaučer broj 7341).

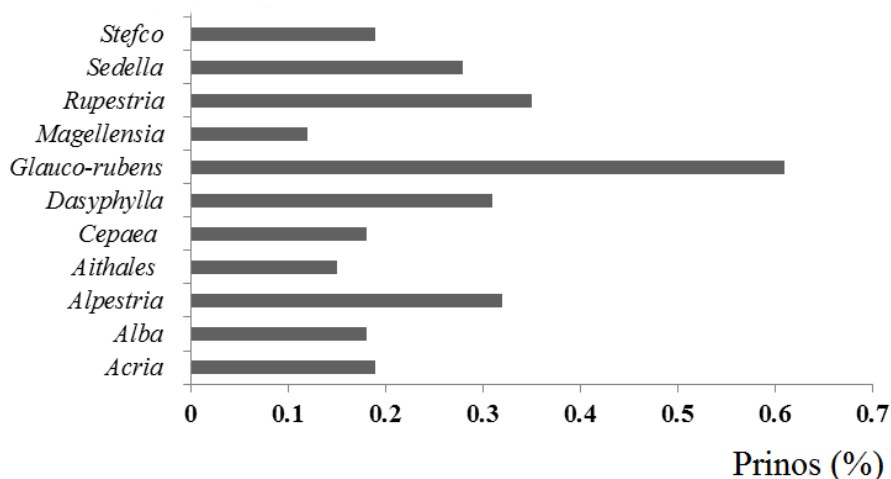
*Epikutikularni vosak.* Dominantne komponente epikutikularnog voska su *n*-alkani: C<sub>31</sub> ( $\bar{X}$ =15,29±0,11; min=15,17; max=15,39), C<sub>33</sub> ( $\bar{X}$ =57,37±0,75; min=56,59; max=58,08), kao i triterpeni oleanske serije ( $\bar{X}$ =12,50±0,06; min=12,46; max=12,57).

*Metanolni ekstrakt.* Dominantne komponente ekstrakta su: I ( $\bar{X}$ =17,34±0,28; min=17,09; max=17,64), VIII ( $\bar{X}$ =14,26±0,10; min=14,16; max=14,35), XI ( $\bar{X}$ =11,89±0,05; min=11,85; max=11,94) i XIV ( $\bar{X}$ =17,53±0,14; min=17,40; max=17,67).

#### 4.1.2. Prinos epikutikularnih voskova i zastupljenost ispitivanih klasa jedinjenja u epikutikularnim voskovima i metanolnim ekstraktima

Serije roda *Sedum* su okarakterisane i na osnovu ukupanih sadržaja *n*-alkana (C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub>), triterpenskih serija (oleanska, lupanska i tarakseranska serija) i komponenti metanolnog ekstrakta (iz opsega retencionih vremena  $\Delta R_t=15-20$  min. u kojem dominantno eluiraju heterozidi i aglikoni fenolnog tipa, tabela 8). Pomoću navedenih deskriptivnih parametara pregledno je predstavljen prinos epikutikularnih voskova i distribucija navedenih hemijskih karaktera (tabela 9).

Prinosi voskova predstavnika ispitivanih serija su se kretali u istom opsegu, zbog čega ovaj karakter nije razmatran i uvršten u grupu promenljivih za statističku analizu. Odnos prosečnih vrednosti prinosa je predstavljen pomoću histograma (slika 22). Na histogramskom prikazu se uočava da serija *Glauco-rubens* značajno odstupa u odnosu na ostale serije zbog najvećeg prinosa voska, dok se *Magellensia* karakteriše najnižim prinosom. Ono što je zanimljivo je činjenica da je prosečni prinos voska spoljnih grupa manji (<0,1 %) od prosečnog prinosa koji se odnosi na predstavnike roda *Sedum* (tabela 9).



Slika 22. Prosečni prinos epikutikularnih voskova na nivou serija roda *Sedum*

**Tabela 9.** Deskriptivni statistički pokazatelji varijabilnosti komponenti metanolnih ekstrakata, epikutikularnih voskova i prinosa voska; serije roda *Sedum* i taksoni spoljne grupe

SERIJA RODA <i>Sedum</i>	POLARNE KOMPONENTE Metanolni ekstrakt (%)				NEPOLARNE KOMPONENTE								PRINOS VOSKA (%)			
					<i>n</i> -Alkani (%)				Triterpeni (%)							
	$\bar{X}$	min	max	$\sigma$	$\bar{X}$	min	max	$\sigma$	$\bar{X}$	min	max	$\sigma$	$\bar{X}$	min	max	$\sigma$
<i>Acria</i>	23.77	18.00	33.80	8.72	<b>90.57</b>	82.88	97.34	7.27	1.86	0.00	5.57	3.22	0.19	0.16	0.23	0.04
<i>Alba</i>	8.48	7.10	12.10	2.54	<b>94.82</b>	93.65	97.54	1.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.09	0.25	0.07
<i>Alpestria</i>	26.11	4.90	48.20	12.66	<b>88.32</b>	65.09	95.42	7.72	0.88	0.00	7.73	2.00	0.32	0.08	0.98	0.06
<i>Aithales</i>	17.53	17.00	17.90	0.47	39.61	39.55	39.67	0.06	<b>52.21</b>	52.09	52.25	0.11	0.15	0.12	0.17	0.03
<i>Cepaea</i>	<b>61.05</b>	62.60	59.50	2.19	43.20	36.44	49.95	9.55	24.49	20.33	28.65	5.88	0.18	0.04	0.31	0.19
<i>Dasyphylla</i>	27.00	23.20	33.10	4.43	40.48	23.57	60.96	14.67	<b>51.13</b>	36.44	66.93	13.36	0.31	0.15	0.39	0.14
<i>Glauco-rubens</i>	17.02	8.80	27.40	6.99	33.83	19.92	44.61	10.05	<b>58.03</b>	47.05	70.65	11.56	0.61	0.12	2.37	0.98
<i>Magellensia</i>	34.77	34.60	35.11	0.29	<b>75.32</b>	74.55	76.05	0.75	12.50	12.46	12.57	0.06	0.12	0.11	0.13	0.01
<i>Rupestria</i>	24.68	21.10	43.70	7.87	<b>70.07</b>	34.68	98.51	18.10	22.69	0.53	50.54	19.06	0.35	0.12	0.98	0.23
<i>Sedella</i>	30.58	30.20	31.01	0.41	<b>87.02</b>	86.70	87.27	0.29	0.10	0.10	0.10	0.00	0.28	0.28	0.29	0.01
<i>Stefco</i>	36.43	29.10	40.30	6.35	<b>92.14</b>	87.81	94.69	3.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.15	0.23	0.04
<b>SPOLJNA GRUPA</b>																
<i>Echeveria</i>	3.26	3.10	3.43	0.17	5.50	5.48	5.52	0.02	<b>92.17</b>	91.09	93.17	1.04	0.08	0.07	0.08	0.00
<i>Crassula</i>	8.03	7.90	8.20	0.15	45.85	45.76	45.98	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.00
<i>Kalanchoe</i>	18.85	18.70	19.00	0.15	<b>65.48</b>	65.29	65.66	0.19	11.68	11.58	11.80	0.11	0.03	0.02	0.03	0.00

† $\bar{X}$  – srednja vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost;  $\sigma$  – standardna devijacija.

†Polarne komponente – ukupan sadržaj (%) polarnih jedinjenja metanolnih ekstrakata koje su eluirale u opsegu retencionih vremena 15-20 min, heterozidi i aglikoni fenolnog tipa.

†Ukupni sadržaji karaktera koje prelaze 50% su označene crveno.

## 4.2. Statistički značajni karakteri epikutikularnog voska i metanolnih ekstrakata predstavnika serija roda *Sedum* (ANOVA)

Testiranje statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima pojedinačnih karaktera vršeno je u okviru sledećih grupa: karakteri epikutikularnog voska (*n*-alkana C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub> i triterpenskih serija); karakteri metanolnog ekstrakta (I-XVI); karakteri voska i metanolnog ekstrakta zajedno i na osnovu ukupanih sadržaja *n*-alkana (C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub>), triterpenskih serija (oleanska, lupanska i tarakseranska serija) i komponenti metanolnog ekstrakta (iz opsega retencionih vremena  $\Delta R_t=15-20$  min.) kao karaktera. Rezultati testiranja dati su u tabelama (tabela 10. i tabela 11). Nivoi značajnosti i F vrednosti u odnosu na analizirane karaktere posmatrani su na nivou serija roda *Sedum*, odnosno serija pomenutog roda i taksona spoljne grupe.

a) U prvom slučaju, na osnovu *p* vrednosti, od 19 karaktera voska, 3 nisu značajna za diferenciranje ispitivanih grupa (tabela 11). Od svih statistički značajnih karaktera, 13 se odlikuje izuzetnom statističkom značajnošću  $p < 0,001$ , pri čemu se oleanska serija, sa najvišom F vrednošću ( $F_{(12,81)}=25,45$ ), izdvaja kao karakter sa najvećim doprinosom.

b) Kod metanolnih ekstrakata 4 od 16 karaktera nije statistički značajno (tabela 11). Osam karaktera se odlikuje izuzetnom statističkom značajnošću  $p < 0,001$ . Komponenta XIII je karakter sa najvećim doprinosom, tj. sa najvećom F vrednošću ( $F_{(10,58)}=78,39$ ).

c) Treći slučaj uključuje 35 karaktera (tabela 11). Na osnovu rezultata se može zaključiti da je komponenta metanolnog ekstrakta XIII najznačajnija za diferenciranje ispitivanih grupa. Izuzetna statistička značajnost je zabeležena kod 11 od 19 testiranih karaktera epikutikularnog voska i kod 8 od 16 karaktera metanolog ekstrakta.

d) Ukazujući na moguću primenljivost korišćenih karaktera u sagledavanju razlika u hemijskom sastavu analiziranih grupa, značajnost razlika u srednjim vrednostima je sagledana i na nivou manjeg broja karaktera. Pritom je analiza varijanse ANOVA izvršena na nivou tri grupe jedinjenja, nazglašavajući značaj grupe koja potencijalno ima najveći značaj u diferencijaciji taksona. U smislu karaktera uključenih u analizu odabrane su tri promenljive: ukupan sadržaj *n*-alkana (A), triterpenskih serija (T) i komponenti metanolnog ekstrakta za odabrani opseg retencionih vremena (15-20 min) (M). Na taj način je veliki broj karaktera iz predhodnih analiza sveden na minimalnu meru. Rezultati ove analize su prikazani u tabeli 10. Iz priloženog se vidi da su sva tri karaktera (promenljive) odlikuju izuzetno visokom

statističkom značajnošću u razlikovanju gupa taksona,  $p < 0,001$  (\*\*\*) , među kojima se naročito izdvaja ukupni sadržaj triterpena sa najvećom F ( $F_{(10,58)}=36,23$ ) vrednošću, sledi ukupni sadržaj *n*-alkana i, na posletku, ukupni sadržaj komponenti metanolnog ekstrakta.

**Tabela 10.** Rezultati analize varijanse (ANOVA) na osnovu ukupnih sadržaja *n*-alkana (A), triterpena (T) i komponenti metanolnog ekstrakta (M) kao karaktera; nivo serija roda *Sedum*

Variable	F <sub>(10,58)</sub>	p
M	5.21	***
A	21.05	***
T	36.23	***



**Tabela 11.** Rezultati analize varijanse (ANOVA) ispitivanih karaktera epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata; serije roda *Sedum*

Karakteristi epikutikularnog voska			Karakteristi metanolnog ekstrakta			Karakteristi epikutikularnog voska i metanolnog ekstrakta, kumulativno					
Varijable	F <sub>(12,81)</sub>	<i>p</i>	Varijable	F <sub>(10,58)</sub>	<i>p</i>	Varijable	F <sub>(11,58)</sub>	<i>p</i>	Varijable	F <sub>(11,58)</sub>	<i>p</i>
C <sub>20</sub>	1.67		I	5.19	***	C <sub>20</sub>	2.47	*	I	5.19	***
C <sub>21</sub>	1.44		II	3.70	**	C <sub>21</sub>	2.06	*	II	3.70	**
C <sub>22</sub>	1.11		III	4.22	***	C <sub>22</sub>	1.53		III	4.22	***
C <sub>23</sub>	2.15	*	IV	1.36		C <sub>23</sub>	2.46	*	IV	1.36	
C <sub>24</sub>	2.52	**	V	1.55		C <sub>24</sub>	3.05	**	V	1.55	
C <sub>25</sub>	3.73	***	VI	8.49	***	C <sub>25</sub>	3.46	**	VI	8.49	***
C <sub>26</sub>	2.25	*	VII	3.79	**	C <sub>26</sub>	2.27	*	VII	3.79	**
C <sub>27</sub>	12.79	***	VIII	4.28	***	C <sub>27</sub>	7.78	***	VIII	4.28	***
C <sub>28</sub>	8.92	***	IX	3.37	**	C <sub>28</sub>	5.81	***	IX	3.37	**
C <sub>29</sub>	8.06	***	X	2.35	*	C <sub>29</sub>	6.12	***	X	2.35	*
C <sub>30</sub>	14.39	***	XI	4.19	***	C <sub>30</sub>	13.34	***	XI	4.19	***
C <sub>31</sub>	15.06	***	XII	11.81	***	C <sub>31</sub>	13.29	***	XII	11.81	***
C <sub>32</sub>	5.72	***	XIII	<b>78.39</b>	***	C <sub>32</sub>	5.73	***	XIII	<b>78.39</b>	***
C <sub>33</sub>	16.20	***	XIV	13.79	***	C <sub>33</sub>	22.29	***	XIV	13.79	***
C <sub>34</sub>	5.42	***	XV	1.45		C <sub>34</sub>	5.52	***	XV	1.45	
C <sub>35</sub>	8.01	***	XVI	1.82		C <sub>35</sub>	8.31	***	XVI	1.82	
<b>Oleani</b>	<b>25.45</b>	***				<b>Oleani</b>	22.01	***			
<b>Lupani</b>	18.30	***				<b>Lupani</b>	18.35	***			
<b>Tarakserani</b>	3.81	***				<b>Tarakserani</b>	2.50	*			

†Varijable od C<sub>20</sub> do C<sub>35</sub> označavaju *n*-alkani sa navedenim brojem C atoma; varijable od I do XVI označavaju komponente metanolnog ekstrakta (tabela 8).

†*p* – Statistička značajnost ili nivo značajnosti.

†Nivoi (redosled) statističke značajnosti: *p*>0.05 ne postoje značajne razlike; \**p*<0.05 postoje značajne statističke razlike; \*\**p*<0.01 razlike su statistički visoko značajne;

\*\*\**p*<0.001 razlike su statistički izuzetno značajne.

†F – količnik; F<sub>(G-1,n)</sub>, G-1 – stepeni slobode, n – broj ponovaka.

### 4.3. Multivarijantne tehnike analize podataka

Ispitivanje varijabilnosti hemijskog sastava i mogućnosti diferencijacije serija roda *Sedum* na osnovu sadržaja *n*-alkana i triterpenskih serija u epikutikularnim voskovima i komponenti metanolnih ekstraktata analiziranih taksona je izvršeno korišćenjem sledećih multivarijantnih tehnika: analiza glavnih komponenti (PCA), kanonijska diskriminantna analiza (CDA) i klaster analiza (AHC). Primenom navedenih metoda ispitano je kako se predstavnici serija međusobno odnose i da li/kako uvođenje spoljnih grupa utiče na njihovo grupisanje i varijabilnost.

Korespondentna analiza (CA), sa druge strane, pripada grupi multivarijantnih statističkih tehnika koje ukazuju na nivo asociranosti između razmatranih elemenata. U ovom slučaju je korišćena kako bi se razmotrila povezanost između pojedinih kvalitativnih osobina kao što je boja površine lista i sastava epikutikularnih voskova. Drugim rečima, cilj je bio da se testira da li, i na koji način, prisustvo ili odsustvo pojedinih grupa jedinjenja u voskovima utiče na stanje površine lista kod ispitivanih taksona. Rezultati analize bi potencijalno mogli da pruže dodatne dokaze o diferenciranosti taksona.

#### 4.3.1. Analiza glavnih komponenti (PCA)

##### 4.3.1.1. Analiza glavnih komponenti – nivo serija roda *Sedum*

###### A) Obrazac varijabilnosti *n*-alkana i triterpena u epikutikularnim voskovima

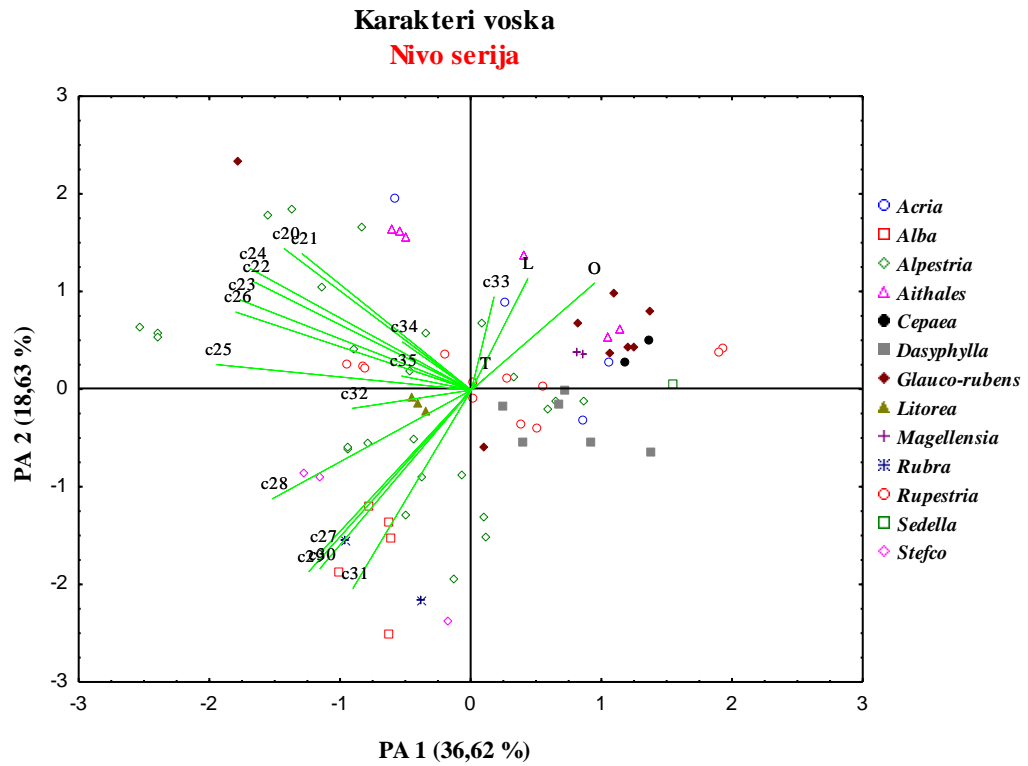
Formiranju prve ose analize glavnih komponenti (PA1) najviše su doprineli *n*-alkani C<sub>22</sub>-C<sub>26</sub> i C<sub>28</sub>, dok u formiranju druge ose (PA2) najveći doprinos ostvaruje C<sub>31</sub> (boldovane vrednosti u tabeli 12). Prve dve ose objašnjavaju više od 50 % ukupne varijabilnosti uzorka obuhvaćenog analizom, 55,25 % (slika 23; tabela 12-1).

Varijabilnost procentualnog sastava pomenutih komponenti utiče na grupisanje uzoraka roda *Sedum*. U odnosu na prvu osu, mali broj elemenata se jasno diferencirao, tj. izdvojio u odnosu na većinu. Najveća varijabilnost je uočena kod vrsta serija *Alpestria* i *Rupestria*. Zbog povećanog sadržaja izdvojenih nižih alkana nekoliko predstavnika serije *Alpestria* se izdvojilo u negativnom delu prve ose, ne samo u odnosu na predstavnike drugih serija već i u odnosu na predstavnike serije kojoj i sami pripadaju. Na isti način se može

okarakterisati i serija *Rupestria*, čiji su predstavnici takoreći „rasuti“ po dijagramu, ali se dva predstavnika odvajaju u pozitivnom delu prve ose, kod kojih je sadržaj pomenutih nižih *n*-alkana ispod granice detekcije. Serije *Dasyphylla* i *Sedella* se takođe karakterišu izostankom navedenih nižih *n*-alkana i nalaze se u pozitivnom delu prve ose.

Diferenciranje taksona u odnosu na drugu osu, čijem formiranju najviše doprinosi sadržaj  $C_{31}$  je vrlo slično. Naime, većina predstavnika ispitivanih serija je blisko raspoređena u blizini koordinatnog početka. U negativnom delu ose su se izdvojile serije sa dominantnim sadržajem pomenutog *n*-alkana: *Alba*, *Rubra* i *Stefco*. Idući ka pozitivnim vrednostima druge ose, raspored i grupisanje taksona prati opadanje sadržaja alkana.

Ukoliko se sagleda grupisanje taksona u odnosu na vektore svojstava značajnih u formiranju prve dve ose, uočava se da pozicije taksona iz serija *Alba*, *Rubra* i *Stefco* blisko grupišu uz vektor svojstva  $C_{31}$ . Dato svojstvo je snažno negativno korelisano sa sadržajem triterpenskih serija, a u manjoj meri i sa sadržajem *n*-alkana  $C_{33}$ . U blizini vektora svojstava koji se odnose na niže alakane raspoređeni su neki od predstavnika serija *Alpestria*, *Rupestria*, *Glauco-rubens* i *Aithales*. Svojstvo  $C_{31}$  je sa svojstvom  $C_{28}$  u velikoj meri pozitivno korelisano, dok je korelacija (zbog ugla između vektora koji se približava vrednosti  $90^{\circ}$ ) sa ostalim nižim *n*-alkanima slaba. Slaba korelacija se opaža između svojstava  $C_{33}$  i triterpenskih serija (na slici označeni kao O, T, L) i većine nižih *n*-alkana, dok je korelacija, iako negativna, veća sa svojstvima  $C_{28}$ - $C_{31}$ .



**Slika 23.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* u odnosu na glavne vektore u prostoru I i II ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova

**Tabela 12.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na tri glavne ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova

Varijabla	PA1	PA2	PA3
C <sub>20</sub>	-0.70	0.53	0.19
C <sub>21</sub>	-0.63	0.50	0.24
C <sub>22</sub>	<b>-0.81</b>	0.40	0.22
C <sub>23</sub>	<b>-0.86</b>	0.34	-0.02
C <sub>24</sub>	<b>-0.82</b>	0.45	0.00
C <sub>25</sub>	<b>-0.95</b>	0.09	0.08
C <sub>26</sub>	<b>-0.88</b>	0.29	0.13
C <sub>27</sub>	-0.56	-0.60	0.00
C <sub>28</sub>	<b>-0.74</b>	-0.40	0.06
C <sub>29</sub>	-0.61	-0.67	0.18
C <sub>30</sub>	-0.56	-0.66	0.21
C <sub>31</sub>	-0.44	<b>-0.74</b>	0.11
C <sub>32</sub>	-0.44	-0.07	-0.52
C <sub>33</sub>	0.08	0.34	<b>-0.74</b>
C <sub>34</sub>	-0.26	0.18	<b>-0.82</b>
C <sub>35</sub>	-0.26	0.05	<b>-0.79</b>
<b>Oleani</b>	0.46	0.40	0.64
<b>Lupani</b>	0.21	0.41	0.46
<b>Tarakserani</b>	0.05	0.04	-0.48
Expl.Var	6.96	3.54	3.23
Prp.Totl	0.37	0.19	0.17

†Expl.Var – varijabilnost za svaki faktor.  
†Prp.Totl – ukupna objašnjena varijabilnost datog sistema.

**Tabela 12-1.** Vrednosti karakterističnih vektora i procenti varijabilnosti za prve tri ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova

Osa	Eigenvalue	Cumulative Eigenvalue	Cumulative (%)
1	6.96	6.96	36.62
2	3.54	10.50	<b>55.25</b>
3	3.23	13.73	72.25

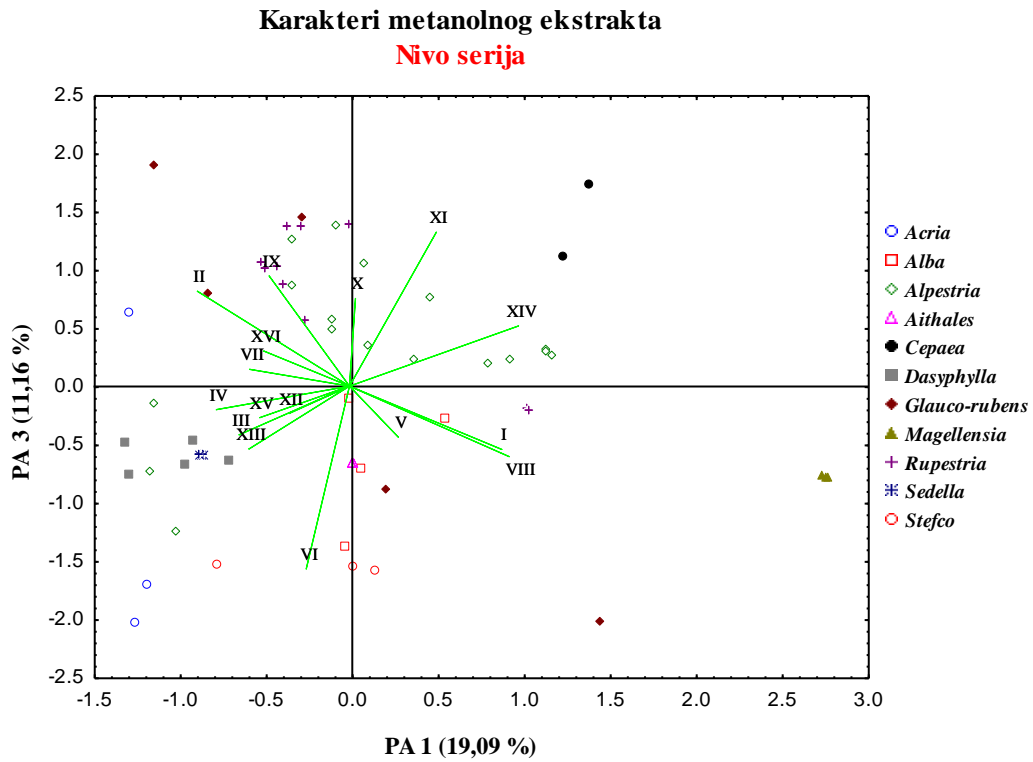
†Eigenvalue – karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative Eigenvalue – kumulativne karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative % – procenat totalne varijabilnosti koji objašnjava svaka od osa.

B) Obrazac varijabilnosti komponenti metanolnih ekstrakata

Na slici 24 je prikazan raspored serija roda *Sedum* kada se kao karakter za definisanje njihove varijabilnosti koristi procentualni sadržaj odabranih komponenta metanolnih ekstrakata. U analizi je razmatran procenat opterećenja prve tri ose koje u najvećoj meri opisuju varijabilnost uzorka, a čija kumulativna vrednost varijabilnosti iznosi 43,72% (tabela 13-1).

Na dijagramu, koji formiraju prva i treća osa, objašnjeno je 30,25 % ukupne varijabilnosti (tabela 13 i tabela 13-1). Mada je komponenta XIV softverski označena kao najznačajnija za formiranje prve ose, komponente I, II i VIII su svojim apsolutnim vrednostima bliske istoj (tabela 13). Formiranju treće ose najviše je doprinela komponenta VI (apsolutna vrednost bliska sa XI). U odnosu na prvu osu (PA1) se, u skladu sa pozicijom koju zauzimaju na grafikonu, mogu razlikovati tri manje ili više izdvojene grupe uzoraka. U negativnom delu prve ose se izdvajaju serija *Dasyphylla*, *Acria* i *Sedella*, kao i deo uzoraka serije *Rupestria*, pri čemu su uzorci serije *Dasyphylla* prikazani kao najkompaktnija grupa. U pravcu pozitivne zone iste ose, bliže koordinativnom početku, grupišu se predstavnici serija *Alpestrina*, *Aithales*, *Stefco*, *Alba*, *Cepaea*, kao i deo predstavnika serije *Rupestria*. Pored predstavnika serija *Rupestria* i *Alpestrina*, i predstavnici serije *Glauco-rubens* su međusobno udaljeni na dijagramu. Najjdistanciranija serija jeste *Magellensia*, koja se jasno izdvaja u pozitivnom delu prve ose. Ukoliko se pozicija taksona posmatra u odnosu na treću osu, ne opaža se jasno izdvajanje grupa taksona u odnosu na oblik varijabilnost fenolnih komponenti.

Analizirana svojstva su u različitoj meri međusobno korelisana. Vektori koji opisuju svojstva I i VIII, osim što su međusobno gotovo preklapljeni, stoje u snažnoj pozitivnoj vezi sa svojstvom XIV, dok su negativno korelisana sa svojstvom II. Sa druge strane, svojstvo II je u slaboj korelaciji sa svojstvom XIV. Uzorci serije *Cepaea* se na grafikonu odlikuju pozicijom koja je definisana visokim sadržajem komponente XIV, dok se oni koji pripadaju seriji *Dasyphylla* grupšu u suprotnom smeru upravo zbog niskog sadržaja pomenute komponente. Serija *Magellensia* se karakteriše povećanim sadržajem komponenti I i VIII, nešto nižim sadržajem XIV u odnosu na seriju *Cepaea*, i izostankom komponente II.



**Slika 24.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* u odnosu na glavne vektore u prostoru prve i treće ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri metanolnih ekstrakata

**Tabela 13.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na tri glavne ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri metanolnih ekstrakata

<b>Varijable</b>	<b>PA1</b>	<b>PA2</b>	<b>PA3</b>
<b>I</b>	0.61	-0.13	-0.25
<b>II</b>	-0.61	0.52	0.38
<b>III</b>	-0.45	0.50	-0.20
<b>IV</b>	-0.54	0.32	-0.09
<b>V</b>	0.20	0.41	-0.20
<b>VI</b>	-0.17	-0.24	<b>-0.73</b>
<b>VII</b>	-0.40	-0.34	0.07
<b>VIII</b>	0.64	-0.18	-0.28
<b>IX</b>	-0.32	-0.46	0.44
<b>X</b>	0.02	-0.35	0.35
<b>XI</b>	0.35	0.00	0.62
<b>XII</b>	-0.25	-0.60	-0.11
<b>XIII</b>	-0.41	-0.15	-0.25
<b>XIV</b>	<b>0.68</b>	-0.04	0.24
<b>XV</b>	-0.36	-0.52	-0.13
<b>XVI</b>	-0.35	-0.39	0.14
Expl.Var	3.05	2.16	1.79
Prp.Totl	0.19	0.13	0.11

†Expl.Var – varijabilnost za svaki komponentu/faktor.  
†Prp.Totl – ukupna objašnjena varijabilnost datog sistema.

**Tabela 13-1.** Vrednosti karakterističnih vektora i procenti varijabilnosti za prve tri ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri metanolnih ekstrakata

<b>Osa</b>	<b>Eigenvalue</b>	<b>Cumulative Eigenvalue</b>	<b>Cumulative (%)</b>
1	3.05	3.05	19.09
2	2.16	5.21	32.56
3	1.79	6.99	<b>43.72</b>

†Eigenvalue – karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative Eigenvalue – kumulativne karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative % – procenat totalne varijabilnosti koji objašnjava svaka od osa.

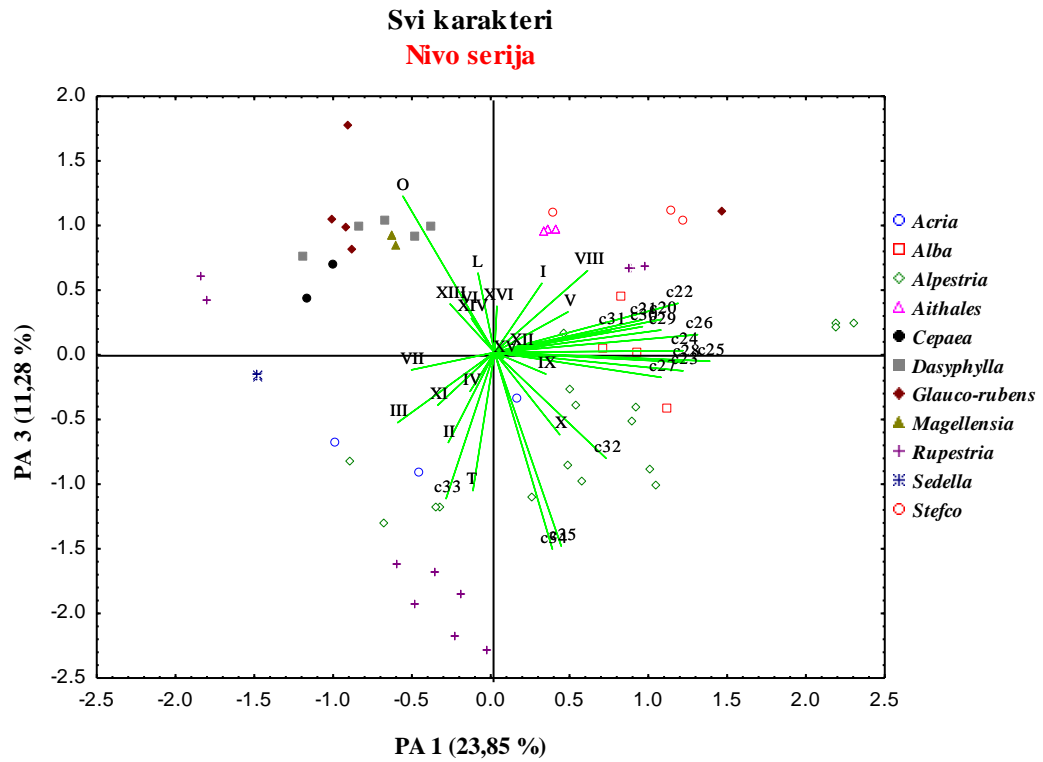


C) Komparativni prikaz varijabilnosti karaktera epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata

Na dijagramu koji formiraju prva i treća osa (slika 25) objašnjeno je 33,15 % ukupne varijabilnosti epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, posmatranih zajedno. Iako su u matricu uvršteni svi podaci, komponente epikutikularnih voskova pokazuju najveći doprinos u procesu formiranja osa analize glavnih komponenti; po visokim koeficijentima se izdvajaju komponente  $C_{20}$  i  $C_{22}$ - $C_{29}$  u slučaju PA1, odnosno komponente  $C_{33}$  i  $C_{34}$  koje svojim visokim koeficijentima u najvežoj meri doprinose opterećenju PA3 (tabela 14 i tabela 14-1).

Ukoliko se posmatra razdvajanje po prvoj osi, u njenom negativnom delu se izdvajaju uzorci serije *Sedella* i deo predstavnika serije *Rupestria* (izostanak *n*-alkana  $C_{20}$  i  $C_{22}$ - $C_{29}$ ), dok se u pozitivnom delu izdvojio deo predstavnika serije *Alpestria* (povećan sadržaj *n*-alkana  $C_{20}$  i  $C_{22}$ - $C_{29}$ ). U negativnom delu treće ose jasno se izdvojila grupa od šest predstavnika serije *Rupestria*, grupisana u oblasti koju, pored ostalog, definiše i povećan sadržaj *n*-alkana  $C_{33}$  i  $C_{34}$ . Ipak, neophodno je naglasiti da se poslednja grupa koja obuhvata glavni deo serije *Rupestria*, u poređenju sa ostalim uzorcima, svakako ne karakteriše najvećim sadržajem pomenutih *n*-alkana.

Izdvojena svojstva su međusobno u visokoj meri pozitivno korelisana. Naime, vektori  $C_{20}$  *n*-alkana i grupe *n*-alkana  $C_{22}$ - $C_{29}$  međusobno zaklapaju oštar ugao, ukazujući na sličnost u intenzitetu i pravcu njihove međusobne povezanosti; na sličan način je na grafikonu opisan odnos vektora *n*-alkana  $C_{33}$  i  $C_{34}$ . Između ovde dve grupe svojstava korelacija je slaba.



**Slika 25.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* u odnosu na glavne vektore u prostoru I i III ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

**Tabela 14.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na tri glavne ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

<b>Varijable</b>	<b>PA1</b>	<b>PA2</b>	<b>PA3</b>
<b>C<sub>20</sub></b>	<b>0.72</b>	-0.48	0.14
<b>C<sub>21</sub></b>	0.64	-0.53	0.14
<b>C<sub>22</sub></b>	<b>0.79</b>	-0.41	0.21
<b>C<sub>23</sub></b>	<b>0.81</b>	-0.48	-0.08
<b>C<sub>24</sub></b>	<b>0.81</b>	-0.50	0.01
<b>C<sub>25</sub></b>	<b>0.93</b>	-0.22	-0.04
<b>C<sub>26</sub></b>	<b>0.87</b>	-0.29	0.08
<b>C<sub>27</sub></b>	<b>0.72</b>	0.50	-0.11
<b>C<sub>28</sub></b>	<b>0.82</b>	0.38	-0.04
<b>C<sub>29</sub></b>	<b>0.72</b>	0.55	0.10
<b>C<sub>30</sub></b>	0.64	0.67	0.11
<b>C<sub>31</sub></b>	0.50	0.69	0.10
<b>C<sub>32</sub></b>	0.48	0.22	-0.46
<b>C<sub>33</sub></b>	-0.21	-0.37	<b>-0.63</b>
<b>C<sub>34</sub></b>	0.25	-0.19	<b>-0.85</b>
<b>C<sub>35</sub></b>	0.29	-0.01	-0.84
<b>Oleani</b>	-0.39	-0.25	0.67
<b>Lupani</b>	-0.07	-0.31	0.34
<b>Tarakserani</b>	-0.09	-0.07	-0.60
<b>I</b>	0.20	-0.40	0.30
<b>II</b>	-0.20	-0.09	-0.39
<b>III</b>	-0.42	-0.29	-0.30
<b>IV</b>	-0.11	0.13	-0.17
<b>V</b>	0.32	-0.05	0.18
<b>VI</b>	-0.12	0.19	0.19
<b>VII</b>	-0.36	0.35	-0.08
<b>VIII</b>	0.40	0.00	0.35
<b>IX</b>	0.22	0.13	-0.09
<b>X</b>	0.28	0.38	-0.36
<b>XI</b>	-0.24	-0.46	-0.23
<b>XII</b>	0.11	0.32	0.01
<b>XIII</b>	-0.19	0.30	0.21
<b>XIV</b>	-0.10	-0.25	0.15
<b>XV</b>	0.04	0.44	-0.02
<b>XVI</b>	0.01	0.27	0.20
Expl.Var	8.35	4.62	3.95
Prp.Totl	0.24	0.13	0.11

†Expl.Var – varijabilnost za svaki faktor.  
†Prp.Totl – ukupna objašnjena varijabilnost datog sistema.

**Tabela 14-1.** Vrednosti karakterističnih vektora i procenti varijabilnosti za prve tri ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

<b>Osa</b>	<b>Eigenvalue</b>	<b>Cumulative Eigenvalue</b>	<b>Cumulative (%)</b>
1	8.35	8.35	23.85
2	4.62	12.97	37.06
3	3.95	16.92	<b>48.33</b>

†Eigenvalue – svojstvene vrednosti faktora.

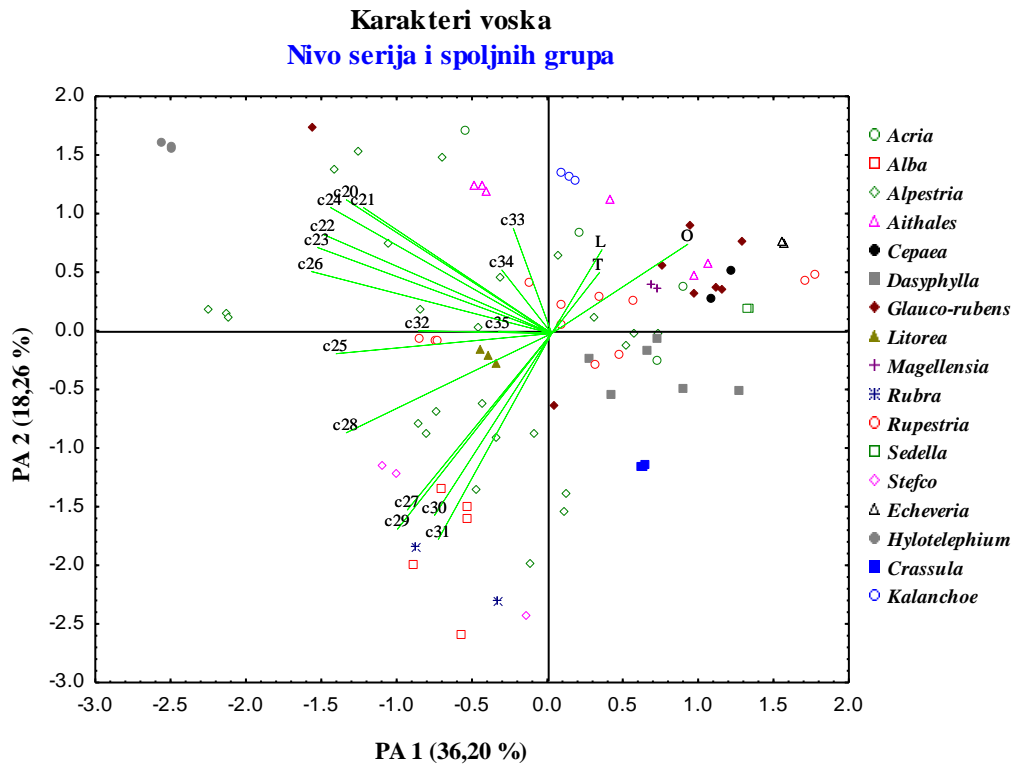
†Cumulative Eigenvalue – kumulativne svojstvene vrednosti faktora.

†Cumulative % – procenat totalne varijabilnosti koji objašnjava svaka od osa.

4.3.1.2. Analiza glavnih komponenti – nivo serija roda *Sedum* i spoljne grupa taksonaA) Obrazac varijabilnosti *n*-alkana i triterpena u epikutikularnim voskovima

U poređenju sa prethodnom analizom, u kojoj nisu razmatrani odnosi serija roda *Sedum* sa drugim taksonima familije Crassulaceae, u ovom slučaju formiranju prve dve ose su najviše doprinele *n*-alkani C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub>-C<sub>26</sub> i C<sub>28</sub> (PA1) i C<sub>29</sub> i C<sub>31</sub> (PA2), čije su apsolutne vrednosti naglašene u tabeli 15. Prve dve ose objašnjavaju više od polovine slučajeva varijabilnosti, noseći 54,82 % ukupne varijabilnosti uzorka (tabela 15-1).

Pozicije uzoraka koje pripadaju različitim serijama roda *Sedum* na grafikonu se suštinski nisu promenile (slika 26), osim što su vektori koji opisuju analizirana svojstva, korelisani na drugačiji način. U ovom slučaju se smanjuje stepen korelacije između svojstva C<sub>33</sub> i svojstava C<sub>29</sub> i C<sub>31</sub>, dok je povezanost sa nižim *n*-alkanima u porastu. *n*-Alkani C<sub>29</sub> i C<sub>31</sub> se i dalje javljaju kao međusobno snažno pozitivno povezana svojstva, koja su sa druge strane izrazito negativno korelisana sa triterpenskim serijama (O, L i T). Uzorci spoljnih grupa su najvećim delom dislocirani u odnosu na glavninu uzorka koju čine serije roda *Sedum*, ili su u izvesnim slučajevima, manje ili više bliski sa pojedinim serijama. Na nivou gupe taksona koji čine spoljnu grupu u analizi, *Hylotelephium* se u najvećoj meri diferencira u odnosu na sve ostale ispitivane uzorke. Izdvajanje uzoraka koji pripadaju pomenutom rodu izvršeno je u odnosu na prvu osu, a verovatno predstavlja posledicu povećanog sadržaja nižih *n*-alkana (oblast povećanog sadržaja C<sub>21</sub>-C<sub>26</sub>). U pozitivnom delu iste ose su raspoređeni i uzorci roda *Echeveria*, koji se sa jedne strane odlikuju visokim sadržajem triterpenskih serija (oko 90 %), a sa druge strane vrlo niskim sadržajem svih *n*-alkana. Uzorci roda *Crassula* se izdvajaju u odnosu na drugu osu, zajedno sa serijama *Alba*, *Rubra* i *Stefco*. Takav oblik grupisanja u najvećoj meri je definisan povećanim sadržajem *n*-alkana C<sub>29</sub> i C<sub>31</sub> i smanjenim sadržajem *n*-alkana C<sub>33</sub>, odnosno odsustvo m triterpenskih serija iz voska u odnosu na sve ostale ispitivane uzorke. Uzorci kojima su analizi predstavljeni rodovi *Kalanchoe* i *Hylotelephium* su na grafikonu izdvojeni u pozitivnom delu PA2, pri čemu *Kalanchoe* odlikuje značajan sadržaj tarakseranske serije i izuzetno visok sadržaj C<sub>33</sub> *n*-alkana, odnosno bliža pozicija sa većinom predstavnika roda *Sedum*. *Hylotelephium* se karakteriše visokim sadržajem C<sub>31</sub> i izostankom triterpena u vosku.



**Slika 26.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* i taksona spoljne grupe u odnosu na glavne vektore u prostoru I i II ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova

**Tabela 15.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na tri glavne ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova

<b>Varijable</b>	<b>PA1</b>	<b>PA2</b>	<b>PA3</b>
C <sub>20</sub>	<b>-0.76</b>	0.49	-0.14
C <sub>21</sub>	-0.70	0.46	-0.24
C <sub>22</sub>	<b>-0.85</b>	0.37	-0.24
C <sub>23</sub>	<b>-0.87</b>	0.32	-0.08
C <sub>24</sub>	<b>-0.82</b>	0.47	-0.02
C <sub>25</sub>	<b>-0.80</b>	-0.08	-0.25
C <sub>26</sub>	<b>-0.89</b>	0.23	-0.18
C <sub>27</sub>	-0.54	-0.65	0.02
C <sub>28</sub>	<b>-0.76</b>	-0.37	-0.02
C <sub>29</sub>	-0.57	<b>-0.72</b>	-0.08
C <sub>30</sub>	-0.43	-0.67	0.04
C <sub>31</sub>	-0.42	<b>-0.76</b>	-0.07
C <sub>32</sub>	-0.50	0.01	0.56
C <sub>33</sub>	-0.14	0.39	0.69
C <sub>34</sub>	-0.18	0.23	<b>0.83</b>
C <sub>35</sub>	-0.20	0.01	<b>0.80</b>
<b>Oleani</b>	0.50	0.33	-0.57
<b>Lupani</b>	0.19	0.31	-0.39
<b>Tarakserani</b>	0.18	0.22	0.39
Expl.Var	6.88	3.54	3.00
Prp.Totl	0.36	0.19	0.16

†Expl.Var – varijabilnost za svaki faktor.  
†Prp.Totl – ukupna objašnjena varijabilnost datog sistema.

**Tabela 15-1.** Vrednosti karakterističnih vektora i procenti varijabilnosti za prve tri ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova

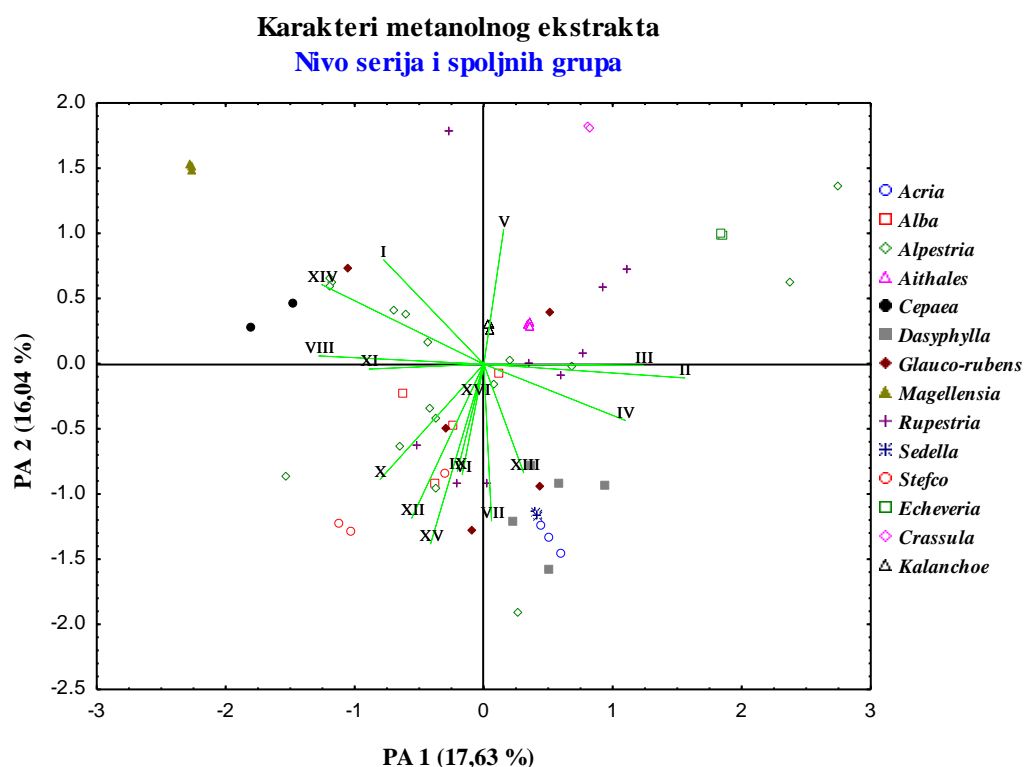
<b>Osa</b>	<b>Eigenvalue</b>	<b>Cumulative Eigenvalue</b>	<b>Cumulative (%)</b>
1	6.88	36.20	36.20
2	3.54	18.62	<b>54.82</b>
3	3.00	15.81	70.63

†Eigenvalue – karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative Eigenvalue – karakteristične svojstvene vrednosti faktora.  
†Cumulative % – procenat totalne varijabilnosti koji objašnjava svaka od osa.

## B) Obrazac varijabilnosti komponenti metanolnih ekstrakata

U ovoj analizi prve dve ose koje objašnjavaju 33,66 % ukupne varijabilnosti (tabela 16-1). Najveći doprinos za formiranje prve dve ose dodeljen je komponentama II (PA1) i XV (PA2), koje se karakterišu najvećim apsolutnim vrednostima (tabela 16).

Uvođenjem vrsta iz drugih rodova familije Crassulaceae u analizu, predstavnici serija roda *Sedum* pokazuju upadljivo grupisanje na dijagramu, što ukazuje na homogenost grupe uzoraka roda *Sedum* u odnosu na taksone iz spoljnih grupa (slika 27). Serija *Magellensia* u ovom slučaju predstavlja izuzetak u odnosu na ostale uzorke serija roda *Sedum*. Ona se zbog izostanka komponente II i vrlo niskog sadržaja komponente XV u ekstraktima jasno izdvaja u odnosu na obe ose. Rod *Echeveria* se izdvojio u pozitivnom delu prve ose zbog povećanog sadržaja iste komponente (oko 27 %). Rod *Crassula* se jasno diferencirao u pozitivnom delu druge ose, zbog visokog sadržaja I i II komponente i niskog sadržaja komponente XV (0,52 %). U grupi uzoraka koji čine spoljnu grupu, *Kalanchoe* se, suprotno od očekivanja, nije diferencirao u odnosu na serije roda *Sedum*, već se nalazi unutar grupe locirane u blizini preseka osa (viši sadržaj komponente II).



**Slika 27.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* i taksona spoljne grupe u odnosu na glavne vektore u prostoru I i III ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri metanolnih ekstrakata komponenti



**Tabela 16.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na tri glavne ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri metanolnih ekstrakata

<b>Varijable</b>	<b>PA1</b>	<b>PA2</b>	<b>PA3</b>
<b>I</b>	-0.39	0.41	0.42
<b>II</b>	<b>0.78</b>	-0.05	-0.33
<b>III</b>	0.62	0.00	0.20
<b>IV</b>	0.55	-0.22	0.32
<b>V</b>	0.08	0.52	0.20
<b>VI</b>	-0.08	-0.43	0.51
<b>VII</b>	0.03	-0.61	0.08
<b>VIII</b>	-0.65	0.03	0.44
<b>IX</b>	-0.10	-0.42	-0.35
<b>X</b>	-0.40	-0.45	0.01
<b>XI</b>	-0.45	-0.02	-0.39
<b>XII</b>	-0.28	-0.60	-0.09
<b>XIII</b>	0.16	-0.42	0.15
<b>XIV</b>	-0.63	0.31	-0.28
<b>XV</b>	-0.21	<b>-0.70</b>	0.15
<b>XVI</b>	-0.04	-0.13	-0.63
Expl.Var	2.82	2.57	1.74
Prp.Totl	0.18	0.16	0.11

†Expl.Var – varijabilnost za svaki faktor.  
†Prp.Totl – ukupna objašnjena varijabilnost datog sistema.

**Tabela 16-1.** Vrednosti karakterističnih vektora i procenti varijabilnosti za prve tri ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri metanolnih ekstrakata

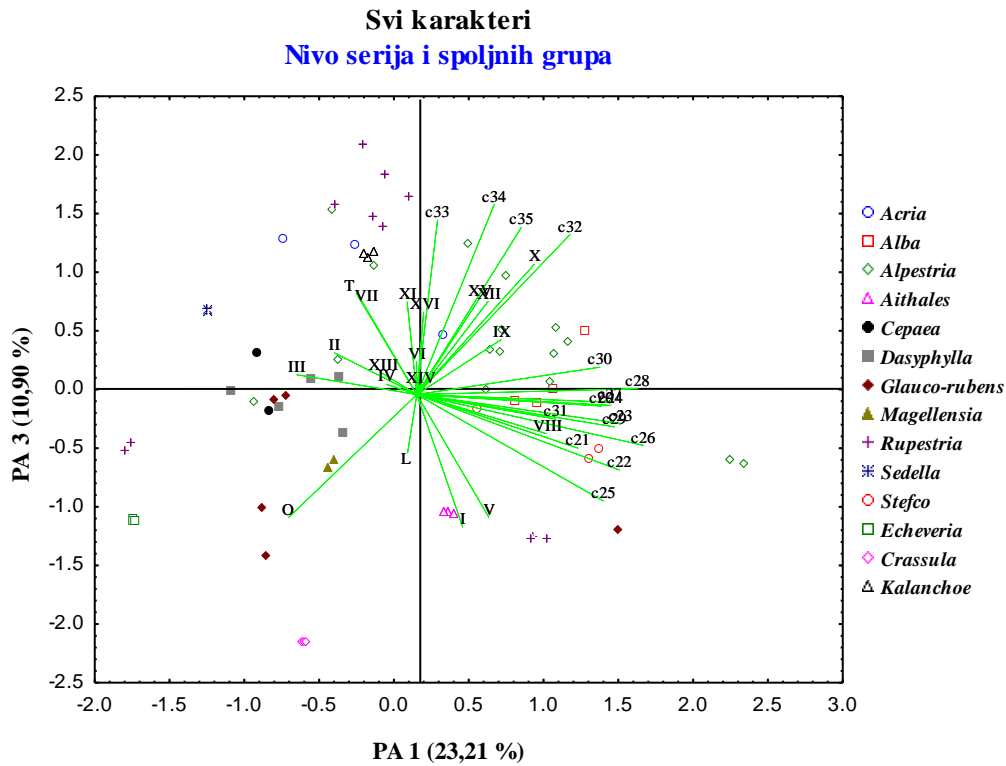
<b>Osa</b>	<b>Eigenvalue</b>	<b>Cumulative Eigenvalue</b>	<b>Cumulative (%)</b>
1	2.82	2.82	17.63
2	2.57	5.39	<b>33.66</b>
3	1.74	7.12	44.52

†Eigenvalue – karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative Eigenvalue – karakteristične svojstvene vrednosti faktora.  
†Cumulative % – procenat totalne varijabilnosti koji objašnjava svaka od osa.

C) Komparativni prikaz varijabilnosti karaktera epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata

U slučaju komparativnog razmatranja svih analiziranih karaktera, kako na nivou serija roda *Sedum*, tako i taksona spoljne grupe, *n*-alkani u najvećoj meri doprinose formiranju osa. *n*-Alkani C<sub>22</sub>-C<sub>24</sub> i C<sub>26</sub>-C<sub>29</sub> svojim koeficijentima u najvećoj meri definišu PA1, dok se C<sub>34</sub> ističe među komponentama koje vrše opterećenje PA3 (tabela 17). Prva i treća osa objašnjavaju 34,11 % ukupne varijabilnosti (tabela 17-1). Izdvojena svojstva, C<sub>22</sub>-C<sub>24</sub> i C<sub>26</sub>-C<sub>29</sub>, su međusobno izuzetno pozitivno korelisana, dok je korelacija između vektora pomenutih nižih *n*-alkana i C<sub>34</sub> slaba.

Prisustvo spoljnih grupa u analizi, uprkos snažnijem grupisanju elemenata, ne izaziva značajniju promenu odnosa pozicija serija roda *Sedum* u koordinatnom sistemu (slika 28). Gledano u odnosu na prvu osu analize glavnih komponenti, u negativnom delu se izdvaja *Echeveria* (blisko sa predstavnicima serija *Rupestria* i *Sedella*), dok se u pozitivnom delu ose izdvajaju pojedini uzorci koji pripadaju seriji *Alpestria*. Izuzimajući dve manje, dislocirane grupe uzoraka na grafikonu, u pozitivnom delu treće ose je u vidu kompaktne grupe izdvojen najveći broj uzoraka iz serije *Rupestria*. Iako u ovoj analizi predstavnici serije *Rupestria* ispoljavaju jasniji oblik grupisanja, ova serija i dalje ostaje jedan od hemotaksonomski najheterogenijih grupa u analizi. Takođe, u odnosu na treću osu se izdvajaju i uzorci koji pripadaju rodu *Crassula*. Treći rod iz spoljnih grupa taksona, *Kalanchoe*, se uprkos svojoj filogenetskoj udaljenosti, ponovo pozicionirao u neposrednoj blizini vrsta roda *Sedum*.



**Slika 28.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* i taksona spoljne grupe u odnosu na glavne vektore u prostoru I i III ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

**Tabela 17.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na tri glavne ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

<b>Varijable</b>	<b>PA1</b>	<b>PA2</b>	<b>PA3</b>
<b>C<sub>20</sub></b>	0.69	-0.54	-0.04
<b>C<sub>21</sub></b>	0.60	-0.57	-0.20
<b>C<sub>22</sub></b>	<b>0.75</b>	-0.43	-0.28
<b>C<sub>23</sub></b>	<b>0.76</b>	-0.49	-0.11
<b>C<sub>24</sub></b>	<b>0.72</b>	-0.60	-0.04
<b>C<sub>25</sub></b>	0.69	-0.08	-0.40
<b>C<sub>26</sub></b>	<b>0.84</b>	-0.25	-0.19
<b>C<sub>27</sub></b>	<b>0.72</b>	0.49	-0.03
<b>C<sub>28</sub></b>	<b>0.82</b>	0.33	0.02
<b>C<sub>29</sub></b>	<b>0.74</b>	0.53	-0.12
<b>C<sub>30</sub></b>	0.68	0.53	0.10
<b>C<sub>31</sub></b>	0.52	0.67	-0.09
<b>C<sub>32</sub></b>	0.57	0.03	0.60
<b>C<sub>33</sub></b>	0.08	-0.34	0.65
<b>C<sub>34</sub></b>	0.29	-0.44	<b>0.71</b>
<b>C<sub>35</sub></b>	0.39	-0.13	0.62
<b>Oleani</b>	-0.48	-0.12	-0.46
<b>Lupani</b>	-0.03	-0.23	-0.22
<b>Tarakserani</b>	-0.23	-0.34	0.38
<b>I</b>	0.17	-0.09	-0.49
<b>II</b>	-0.31	-0.21	0.16
<b>III</b>	-0.45	-0.24	0.07
<b>IV</b>	-0.11	0.16	0.04
<b>V</b>	0.27	0.05	-0.46
<b>VI</b>	0.00	0.23	0.12
<b>VII</b>	-0.21	0.35	0.36
<b>VIII</b>	0.48	0.17	-0.15
<b>IX</b>	0.31	0.05	0.20
<b>X</b>	0.44	0.30	0.49
<b>XI</b>	-0.04	-0.36	0.34
<b>XII</b>	0.27	0.22	0.35
<b>XIII</b>	-0.13	0.28	0.08
<b>XIV</b>	0.01	-0.20	0.03
<b>XV</b>	0.23	0.39	0.35
<b>XVI</b>	0.03	-0.26	0.31
Expl.Var	8.12	4.28	3.82
Prp.Totl	0.239	0.132	0.113

†Expl.Var – varijabilnost za svaki faktor.  
†Prp.Totl – ukupna objašnjena varijabilnost datog sistema.

**Tabela 17-1.** Vrednosti karakterističnih vektora i procenti varijabilnosti za prve tri ose analize glavnih komponenti (PCA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

<b>Osa</b>	<b><i>Eigenvalue</i></b>	<b><i>Cumulative Eigenvalue</i></b>	<b><i>Cumulative (%)</i></b>
1	8.12	8.12	23.21
2	4.28	12.40	35.43
3	3.82	16.22	46.33

†Eigenvalue – karakteristične vrednosti faktora.

†Cumulative Eigenvalue – kumulativne karakteristične vrednosti faktora.

†Cumulative % – procenat totalne varijabilnosti koji objašnjava svaka od osa.

#### 4.3.1.3. Analiza glavnih komponenti na osnovu ukupnih sadržaja *n*-alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta kao karaktera

Analiza glavnih komponenti je izvedena i na osnovu ukupnih sadržaja sve tri grupe analiziranih karaktera sa dva različita aspekta. U jednom slučaju je posmatrana varijabilnost hemijskog sastava serija roda *Sedum* kao grupa u analizi (slučaj A), dok je u drugom slučaju komparativno posmatrana njihova varijabilnost u odnosu na druge taksone familije Crassulaceae (slučaj B). U oba slučaja su kao zasebne promenljive korišćeni ukupni sadržaji *n*-alkana (C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub>), triterpenskih serija (oleanska, lupanska i triterpenska serija) i komponenti metanolnog ekstrakta (iz opsega retencionih vremena  $\Delta R_t=15-20$  min.).

##### A) Obrazac varijabilnosti ukupnih sadržaja karaktera epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata komponenti na nivou serija roda *Sedum*

U formiranju prve ose PCA u najvećoj meri učestvuju *n*-alkani (A) i triterpeni (T) (PA1, 63,93 %), dok formiranju druge ose (PA2, 33,26 %) značajno doprinose komponente metanolnog ekstrakta (M). Apsolutne vrednosti svih značajnih komponenti naglašene su u tabeli 18. Prve dve ose objašnjavaju veliki deo ukupne varijabilnosti, tačnije 97,19 % (tabela 18-1). Grafički prikaz uticaja varijabilnosti procentualnog sastava komponenti na grupisanje analiziranih uzoraka prikazan je na slici 29.

U odnosu na prvu osu, je u najvećoj meri definisana varijabilnošću *n*-alkana i triterpena, formirane su dve glavne grupe uzoraka. U negativnom delu ose PA1 su grupisani uzorci vrsta koje pripadaju serijama *Dasyphylla*, *Aithales*, *Glauco-rubens* i *Cepaea*. Navedene grupa je izdvojena u skladu sa visokim sadržajem triterpenskih serija, pri čemu je udeo triterpena, u pojedinim slučajevim viši od 50 % u odnosu na sadržaj *n*-alkana (prilog 3). Do neznatnog izdvajanja uzoraka iz serije *Cepaea*, u odnosu na ostale serije, dolazi zbog nižeg sadržaja triterpenskih serija u odnosu na ostale serije iste grupe (prosek ~25 %). Sa druge strane, u pozitivnom delu prve ose se zbog visokog sadržaja *n*-alkana (više od 80 %), i potpunog odsustva ili neznatnog prisustva triterpenskih serija grupisale serije *Acria*, *Alba*, *Alpestia*, *Sedella* i *Stefco*. Predstavnici serije *Rupestria* su ponovo prikazani kao disperzna grupa, bez jasne tendencije grupisanja elemenata. Uzorci koji čine pomenutu grupu, zbog izrazite varijabilnosti karaktera voska (sadržaj *n*-alkana varira između 34,68 i 98,51 % i triterpenskih serija 0,53 i 50,54 %), pozicionirani su u okviru nekoliko jasno razdvojenih

grupa, izmešano sa predstavnicima drugih serija. Pozicija serije *Magellensia* je u skladu sa jedinstvenim sadržajem *n*-alkana (~75 %) i triterpena (~12 %) jasno izdvojena u odnosu na obe pomenute grupe. Položaj glavnih vektora u velikoj meri potvrđuje način grupisanja ispitivanih serija. Svojstvo T je u odnosu na svojstvo A, snažno negativno korelisano (ugao između svojstava je blizak uglu od 180<sup>0</sup>); serije i/ili grupe koje su definisane svojstvom T su izdvojene upravo zbog povećanog sadržaja triterpena, a nižeg sadržaja *n*-alkana. I obrnuto, serije i/ili grupe koje su bliske svojstvu A se karakterišu visokim sadržajem *n*-alkana a nižim sadržajem ili potpunim izostankom triterpena. Oba svojstva, A i T, su slabo korelisana sa svojstvom M (ugao između svojstava je blizak uglu od 90<sup>0</sup>).

U odnosu na drugu osu (PA2), gde je grupisanje posledica varijabilnosti karaktera metanolnog ekstrakta, serija *Cepaea* je upadljivo odvojena u odnosu na ostale serije zbog izuzetno visokog sadržaja karaktera M (prosek ~60 %). U odnosu na položaj vektora, serija *Cepaea* je jedina bliska svojstvu M, što naglašava ulogu komponenti metanolnih ekstrakata koje utiče na njeno izdvajanje iz grupe.

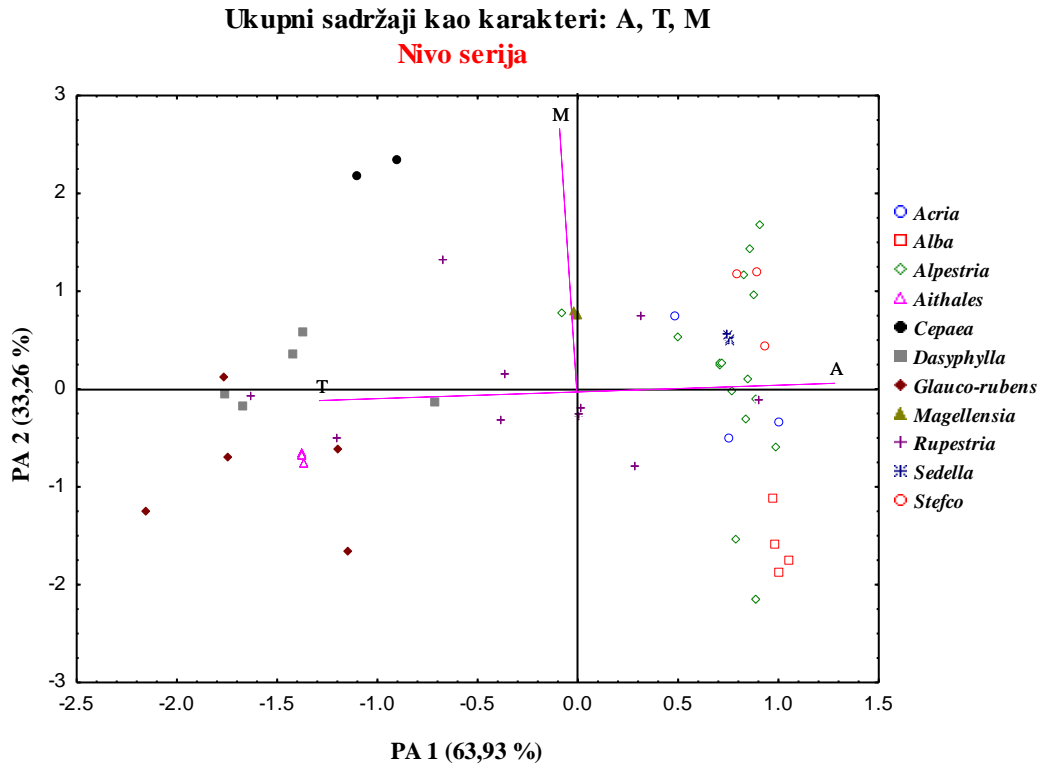
B) Obrazac varijabilnosti ukupnih sadržaja karaktera epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata komponenti na nivou serija roda *Sedum* i spoljne grupe taksona

Kao i u predhodnom slučaju, formiranju prve ose analize glavnih komponenti (PA1, 65,07 %) i u ovoj analizi najviše su doprineli *n*-alkani (A) i triterpeni (T), a drugoj osi (PA2, 30,79 %) komponente metanolnog (M) ekstrakta (tabela 19). Prve dve ose i u ovom slučaju objašnjavaju veliki deo (95,86 %) ukupne varijabilnosti uzorka (tabela 19-1). Način na koji je varijabilnost procentualnog sastava pomenutih karaktera uticala na grupisanje uzoraka roda *Sedum* i taksona izdvojenih u smislu spoljne grupe, prikazan je na slici 30.

Pozicije uzoraka koji pripadaju odgovarajućim serijama, kao i vektora se suštinski nisu promenile. Evidentno je da su se kao posledica uključivanja taksona koji čine spoljnu grupu, ispitivani taksoni međusobno približili na dijagramu. Takav prostorni raspored ukazuje na homogenost grupe uzoraka roda *Sedum*, odnosno karaktarestičan obrazac varijabilnosti ispitivanih karaktera u okviru serija koje čine rod *Sedum*. Ugao između vektora se takođe smanjio, pri čemu su svojstva A i T i dalje negativno korelisana; T i M slabo korelisana, a kako je ugao između svojstva A i M nešto manji od 90<sup>0</sup>, može se zaključiti da je, uvođenjem spoljnih grupa, korelacija između ova dva svojstva još naglašenija.

U odnosu na prvu osu jasno se izdvaja rod *Echeveria*, odlikujući se najvećim sadržajem triterpena (prosek 92,17 %) i ujedno najmanjim sadržajem *n*-alkana (presek 5,50

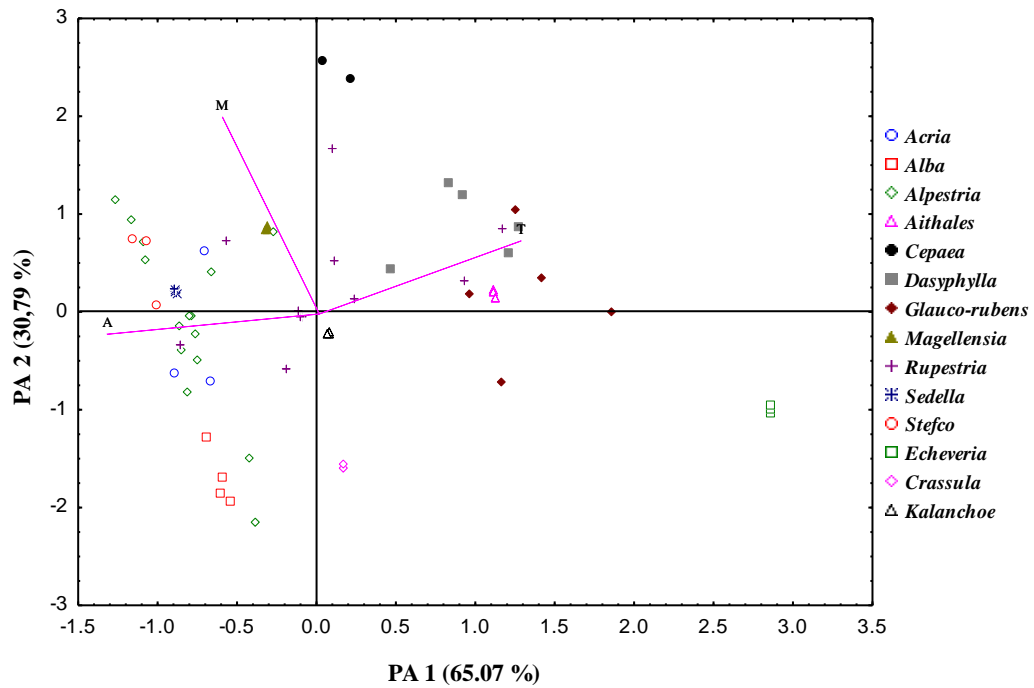
%) u odnosu na sve ispitivane uzorke, dok su se predstavnici rodova *Kalanchoe*, a naročito *Crassula* (0,00 % triterpena) bliži serijama koje karakteriše viši sadržaj *n*-alkana, a odsustvo ili minimalan sadržaj triterpena i polarnih komponenti (M).



**Slika 29.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* u odnosu na glavne vektore u prostoru I i II ose analize glavnih komponenti (PCA); ukupni sadržaji kao karakteri



Ukupni sadržaji kao karakteri: A, T, M  
Nivo serija i spoljne grupe



**Slika 30.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* i taksona spoljne grupe u odnosu na glavne vektore u prostoru I i II ose analize glavnih komponenti (PCA); ukupni sadržaji kao karakteri

**Tabela 18.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na tri glavne ose analize glavnih komponenti (PCA); serije roda *Sedum*, ukupni sadržaji kao karakteri

Varijable	PA 1	PA 2
M	-0.07	<b>1.00</b>
A	<b>0.98</b>	0.03
T	<b>-0.98</b>	-0.03
Expl.Var	1.92	1.00
Prp.Totl	0.64	0.33

†Expl.Var – varijabilnost za svaki faktor.  
†Prp.Totl – ukupna objašnjena varijabilnost datog sistema.

**Tabela 19.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na tri glavne ose analize glavnih komponenti (PCA); serije roda *Sedum* i taksoni spoljne grupe, ukupni sadržaji kao karakteri

Varijable	PA 1	PA 2
M	-0.44	<b>0.90</b>
A	<b>-0.96</b>	-0.09
T	<b>0.91</b>	0.33
Expl.Var	1.95	0.92
Prp.Totl	0.65	0.31

†Expl.Var – varijabilnost za svaki faktor.  
†Prp.Totl – ukupna objašnjena varijabilnost datog sistema.

**Tabela 18-1.** Vrednosti karakterističnih vektora i procenti varijabilnosti za prve tri ose analize glavnih komponenti (PCA); serije roda *Sedum*, ukupni sadržaji kao karakteri

Osa	Eigenvalue	Cumulative Eigenvalue	Cumulative (%)
1	1.92	1.92	63.93
2	1.00	2.92	97.19

†Eigenvalue – karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative Eigenvalue – kumulativne karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative % – procenat totalne varijabilnosti koji objašnjava svaka od osa.

**Tabela 19-1.** Vrednosti karakterističnih vektora i procenti varijabilnosti za prve tri ose analize glavnih komponenti (PCA); serije roda *Sedum* i taksoni spoljne grupe, ukupni sadržaji kao karakteri

Osa	Eigenvalue	Cumulative Eigenvalue	Cumulative (%)
1	1.95	1.95	65.07
2	0.92	2.88	95.86

†Eigenvalue – karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative Eigenvalue – kumulativne karakteristične vrednosti faktora.  
†Cumulative % – procenat totalne varijabilnosti koji objašnjava svaka od osa.

#### 4.3.2. Kanonijska diskriminantna analiza (CDA)

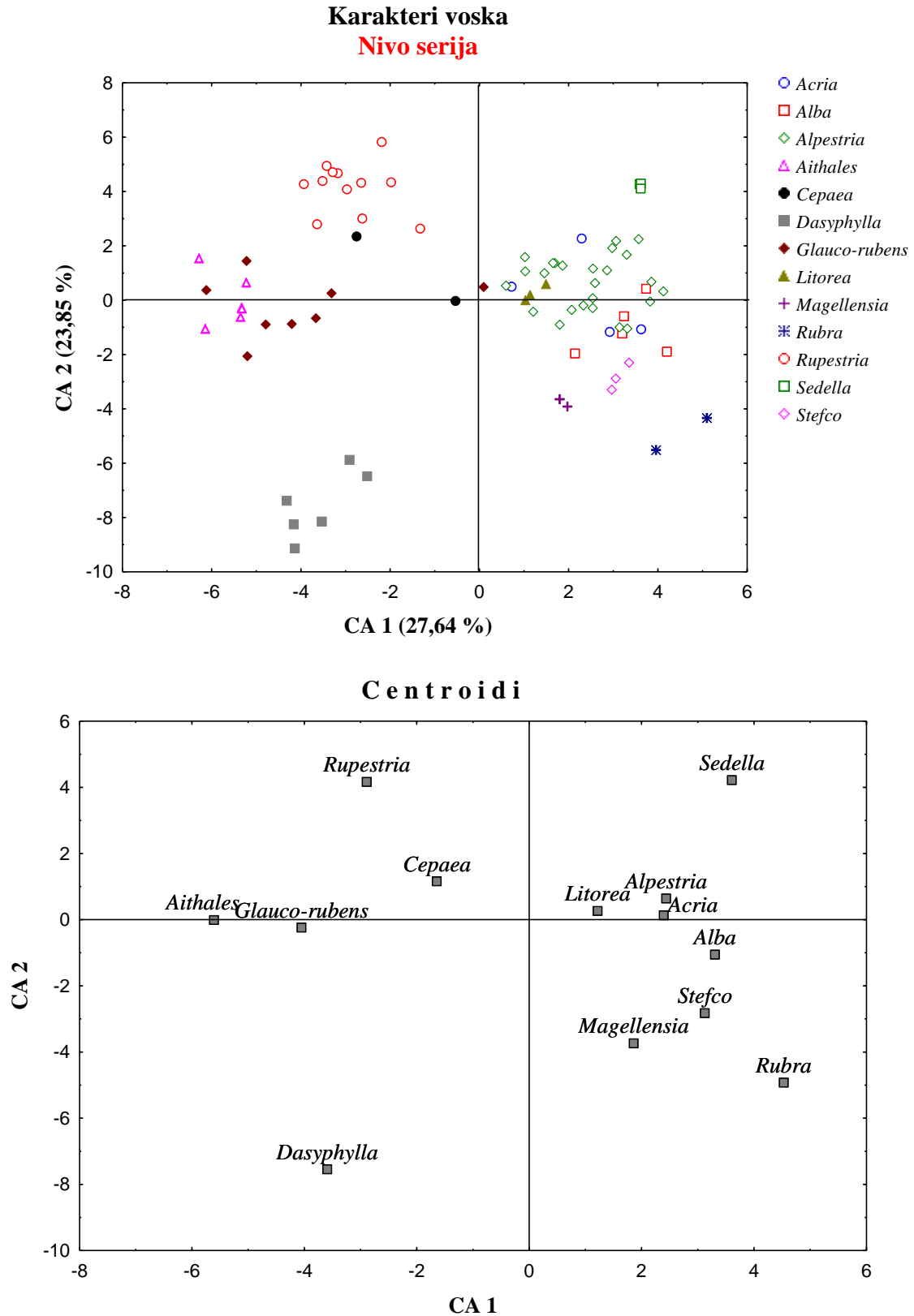
Pored analize opšteg oblika varijabilnosti hemijskih karaktera, primena multivarijantnih statističkih analiza pruža mogućnost utvrđivanja stepena diferencijacije analiziranih grupa taksona. Naglašavanjem stepena različitosti između *a priori* definisanih otvara se mogućnost određivanja nivoa preciznosti potencijalno različitih grupa uz izdvajanje promjenljivih koje u najvećoj meri odražavaju njihovu različitost. Cilj ove analize je da se utvrdi eventualna razlika između *a priori* grupa (serija) u okviru roda *Sedum* definisanih na bazi klasičnih taksonomskih (morfo-anatomskih) karaktera ili molekularnih filogenetskih dokaza. Takođe, jedan od ciljeva upotrebe ove metode je da se izvrši izdvajanje karaktera (diskriminantne varijable) koji najviše doprinosi diskriminaciji grupa, odnosno karaktera koj mogu da posluže kao potencijalni hemotaksonomski markeri. Kao i kod PCA, kanonijska diskriminantna analiza (CDA) je izvedena na dva različita nivoa. Prvi podrazumeva razdvajanje uzoraka na nivou predstavnika serija roda *Sedum*, dok drugi pokazuje u kojoj meri se predstavnici pomenutog roda izdvajaju (diskriminišu) u odnosu na predstavnike drugih rodova (spoljna grupe) u okviru familije Crassulaceae. Oba slučaja su razmatrana kako na bazi procentualne zastupljenosti pojedinačnih komponenti epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata tako i na osnovu ukupnih sadržaja *n*-alkana (C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub>), triterpenskih serija (oleanska, lupanska i tarakseranska serija) i komponenti metanolnog ekstrakta (iz opsega retencionih vremena  $\Delta R_t=15-20$  min.) kao karaktera.

##### 4.3.2.1. Diskriminantna analiza – nivo serija roda *Sedum*

###### A) Diferenciranje na osnovu sadržaja *n*-alkana i triterpena u epikutikularnim voskovima

Grafički prikaz rezultata diskriminantne analize, bazirane na procentualnoj zastupljenosti *n*-alkana (C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub>) i triterpenskih serija u epikutikularnom vosku, ukazuje na raspored grupa taksona u prostoru glavnih kanonijskih osa (slika 31). Prve dve ose u ovom slučaju objašnjavaju 51,49 % ukupne varijabilnosti (tabela 20; CA1 27,64 % i CA2 23,85 %). Raspored diferenciranih grupa je prikazan i pomoću centroida čiji se položaj na grafiku definiše kao prosečna i reprezentativna pozicija svih taksona date serije. Najveći doprinos u diskriminaciji ispitivanih grupa po prvoj osi dali su sledeći karakteri: C<sub>34</sub>, C<sub>35</sub> i triterpeni oleanske serije. Upravo u odnosu na pomenutu osu (CA1) izdvojile su se dve grupe uzoraka.

U negativnom delu glavne kanonijske ose smeštena je prva grupa uzoraka koju karakteriše visok sadržaj triterpena oleanske serije. Zajedno sa delimično izdvojenim uzorcima koji pripadaju seriji *Dasyphylla*, pomenutu grupu čine serije *Rupestria*, *Cepaea*, *Glauco-rubens* i *Aithales*. Serija *Rupestria* se izdvaja po najnižem procentu triterpena oleanskog tipa, kao i najvećem procentu C<sub>35</sub> *n*-alkana, dok je kod serije *Dasyphylla* situacija obrnuta. Ostale serije su se izdvojile u pozitivnom delu CA1 u skladu sa niskim sadržajem ili potpunim izostankom oleanske serije i niskim sadržajem izdvojenih *n*-alkana. Pomenutu grupu čine sledeće serije roda *Sedum*: *Acria*, *Alpestria*, *Litorea*, *Alba*, *Magellensia*, *Stefco*, *Sedella* i *Rubra*. Na izdvajanje grupa uzoraka duž druge kanonijske ose u najvećoj meri doprinose koncentracije *n*-alkana C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31-33</sub> i C<sub>35</sub>. Izdvajanje je moguće vršiti u prvoj grupi taksona, pri čemu se jasno izdvaja serija *Dasyphylla* u negativnom delu CA2 (nizak sadržaja *n*-alkana), a potom i serije *Sedella* i *Rupestria* smeštene u pozitivnom delu ose (značajan sadržaj *n*-alkana), koje su međusobno manje jasno razdvojene.



**Slika 31.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* i njihovih centroida u prostoru I i II diskriminantne ose (CDA); karakteri epikutikularnih voskova

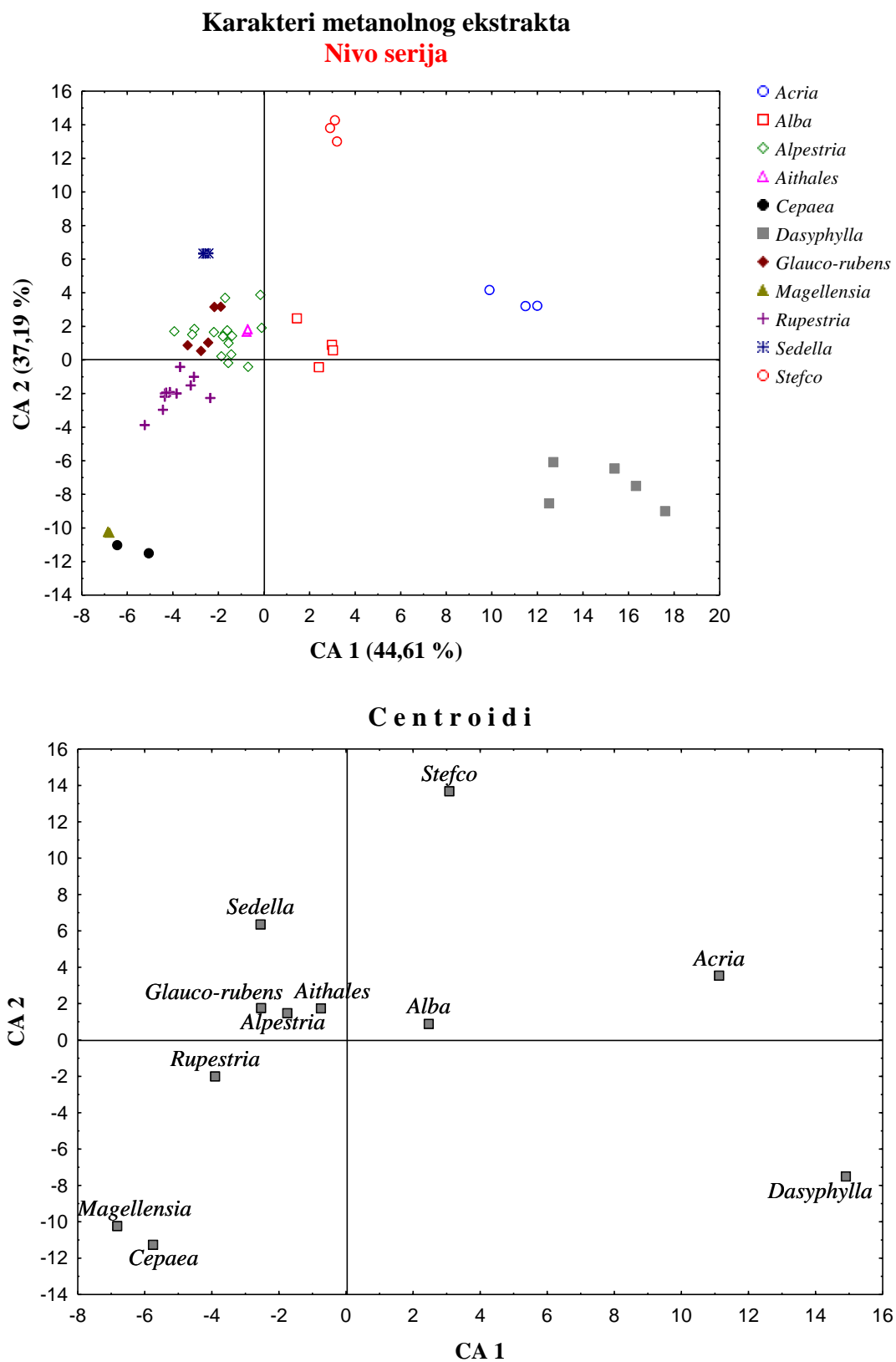
**Tabela 20.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na prve tri diskriminantne ose (CDA); karakteri epikutikularnih voskova

Varijable	CA1	CA2	CA3
C <sub>20</sub>	-0.16	-0.37	-0.47
C <sub>21</sub>	-0.13	-0.11	-0.31
C <sub>22</sub>	-0.11	<b>0.51</b>	2.52
C <sub>23</sub>	-0.43	-0.50	-2.78
C <sub>24</sub>	0.39	<b>-1.15</b>	-0.94
C <sub>25</sub>	0.41	0.11	2.69
C <sub>26</sub>	-0.02	<b>1.58</b>	-1.27
C <sub>27</sub>	0.21	<b>-0.76</b>	-1.32
C <sub>28</sub>	-0.20	0.11	1.58
C <sub>29</sub>	0.04	<b>1.32</b>	-0.63
C <sub>30</sub>	0.09	0.01	-0.04
C <sub>31</sub>	0.26	<b>-0.56</b>	0.53
C <sub>32</sub>	-0.19	<b>-1.28</b>	0.01
C <sub>33</sub>	0.40	<b>0.91</b>	-0.13
C <sub>34</sub>	<b>0.79</b>	0.40	0.84
C <sub>35</sub>	<b>-1.38</b>	<b>0.87</b>	-0.25
<b>Oleani</b>	<b>-1.24</b>	-0.29	0.03
<b>Lupani</b>	-0.07	0.41	-0.29
<b>Tarakserani</b>	-0.45	0.47	0.41
Eigenval	12.37	10.68	6.37
Cum.Prop	0.28	0.51	0.66

†Eigenvalue – karakteristične vrednosti.  
‡Cumulative Proportion – kumulativni odnos.

## B) Diferenciranje na osnovu sadržaja komponenti metanolnih ekstrakata

Grafički prikaz rezultata diskriminantne analize, bazirane na procentualnoj zastupljenosti komponenti metanolnih ekstrakata, ukazuje na raspored grupa taksona u prostoru glavnih kanonijskih osa (slika 32). Prve dve ose u ovom slučaju objašnjavaju 81,80 % ukupne varijabilnosti (tabela 21; CA1 44,61 % i CA2 37,19 %). Najveći doprinos u diskriminaciji ispitivanih grupa po prvoj osi dali su sledeći karakteri: VI, VII, IX, XIII i XV. Upadljivo izdvajanje u odnosu na prvu kanonijsku osu karakteriše serije *Dasyphylla* i *Acria* (visok sadržaj komponente XIII), zatim serije *Stefco* (visok sadržaj komponente VI) i *Alba* bliže nultoj vrednosti prve ose. U negativnom delu iste ose su diferencirane ostale ispitivane serije, pri čemu su se serije *Magellensia* i *Cepaea* jasnije izdvajaju od ostalih (vrlo nizak sadržaj izdvojenih komponenti). Najveći doprinos pri formiranju CA2 ose je dodeljen komponentama II, III, V, VIII, IX, XII i XIV. U pozitivnom delu ove ose značajno se izdvaja serija *Stefco* zbog niskog sadržaja komponente II i visokog sadržaja komponente XII. U negativnom delu druge ose izdvaja se serija *Dasyphylla* sa visokim sadržajem komponenti II i III, i serije *Magellensia* i *Cepaea* okarakterisane visokim sadržajem komponente XIV.



**Slika 32.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* i njihovih centroida u prostoru I i II diskriminantne ose (CDA); karakteri metanolnih ekstrakata

**Tabela 21.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na prve tri diskriminantne ose (CDA); karakteri metanolnih ekstrakata

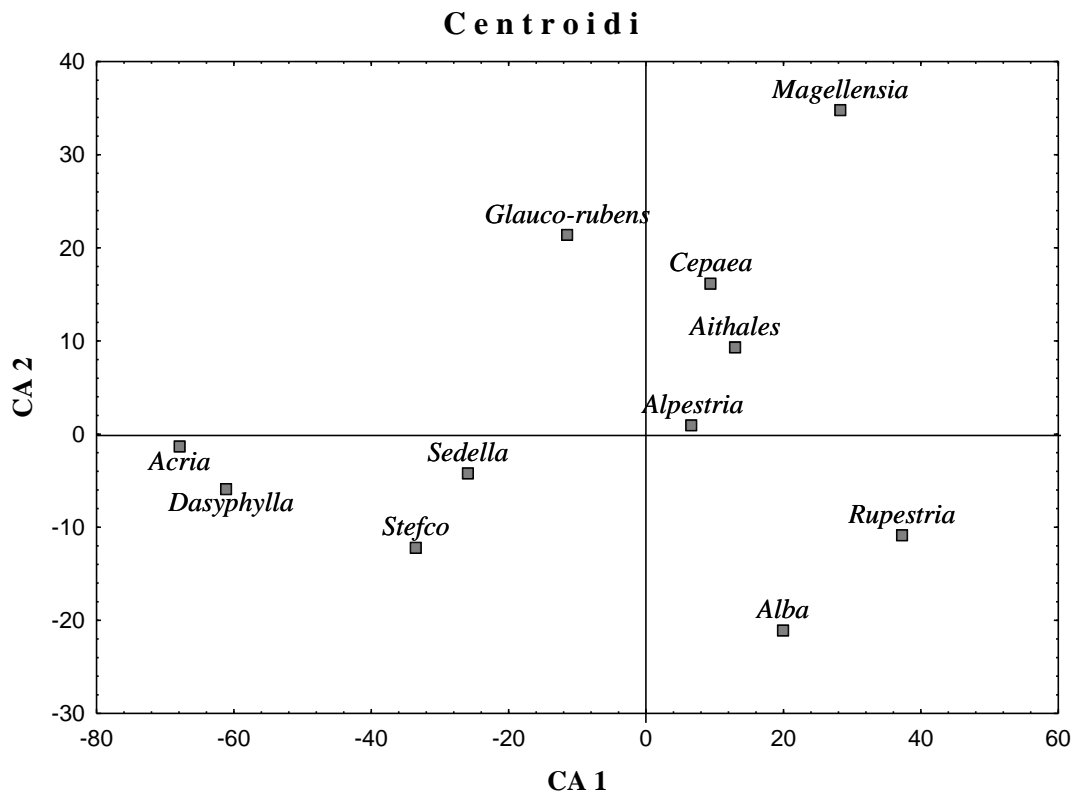
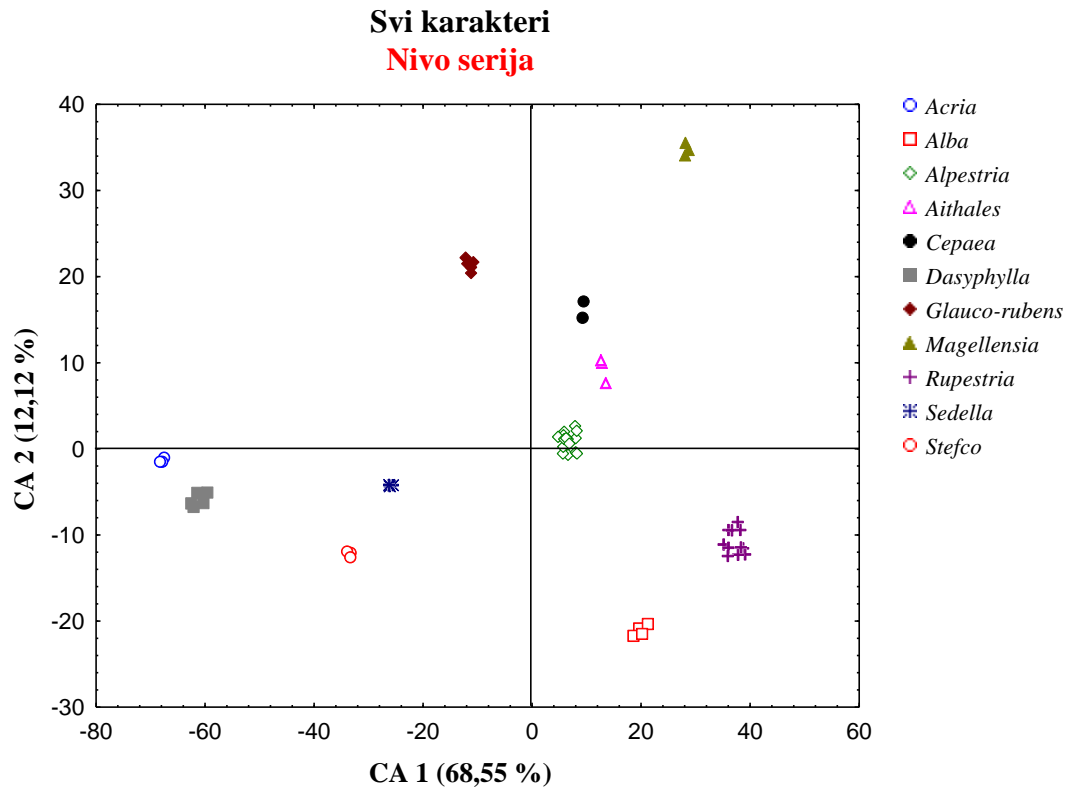
Varijable	CA1	CA2	CA3
<b>I</b>	-0.08	0.48	0.15
<b>II</b>	0.25	<b>0.87</b>	-0.07
<b>III</b>	0.10	<b>0.14</b>	1.18
<b>IV</b>	0.17	0.93	-0.20
<b>V</b>	-0.05	<b>1.15</b>	0.71
<b>VI</b>	<b>0.67</b>	0.50	-0.86
<b>VII</b>	<b>-0.98</b>	0.04	-0.61
<b>VIII</b>	0.00	<b>0.99</b>	-0.28
<b>IX</b>	0.48	<b>0.73</b>	0.33
<b>X</b>	-0.06	-0.02	0.95
<b>XI</b>	<b>-0.67</b>	-0.18	0.31
<b>XII</b>	0.47	<b>2.48</b>	-0.24
<b>XIII</b>	<b>1.25</b>	-0.39	0.01
<b>XIV</b>	-0.26	<b>-1.26</b>	-0.83
<b>XV</b>	<b>0.70</b>	-0.30	0.33
<b>XVI</b>	0.04	-0.50	-0.07
Eigenval	41.96	34.98	6.98
Cum.Prop	0.45	0.82	0.89

†Eigenvalue – svojstvene vrednosti diskriminanti.  
‡Cumulative Proportion – kumulativni odnos.

C) Diferenciranje na osnovu sadržaja karaktera epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata

Najviši nivo diferencijacije ispitivanih grupa je postignut uključivanjem svih hemijskih karaktera. Na slici 33 je objašnjeno je 80,67 % ukupne varijabilnosti (tabela 26; CA1 68,55 % i CA2 12,12 %). Komponente sa najvećim doprinosom prilikom diskriminisanja ispitivanih uzoraka su boldovane u tabeli 22. U odnosu na prvu kanonijsku osu najveći značaj u idvajanju grupa igraju komponente C<sub>22</sub>, C<sub>28</sub> i C<sub>30</sub> iz grupe *n*-alkana, odnosno komponente metanolnih ekstrakata XI i XII, koje samim tim imaju i najveći hemotaksonomski značaj. Generalno, ispitivani uzorci su se grupisali upravo u skladu sa pripadnošću datoj seriji roda. Značajnija diskriminacija u odnosu na prvu osu je primećena kod serije *Acria* i *Dasyphylla*, a u odnosu na drugu osu izdvojila se serija *Magellensia*.





**Slika 33.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* i njihovih centroida u prostoru I i II diskriminantne ose (CDA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

**Tabela 22.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na prve tri diskriminantne ose (CDA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

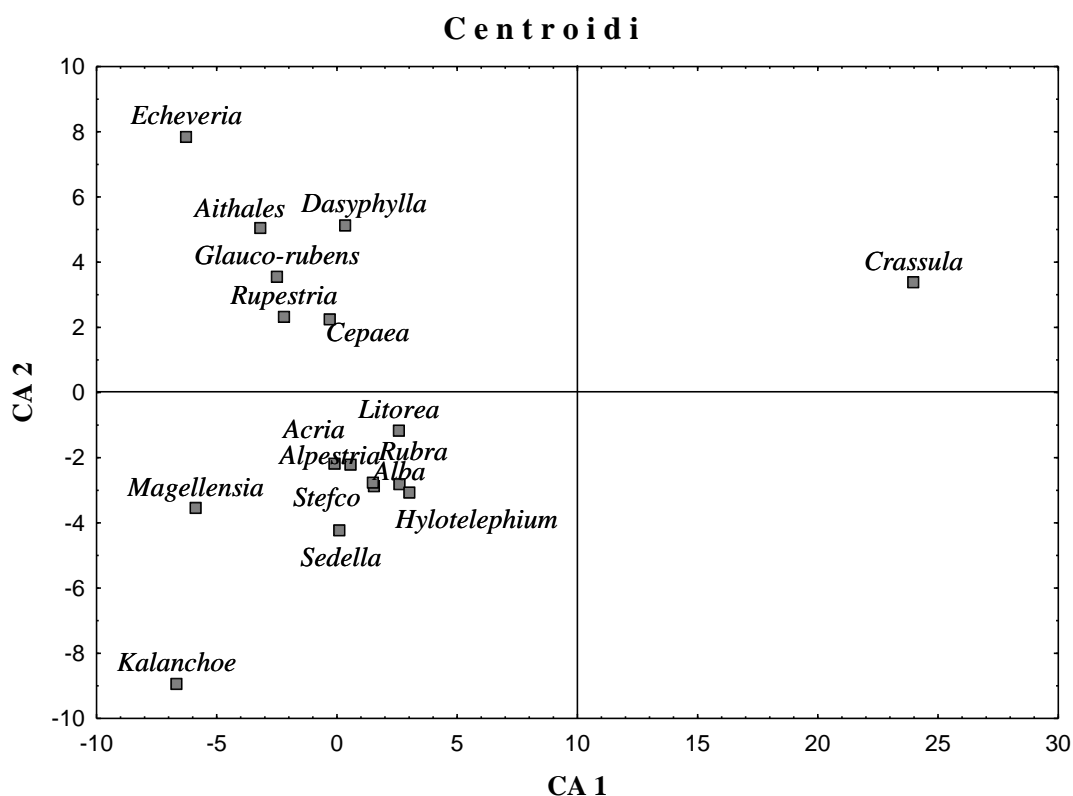
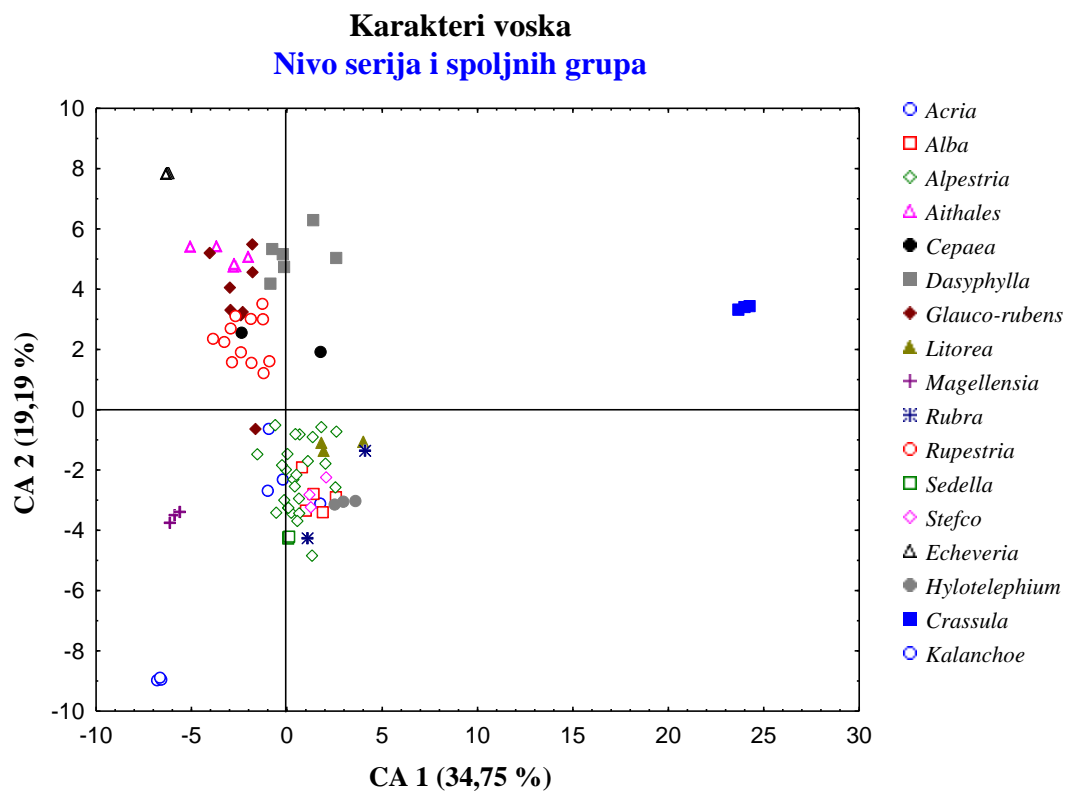
<b>Varijable</b>	<b>CA1</b>	<b>CA2</b>	<b>CA3</b>
C <sub>20</sub>	0.38	-0.84	-0.42
C <sub>21</sub>	-6.60	-0.56	0.50
C <sub>22</sub>	<b>7.20</b>	3.57	3.42
C <sub>23</sub>	-1.39	<b>11.07</b>	-0.86
C <sub>24</sub>	-2.43	-6.03	0.99
C <sub>25</sub>	4.09	<b>-9.05</b>	-1.33
C <sub>26</sub>	-0.10	1.04	-1.08
C <sub>27</sub>	6.60	3.01	-0.58
C <sub>28</sub>	<b>-10.30</b>	2.94	1.50
C <sub>29</sub>	4.38	<b>-10.44</b>	-1.46
C <sub>30</sub>	<b>10.08</b>	0.60	0.35
C <sub>31</sub>	3.84	1.30	1.70
C <sub>32</sub>	-5.39	0.77	-1.94
C <sub>33</sub>	3.79	1.09	-2.16
C <sub>34</sub>	-0.24	1.69	-2.42
C <sub>35</sub>	5.61	-2.73	4.64
<b>Oleani</b>	4.24	-0.09	1.18
<b>Lupani</b>	0.42	2.97	1.46
<b>Tarakserani</b>	0.54	-1.81	0.12
<b>I</b>	4.28	4.49	1.23
<b>II</b>	0.03	1.35	-0.32
<b>III</b>	6.78	-2.16	0.85
<b>IV</b>	-1.86	-1.47	-0.15
<b>V</b>	-1.46	2.99	-1.33
<b>VI</b>	-6.02	1.47	-0.07
<b>VII</b>	2.08	0.54	-0.45
<b>VIII</b>	-1.14	-1.65	-2.99
<b>IX</b>	-3.95	0.93	-0.87
<b>X</b>	2.03	-0.07	1.82
<b>XI</b>	<b>10.02</b>	-2.68	0.35
<b>XII</b>	<b>-7.75</b>	0.22	-2.51
<b>XIII</b>	-4.36	-0.65	1.03
<b>XIV</b>	-1.23	4.14	0.55
<b>XV</b>	-2.85	0.84	-0.26
<b>XVI</b>	-1.93	1.14	0.41
Eigenvalue	1234.50	218.29	142.37
Cum. Prop.	0.69	0.81	0.89

†Eigenvalue – svojstvene vrednosti diskriminanti.  
†Cumulative Proportion – kumulativni odnos.

4.3.2.2. Diskriminantna analiza – nivo serija roda *Sedum* i spoljne grupa taksona

A) Diferenciranje na osnovu sadržaja *n*-alkana u epikutikularnim voskovima

Drugачije grupisanje elemenata je konstatovano u slučaju kada DCA osim serija roda *Sedum* uključuje i hemijske karaktere navedenih spoljnih grupa. Na grafikonu (slika 34) objašnjeno je 53,94 % od ukupne varijabilnosti (tabela 23; CA1 34,75 % i CA2 19,19 %). Najveći doprinos u diskriminaciji ispitivanih grupa po prvoj osi dali su sledeći karakteri: C<sub>23</sub>-C<sub>26</sub>, C<sub>29</sub>-C<sub>31</sub>, C<sub>33</sub> i oleanska serija. Spoljne grupe su pozicionirane u perifernim delovima koordinatnog sistema, pri čemu rod *Crassula* ima jasno distanciranu poziciju (izdvajanje u pozitivnom delu prve ose). Nešto bližom pozicijom sa ostalim elementima se odlikuju rodovi *Kalanchoe* (negativna oblast druge ose) i *Echeveria* (pozitivna oblast druge ose), dok je *Hylotelephium* po navedenim kriterijumima prikazan kao najbliži serijama roda *Sedum*. Gledano u odnosu na drugu osu, serije roda *Sedum*, iako su blisko raspoređene, ipak formiraju dve grupe. Nihovom izdvajanju prvenstveno doprinosi sadržaj *n*-alkana C<sub>24</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>32</sub>-C<sub>35</sub> i triterpena oleanske serije. Na distinktnu poziciju uzoraka koji pripadaju rodu *Crassula* pre svega utiče visok sadržaj C<sub>31</sub> *n*-alkana i izostanak oleanske serije u vosku dok se *Kalanchoe* izdvaja po visokom sadržaju C<sub>33</sub> *n*-alkana. Za razliku od navedenih slučajeva, rod *Echeveria* se karakteriše visokim procentom triterpena oleanske serije i generalno niskim sadržajem *n*-alkana. Najzad, element spoljne grupe koji je na grafikonu prikazan kao blizak sa uzorcima serija roda *Sedum* je *Hylotelephium*. Njegova pozicija je objašnjena izostankom triterpena oleanske serije i značajnim prisustvom C<sub>31</sub> i C<sub>33</sub> *n*-alkana u vosku.



**Slika 34.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum*, taksona spoljne grupe i njihovih centroida u prostoru I i II diskriminantne ose (CDA); karakteri epikutikularnih voskova

**Tabela 23.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na prve tri diskriminantne ose (CDA); karakteri epikutikularnih voskova

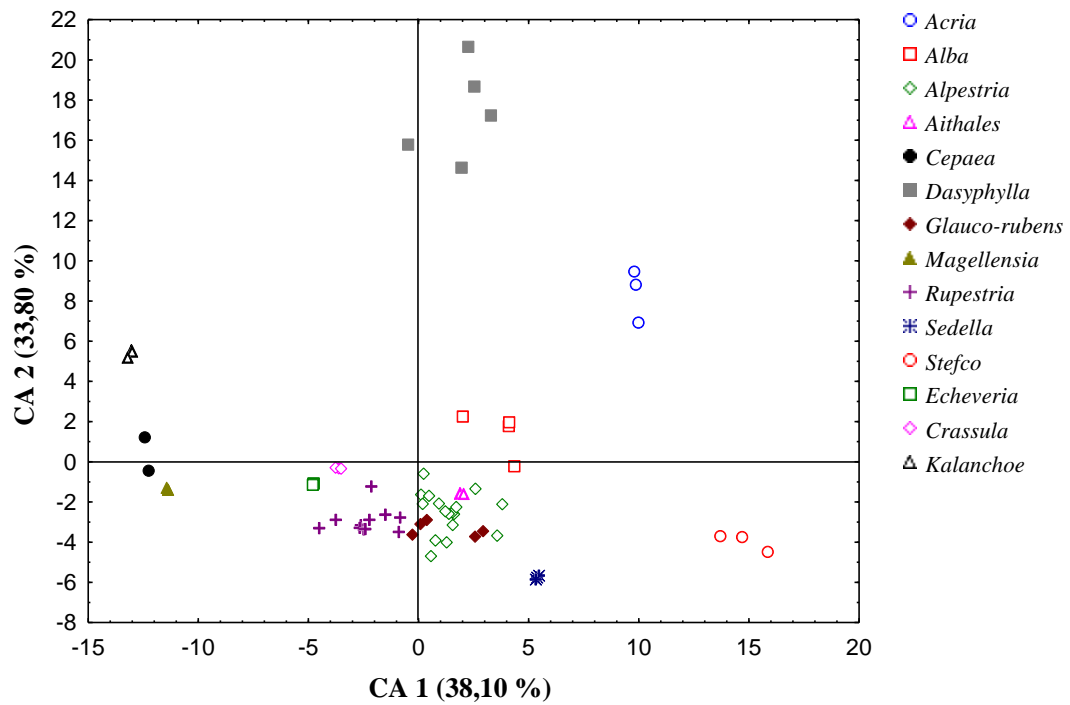
Varijable	CA1	CA2	CA3
C <sub>20</sub>	-0.24	-0.04	0.42
C <sub>21</sub>	-0.36	0.14	0.11
C <sub>22</sub>	<b>1.08</b>	0.00	-0.53
C <sub>23</sub>	<b>-3.00</b>	-0.28	0.92
C <sub>24</sub>	<b>-0.80</b>	<b>-0.81</b>	1.54
C <sub>25</sub>	<b>3.86</b>	<b>0.86</b>	-0.79
C <sub>26</sub>	<b>-0.64</b>	0.15	-1.81
C <sub>27</sub>	-0.32	-0.21	0.80
C <sub>28</sub>	0.49	0.17	0.04
C <sub>29</sub>	<b>-0.79</b>	-0.26	-1.27
C <sub>30</sub>	<b>-0.97</b>	<b>-0.62</b>	0.01
C <sub>31</sub>	<b>0.59</b>	-0.13	0.50
C <sub>32</sub>	0.35	<b>0.61</b>	1.11
C <sub>33</sub>	<b>-0.60</b>	<b>-0.90</b>	-0.85
C <sub>34</sub>	0.18	<b>-0.92</b>	-0.29
C <sub>35</sub>	-0.16	<b>1.47</b>	-1.07
<b>Oleani</b>	<b>-0.69</b>	<b>1.09</b>	0.14
<b>Lupani</b>	0.00	-0.12	-0.42
<b>Tarakserani</b>	-0.39	0.14	-0.46
Eigenval	30.34	16.75	11.09
Cum.Prop	0.35	0.54	0.67

†Eigenvalue – svojstvene vrednosti diskriminanti.  
‡Cumulative Proportion – kumulativni odnos.

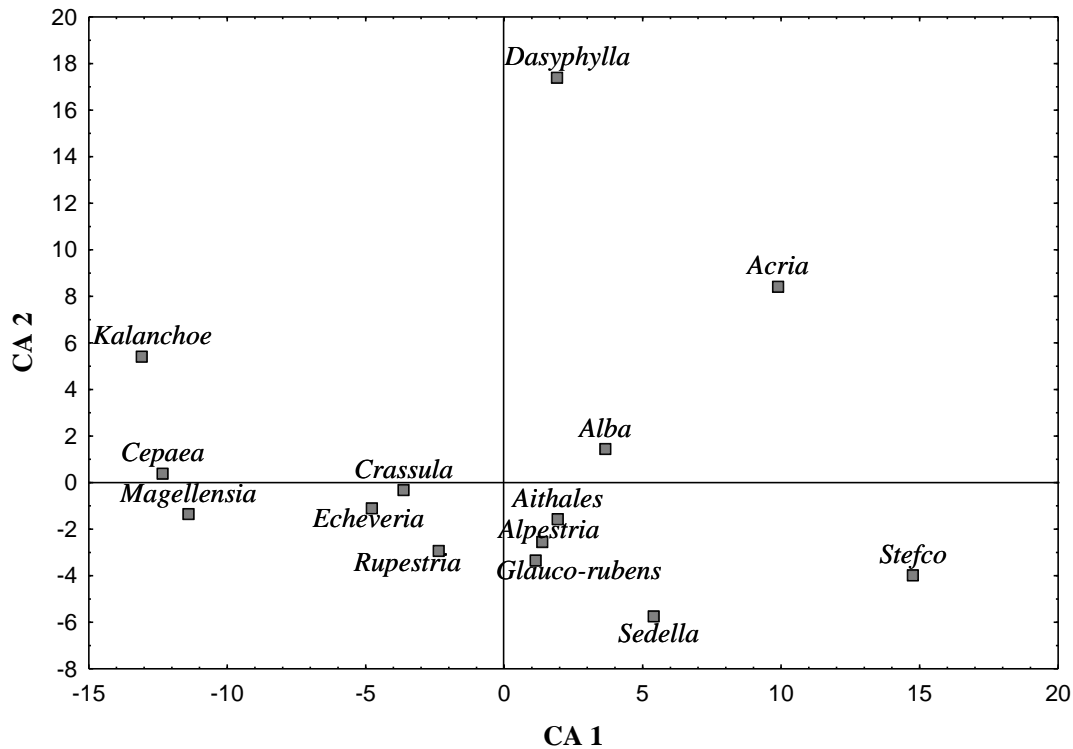
## B) Diferenciranje na osnovu sadržaja komponenti metanolnih ekstrakata

Prve dve ose objašnjavaju visok nivo ukupne varijabilnosti (71,91 %), pri čemu prva osa (CA1) objašnjava 38,10 %, dok druga osa (CA2) objašnjava 33,80 % varijabilnosti uzorka (tabela 24). Gledano na nivou metanolnih ekstrakata najveći uticaj na diskriminaciju grupa uopšte, kao i po prvoj kanonijskoj osi ostvaraju komponente II, IV-VI, VIII, IX, XII, XIV i XVI. Nešto manju ulogu na formiranje grupa ostvaruju komponente V, VII, XI-XIII, XV koje utiču na izdvajanje po drugoj osi. Potrebno je naglasiti da se rodovi *Crassula* i *Echeveria* odlikuju međusobno bliskim pozicijama na grafikonu, što se tumači kao posledica sličnosti u sadržaju komponenti II i III. Njihova pozicija je takođe, vrlo bliska sa grupom koju dominantno formiraju serije roda *Sedum*. Konstatovano je relativno dobro diferenciranje roda *Kalanchoe*, čiji su uzorci smešteni u negativnom delu prve ose (visok sadržaj komponente XVI), dok se u pozitivnom delu vrlo jasno izdvajaju serije *Stefco* i *Acria*. U odnosu na ostale elemente prikazane na grafikonu, po drugoj osi se najbolje diskriminisala serija *Dasyphylla*, dok relativno visok nivo izdvajanja pokazuju serija *Acria* i rod *Kalanchoe* (slika 35).

### Karakteristi metanolnog ekstrakta Nivo serija i spoljnih grupa



### Centroidi



Slika 35. Pozicije analiziranih serija roda *Sedum*, taksona spoljne grupe i njihovih centroida u prostoru I i II diskriminantne ose (CDA); karakteri metanolnih ekstrakata

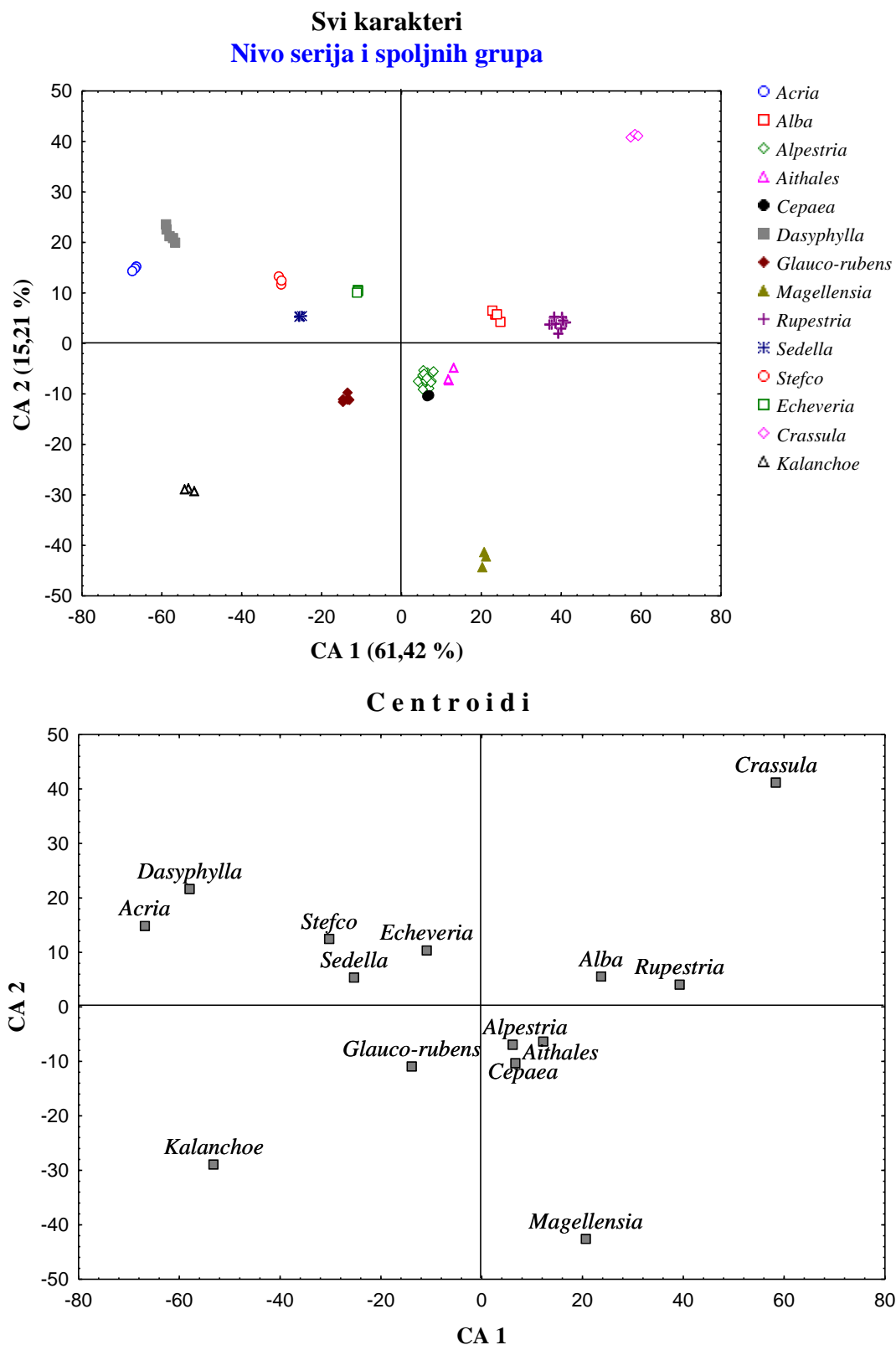
**Tabela 24.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na prve tri diskriminantne ose (CDA); karakteri metanolnih ekstrakata

Varijable	CA1	CA2	CA3
<b>I</b>	0.30	-0.25	-0.44
<b>II</b>	<b>0.80</b>	-0.14	-0.63
<b>III</b>	0.19	0.01	0.39
<b>IV</b>	<b>0.97</b>	-0.31	-0.15
<b>V</b>	<b>1.21</b>	<b>-0.64</b>	0.37
<b>VI</b>	<b>0.77</b>	0.38	-0.58
<b>VII</b>	-0.40	<b>-0.87</b>	-0.14
<b>VIII</b>	<b>0.96</b>	-0.48	-0.15
<b>IX</b>	<b>0.87</b>	0.07	-0.03
<b>X</b>	0.09	-0.08	0.67
<b>XI</b>	-0.20	<b>-0.57</b>	0.67
<b>XII</b>	<b>2.36</b>	<b>-0.76</b>	-0.66
<b>XIII</b>	0.32	<b>1.26</b>	0.23
<b>XIV</b>	<b>-1.27</b>	0.42	-0.41
<b>XV</b>	0.07	<b>0.78</b>	0.01
<b>XVI</b>	<b>-0.66</b>	0.39	-0.87
Eigenval	46.90	41.62	11.02
Cum.Prop	0.38	0.72	0.81

†Eigenvalue – svojstvene vrednosti diskriminanti.  
‡Cumulative Proportion – kumulativni odnos.

C) Diferenciranje na osnovu sadržaja karaktera epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata

Prve dve ose objašnjavaju 76,63 % ukupne varijabilnosti, pri čemu prva osa (CA1) objašnjava 61,42 %, dok druga osa (CA2) objašnjava 15,21 % varijabilnosti uzorka (doprinos komponenti boldovanih u tabeli 25). Na diskriminaciju grupa, predstavljenih na grafikonima (slika 35), po prvoj kanonijskoj osi ostvaraju karakteri C<sub>21</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>32</sub> i C<sub>35</sub> iz grupe n-alkna, odnosno komponente III, VI, V i XII metanolnih ekstrakata. Nešto manju ulogu na formiranje grupa ostvaruju komponente C<sub>21</sub>, C<sub>23</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub> i C<sub>35</sub> koje utiču na izdvajanje po drugoj osi. U odnosu na prvu i drugu osu, u pozitivnom delu, izdvojen je rod *Crassula*, a u negativnom delu druge ose dodatno se izdvajaju serija *Magellensia* i predstavnik roda *Kalanchoe*. Rod *Echeveria* se i u ovoj analizi nalazi u blizini serija roda *Sedum* (slika 36).



**Slika 36.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* i njihovih centroida u prostoru I i II diskriminantne ose (CDA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat



**Tabela 25.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na prve tri diskriminantne ose (CDA); karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

Varijable	CA1	CA2	CA3
C <sub>20</sub>	0.41	0.39	-0.58
C <sub>21</sub>	<b>-6.11</b>	<b>0.59</b>	1.21
C <sub>22</sub>	<b>6.26</b>	-0.12	2.60
C <sub>23</sub>	-3.20	<b>-5.71</b>	-0.98
C <sub>24</sub>	-1.60	-1.27	3.35
C <sub>25</sub>	<b>5.70</b>	<b>7.78</b>	-3.27
C <sub>26</sub>	-0.10	-0.36	-1.52
C <sub>27</sub>	5.45	<b>-5.59</b>	1.06
C <sub>28</sub>	<b>-9.89</b>	2.56	0.44
C <sub>29</sub>	5.49	4.54	-2.33
C <sub>30</sub>	<b>9.15</b>	-3.95	1.33
C <sub>31</sub>	3.56	-0.71	1.78
C <sub>32</sub>	<b>-5.36</b>	-0.43	-1.36
C <sub>33</sub>	3.05	-3.24	-1.50
C <sub>34</sub>	-1.11	-4.11	-0.54
C <sub>35</sub>	<b>6.34</b>	<b>5.21</b>	2.10
<b>Oleani</b>	3.59	-2.75	2.35
<b>Lupani</b>	0.13	-0.90	1.22
<b>Tarakserani</b>	0.46	-1.21	1.22
<b>I</b>	3.65	-2.00	0.84
<b>II</b>	-0.16	-0.89	-0.28
<b>III</b>	<b>6.72</b>	0.09	0.48
<b>IV</b>	-1.49	0.39	0.19
<b>V</b>	-1.94	-3.10	-0.55
<b>VI</b>	<b>-5.87</b>	0.52	-0.16
<b>VII</b>	1.99	0.34	-0.71
<b>VIII</b>	-1.16	-1.53	-1.98
<b>IX</b>	-3.93	-1.13	-0.18
<b>X</b>	2.02	0.37	1.37
<b>XI</b>	<b>9.97</b>	0.90	-0.58
<b>XII</b>	<b>-7.39</b>	0.31	-2.43
<b>XIII</b>	-3.76	2.19	0.30
<b>XIV</b>	-1.82	-2.56	1.30
<b>XV</b>	-2.98	-1.58	0.53
<b>XVI</b>	-1.94	0.21	0.22
Eigenvalue	1417.70	351.13	160.12
Cum. Prop.	0.61	0.77	0.84

†Eigenvalue – svojstvene vrednosti diskriminanti.

‡Cumulative Proportion – kumulativni odnos.

4.3.2.3. Diskriminantna analiza na osnovu ukupanih sadržaja *n*-alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta kao karaktera

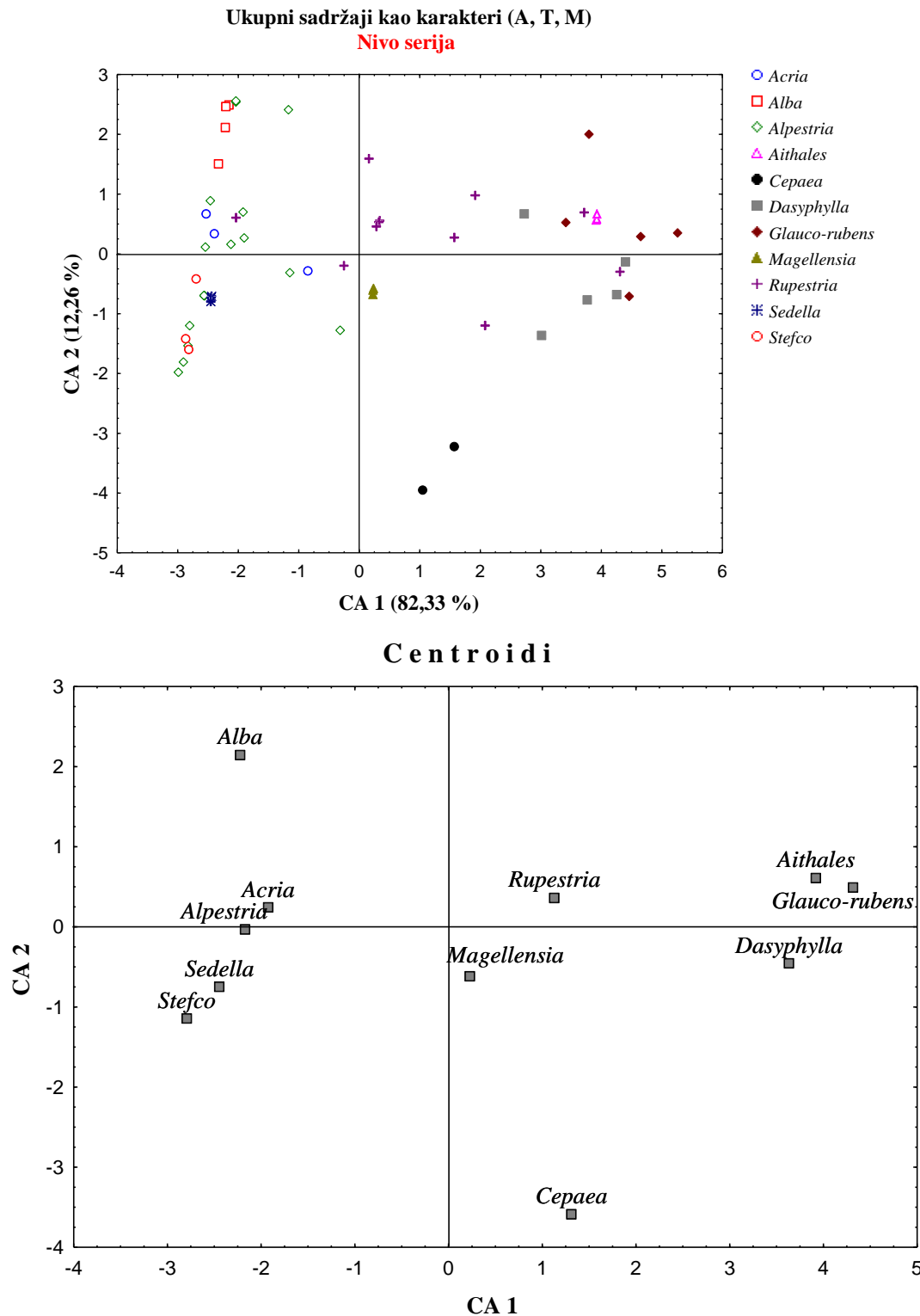
A) Diferenciranje serija roda *Sedum* na osnovu ukupanih sadržaja komponenti epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata

Nivo diskriminacije ispitivanih grupa na osnovu ukupanih sadržaja *n*-alkana (C<sub>20</sub>-C<sub>35</sub>), triterpenskih serija (oleanska, lupanska i triterpenska serija) i komponenti metanolnog ekstrakta (iz opsega retencionih vremena  $\Delta R_t=15-20$  min.) je prikazan na dva grafikona (slika 37), odnosno kroz karakteristične koeficijente karaktera koji utiču na formiranje grupa u analizi (tabela 26). Prve dve diskriminantne ose prikazuju 94.59 % varijabilnosti, pri čemu prva osa objašnjava 82,33 %, a druga 12,26 % varijabilnosti. Interesantno je da u ovoj analizi varijabilnost triterpena u najvećoj meri doprinosi diskriminaciji grupa. U negativnom delu prve ose (jasnije prikazano na grafikonu sa centroidima) izdvojila se grupa taksona koju čine serije *Alba*, *Acria*, *Alpestris*, *Alba*, *Stefco* i *Sedella*. Navedena grupa je okarakterisana izostanakom ili izuzetno niskim sadržajem triterpena. U pozitivnom delu prve ose, grupe taksona su predstavljene na međusobno rastojanju, što ukazuje na veći stepen njihove diferencijacije. Pojednostavljen, centroidni prikaz diferencijacije, omogućuje da se uoče dve grupe taksona. Prvu grupu čine serije *Acria*, *Alpestris*, *Sedella* i *Stefco*, postavljene u negativnoj zoni prve ose. Drugu grupu čine serije *Aithales*, *Glauco-rubens*, *Dasyphylla*, *Magellensia* i *Cepaea* koji se nalaze u pozitivnoj zoni prve ose. Većina uzoraka koji odgovaraju seriji *Rupestris* imaju intermedijarnu poziciju u odnosu na dve pomenute glavne grupe. Izdvojenim pozicijama u odnosu na drugu grupu odlikuje se serija *Cepaea*, odnosno serija *Alba* u odnosu na prvu grupu taksona. Njihovo izdvajanje je moguće vršiti u odnosu na drugu kanonijsku osu. Prvu grupu karakteriše izostanak ili nizak sadržaj triterpena, dok je sadržaj triterpenske frakcije izuzetno visok kod predstavnika druge grupe.

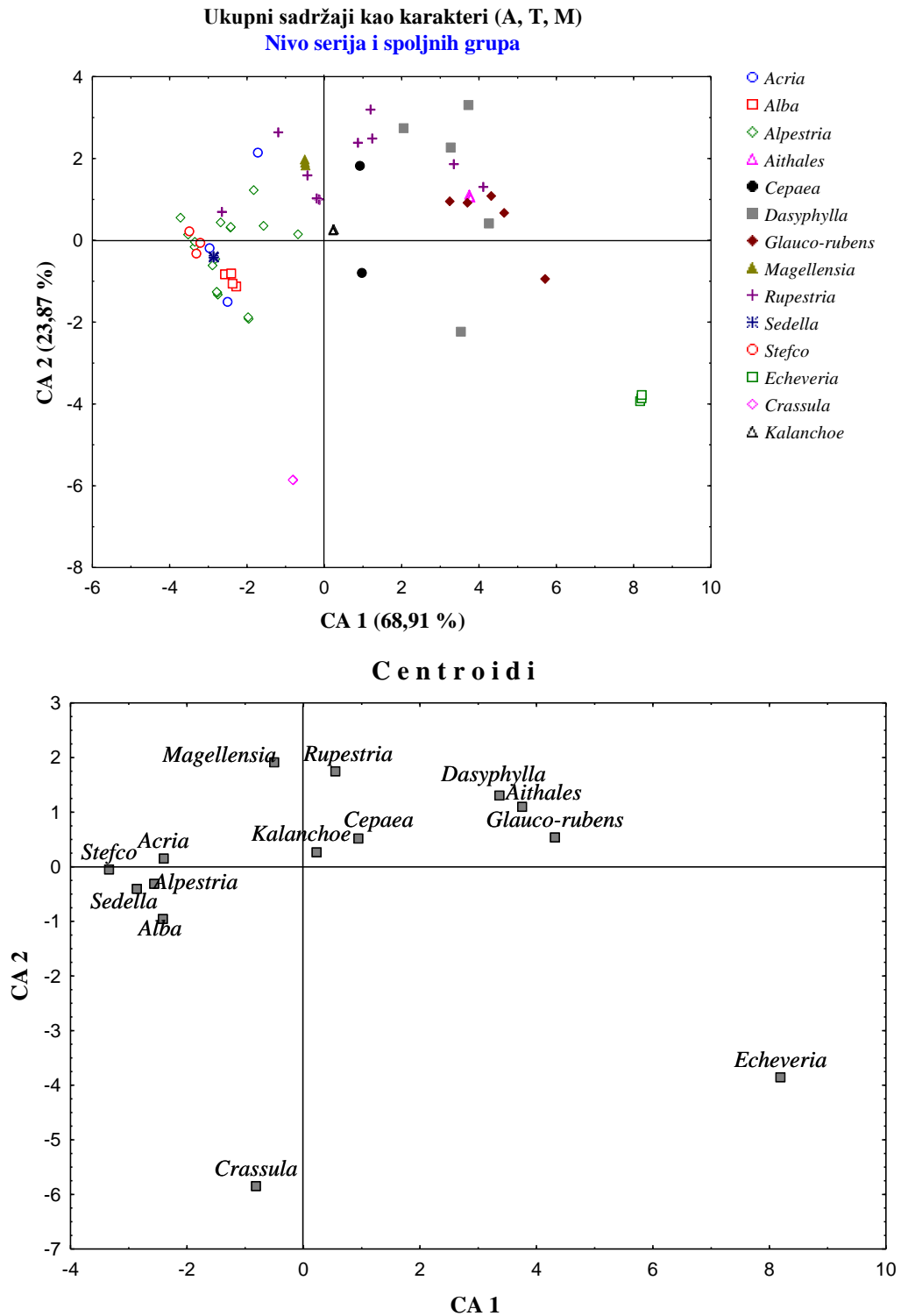
B) Diferenciranje serija roda *Sedum* i spoljne grupe taksona na osnovu ukupanih sadržaja komponenti epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata

U slučaju kada pored karaktera ispitivanih serija roda *Sedum* uključimo i karaktere taksona spoljne grupe, grupisanje entiteta u diskriminantnoj analizi se vrši na drugačiji način (slika 38). Kao i kod PCA, dodavanje taksona iz drugih rodova je izazvalo takozvano

„sabijanje“, tj. približavanje uzoraka koji pripadaju različitim serijama roda *Sedum*, ukazujući na homogenost hemijskog sastava u okviru grupe koju čine. Pritom, način grupisanja elementa u pomenutoj grupi se nije značajnije promenio u odnosu na prethodnu DCA analizu. Nivo diskriminacije je naročito ispoljen u kada se posmatraju pozicije rodova *Crassula* i *Echeveria*, dok je *Kalanchoe* u analizi prikazan kao blizak entitetu koji čine serije roda *Sedum*. Prve dve ose objašnjavaju 92,78% varijabilnosti (tabela 27; CA1, 68,91 % i CA2, 23,87 %). Koeficijenti koji odlikuju triterpene u najvećoj meri utiču na formiranje grupa u odnosu na prvu osu. Sa druge strane određeni *n*-alkani i komponente metanolnog ekstrakta imaju veću ulogu kada je u pitanju formiranje druge ose. U odnosu na prvu osu, u njenom pozitivnom delu, usled izuzetno visokog sadržaja triterpena jasno se izdvaja *Echeveria*, dok se u negativnom delu druge ose usled izostanka triterpena iz epikutikularnog voska uočava izdvajanje roda *Crassula*.



**Slika 37.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum* i njihovih centroida u prostoru I i II diskriminantne ose (CDA); ukupni sadržaji kao karakteri



**Slika 38.** Pozicije analiziranih serija roda *Sedum*, taksona spoljne grupe i njihovih centroida u prostoru I i II diskriminantne ose (CDA); ukupni sadržaji kao karakteri

**Tabela 26.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na prve tri diskriminantne ose (CDA); serije roda *Sedum*, grupe kraktera

<b>Varijable</b>	<b>CA 1</b>	<b>CA 2</b>	<b>CA 3</b>
M	-0.18	<b>-0.97</b>	-0.26
A	-0.10	0.49	-1.26
T	<b>0.94</b>	0.33	-0.93
Eigenval.	7.82	1.16	0.51
Cum.Prop.	0.82	0.95	1.00

†Eigenvalue – svojstvene vrednosti diskriminanti.  
 †Cumulative Proportion – kumulativni odnos.

**Tabela 27.** Koeficijenti opterećenja kvantitativnih karaktera u odnosu na prve tri diskriminantne ose (CDA); serije roda *Sedum* i spoljna grupa taksona, grupe kraktera

<b>Varijable</b>	<b>CA 1</b>	<b>CA 2</b>	<b>CA 3</b>
M	-0.28	0.32	0.92
A	-0.37	<b>1.13</b>	-0.64
T	<b>0.71</b>	<b>1.09</b>	-0.42
Eigenval.	11.33	3.92	1.19
Cum.Prop.	0.69	0.93	1.00

†Eigenvalue – svojstvene vrednosti diskriminanti.  
 †Cumulative Proportion – kumulativni odnos.

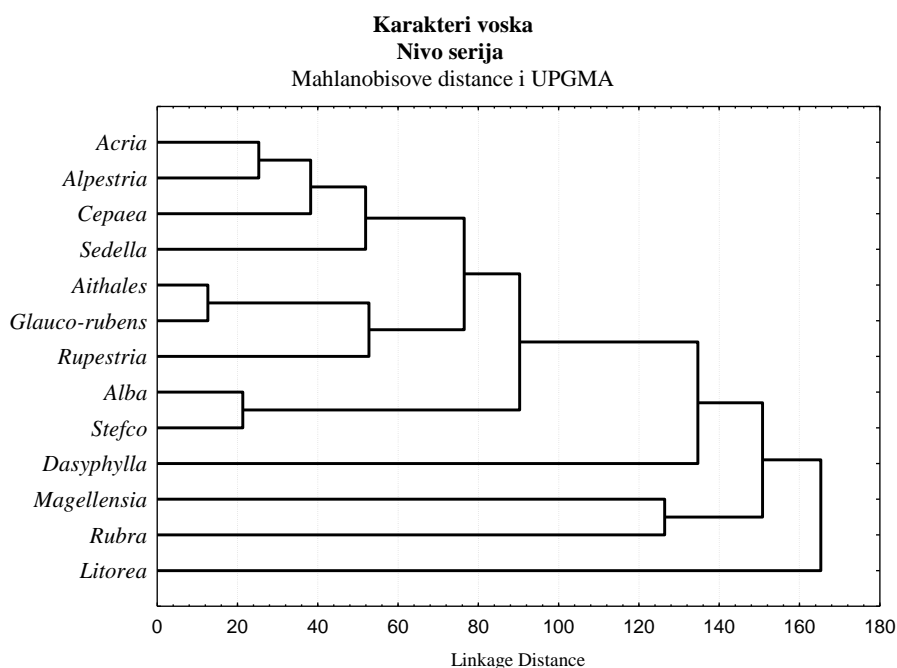
### 4.3.3. Klaster analiza

Klaster analiza je primenjena sa ciljem ispitivanja nivoa sličnosti elemenata uključenih u analizu. Kao rezultat analize, dolazi do specifičnog načina grupisanja uzoraka koji pripadaju različitim serijama roda *Sedum*, odnosno taksonima spoljne grupe. Pritom, formiranje grupa treba da ukaže na određeni nivo hemotaksonomske originalnosti elemenata koje ih čine.

Za formiranje klusterskih ekvivalenata korišćene su Mahlanobisove distance izračunate iz prethodno sprovedene diskriminantne analize. U daljem formiranju klastera, za izračunavanje indeksa sličnosti korišćen je UPGMA metod (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), dok su rezultati grafički prikazani pomoću dendrograma (kladograma).

#### 4.3.3.1. Klaster analiza – nivo serija roda *Sedum*

##### A) Grupisanje na osnovu sadržaja *n*-alkana i triterpena u epikutikularnim voskovima

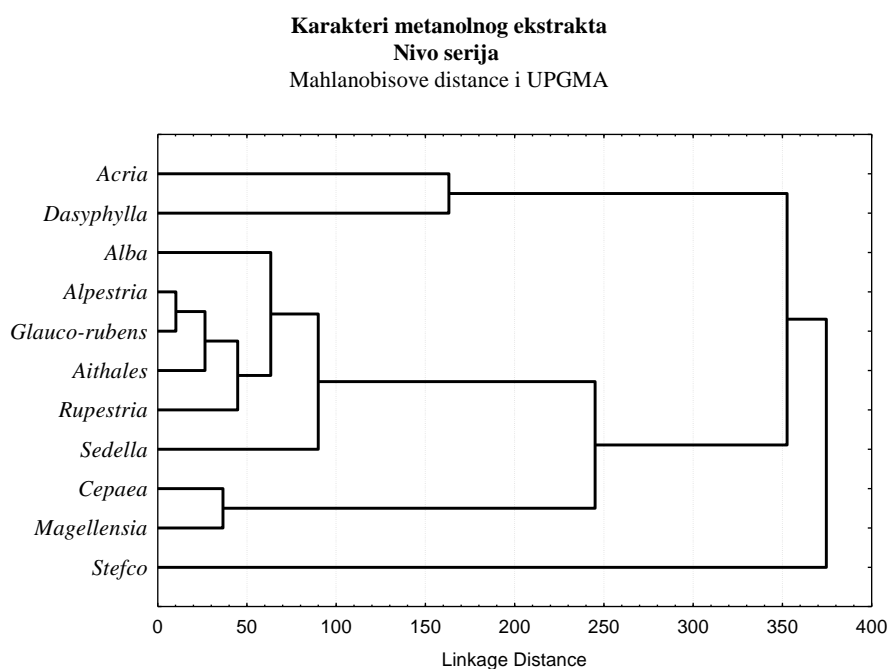


**Slika 39.** Dendrogram serija roda *Sedum* na osnovu diskriminantne analize; karakteri epikutikularnih voskova

U zavisnosti od distance na kladogramu se uočava nekoliko grana koje se izdvajaju na bazi hemijskog sastava epikutikularnih voskova. Na grafikonu je, počev od distance 160 do 100, izdvojeno ukupno pet entiteta, pri čemu se kao zaseban najpre izdvaja serija *Litorea*

(slika 39). Ovi podaci ukazuju na osobenost ove serije i na izolovan hemotaksonomski status serije *Litorea* koja se karakteriše visokim sadržajem  $C_{33}$  i  $C_{31}$  *n*-alkana (ukupno 83,42 %) i 6,08 % triterpena oleanskog tipa u vosku. Ispod vrednosti distance 100 nalazi se grana koja se dalje račva i koja obuhvata serije *Alba*, *Stefco*, *Rupestria*, *Glauco-rubens*, *Aithales*, *Sedella*, *Cepaea*, *Alpestria* i *Acria* koje se odlikuju sličnim sastavom u pogledu *n*-alkana i triterpena. Kao izdvojeni taksoni, odnosno grupe taksona u odnosu na ovu veliku grupu, prikazana je serija *Dasyphylla*, odnosno serije *Rubra* i *Magellensia*. Ukoliko se dobijena aglomeracija elemenata uporedi sa rezultatima diskriminantne analize, uočava se donekle drugačiji način grupisanja serija.

### B) Grupisanje na osnovu sadržaja komponenti metanolnih ekstrakta



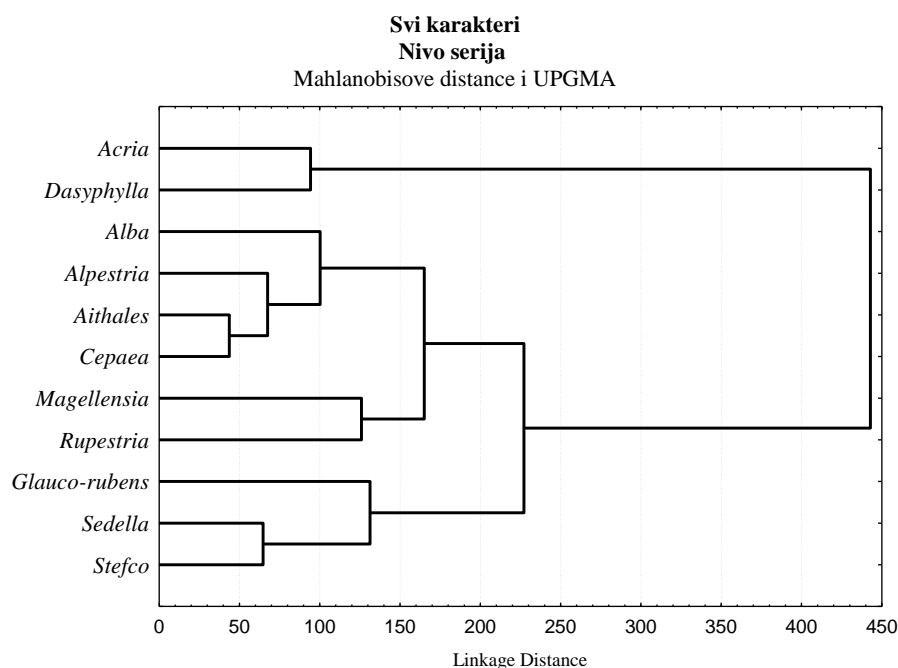
**Slika 40.** Dendrogram serija roda *Sedum* na osnovu diskriminantne analize; karakteri metanolnih ekstrakata

Izgled kladograma, u slučaju analiziranja obrasca distribucije komponenti metanolnih ekstrakata, ukazuje na pojavu dve osnovne grane na kladogramu (slika 40). U odnosu na heterogenu grupu ostalih serija roda koje su prikazane kao slične (distanca 370), izdvojena je serija *Stefco* koja se izdvaja usled jedinstvenog sastava metanolnog ekstrakta: visok sadržaj komponente XII (22,98 %) i komponente VI (11,76 %). Grupa taksona locirana nižim vrednostima distance (ispod 350) deli se na najmanje tri grupe taksona, izdvojene po sličnosti hemijskog sastava metanolnih ekstrakata. Prvu izdvojenu grupu čine serije *Acria* i



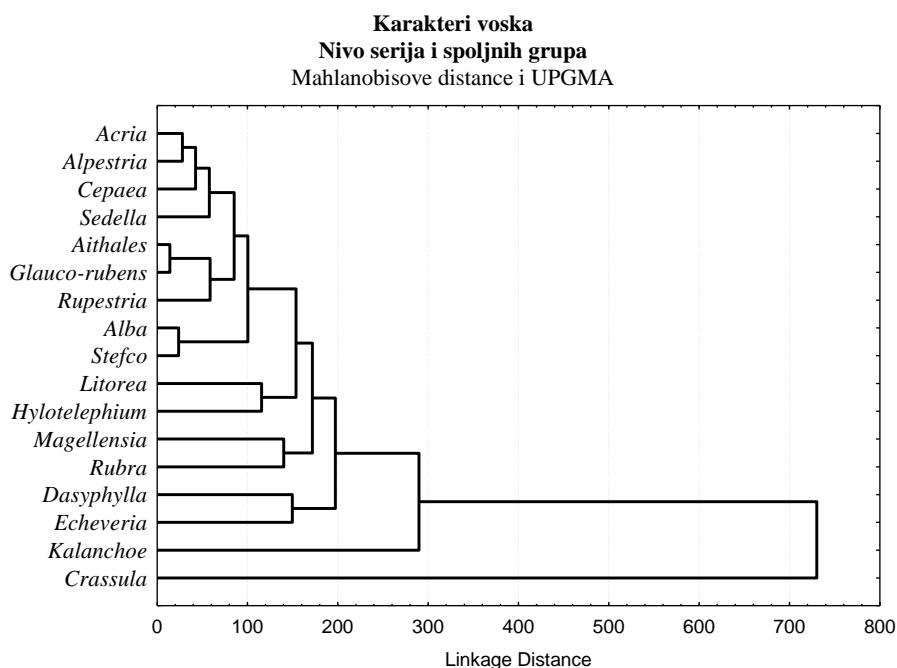
*Dasyphylla*, potom dolazi do izdvajanja serija *Cepaea* i *Magellensia*, dok sve ostale serije čine jednu u hemijskom pogledu sličnu grupu. Dati rezultati se u velikoj meri slažu sa rezultatima diskriminantne analize.

C) Grupisanje na osnovu sadržaja komponenti epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata



**Slika 41.** Dendrogram serija roda *Sedum* na osnovu diskriminantne analize; karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

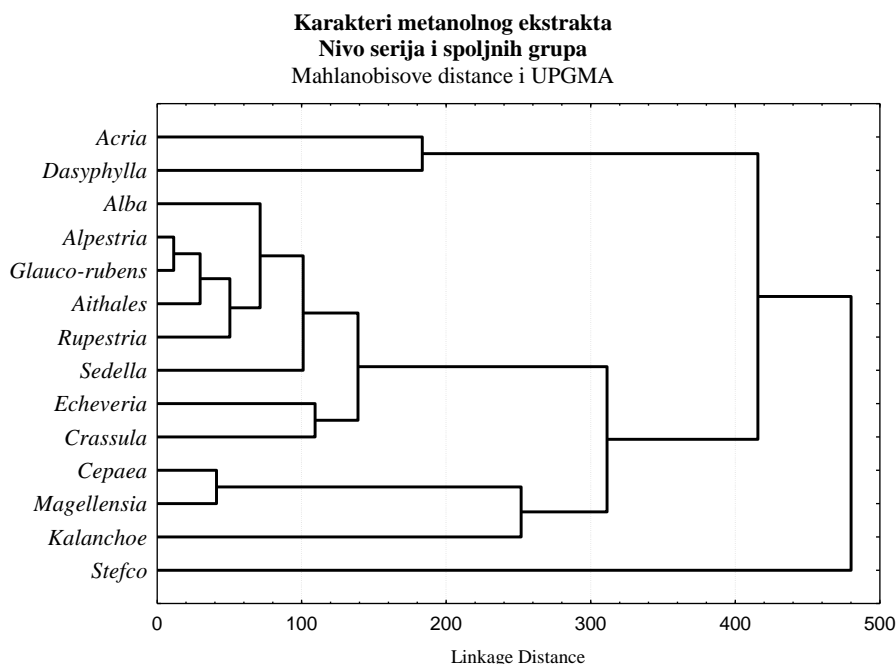
Na kladogramu koji je dobijen statističkom obradom obrasca varijabilnosti svih karaktera (epikutikularnog voska i metanolnog ekstrakta), izdvajaju se dve osnovne grane (slika 41). Kao i u slučaju diskriminantne analize, izdvojile su se serije *Dasyphylla* i *Acria*, što ukazuje na njihovu međusobnu sličnost (distanca 440), ali istovremeno i na izolovanu taksonomsku poziciju koju imaju u okviru roda *Sedum*. Serija *Acria*, za razliku od serije *Dasyphylla*, se ne karakteriše visokim sadržajem triterpena oleanskog tipa i nisu međusobno bliske po sadržaju drugih komponenti voska. Bliskost ove dve serije se može pripisati sličnom sadržaju komponenti metanolnog ekstrakta II i III. Ostale serije su aglomerisane zajedno, čineći heterogenu grupu u okviru koje se daljim hijerarhijskim grananjem definišu podgrupe, odnosno još najmanje dva taksonomska entiteta izdvojena na bazi sličnosti u prisustvu i koncentracijama komponenti metanolnih ekstrakata.

4.3.3.2. Klaster analiza – nivo serija roda *Sedum* i spoljne grupe taksonaA) Grupisanje na osnovu sadržaja *n*-alkana i triterpena u epikutikularnim voskovima

**Slika 42.** Dendrogram serija roda *Sedum* i taksona spoljne grupe na osnovu diskriminantne analize; karakteri epikutikularnih voskova

Uključivanjem spoljnih grupa taksona u analizu u znatnoj meri utiče na formiranje grupa u dendrogramu (slika 42). Kao i u diskriminantnoj analizi, rodovi *Crassula* i *Kalanchoe* se izdvajaju kao posebne grane na dijagramu, što u znatnoj meri naglašava osobenost njihovog hemijskog sastava u odnosu na analiziranih serija roda *Sedum*. Ovakav raspored je donekle bio i očekivan, jer izdvajanje pomenutih rodova u potpunosti opravdava njihovu filogenetsku poziciju u okviru različitih potfamilija familije Crassulaceae. Rod *Echeveria* se kao pripadnik istog tribusa (Sedeae) sa rodom *Sedum*, takođe pravilno svrstava u neposrednoj blizini grupe koju na klasteru čine serije pomenutog roda, opravdavajući tradicionalnu taksonomsku podelu. Međutim, položaj roda *Hylotelephium* u okviru istog klastera sa pripadnicima roda *Sedum* je pomalo neočekivan. Njegova velika sličnost pogledu sadržaja *n*-alkana i triterpena, pre svega sa serijom *Litorea* ali i drugim serijama roda *Sedum* (distanca 200), ne opravdava njegovu taksonomsku individualnost.

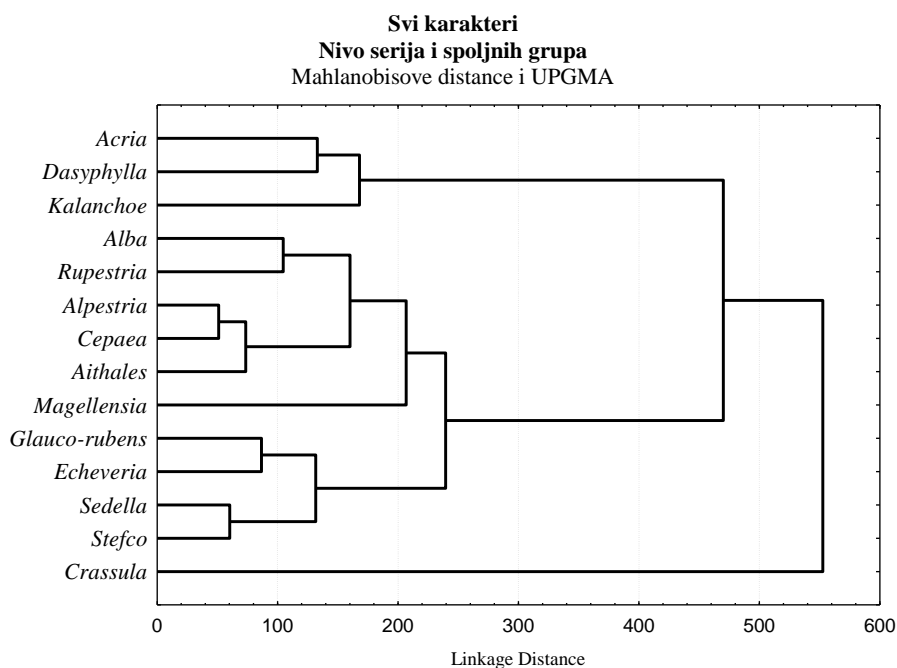
## B) Grupisanje serija na osnovu sadržaja komponenti metanolnih ekstrakata



**Slika 43.** Dendrogram serija roda *Sedum* i taksona spoljne grupe na osnovu diskriminantne analize; karakteri metanolnih ekstrakata

Kao i u slučaju diskriminantne analize, serija *Stefcio* predstavlja izrazito distanciranu seriju (distanca 500) koja se po specifičnom obrascu varijabilnosti komponenti metanolnih ekstrakata odvaja ne samo od drugih sera roda *Sedum*, već i u odnosu na druge rodove familije Crassulaceae koji su uključeni u analizu. Takođe, serije *Acria* i *Dasyphylla* koje formiraju zasebnu granu (distanca 410) pokazuju izvestan stepen hemotaksonomske individualnosti u odnosu na grupu svih ostalih taksona, uključujući i taksone spoljne grupe. Iako izdvojeni u vidu zasebnih klada, rodovi *Crassula*, *Echeveria* i *Kalanchoe* se po sličnosti u sadržaju komponentnih komponenti metanolnih ekstrakata ne izdvajaju dovoljno jasno u odnosu na taksone roda *Sedum* (slika 43). Rezultati klaster analize se u ovom slučaju značajno razlikuju u odnosu na hemotaksonomsku sliku varijabilnosti sastava epikutikularnih voskova, ne podržavajući tradicionalnu taksonomsku podelu familije Crassulaceae.

C) Grupisanje na osnovu sadržaja komponenti epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata

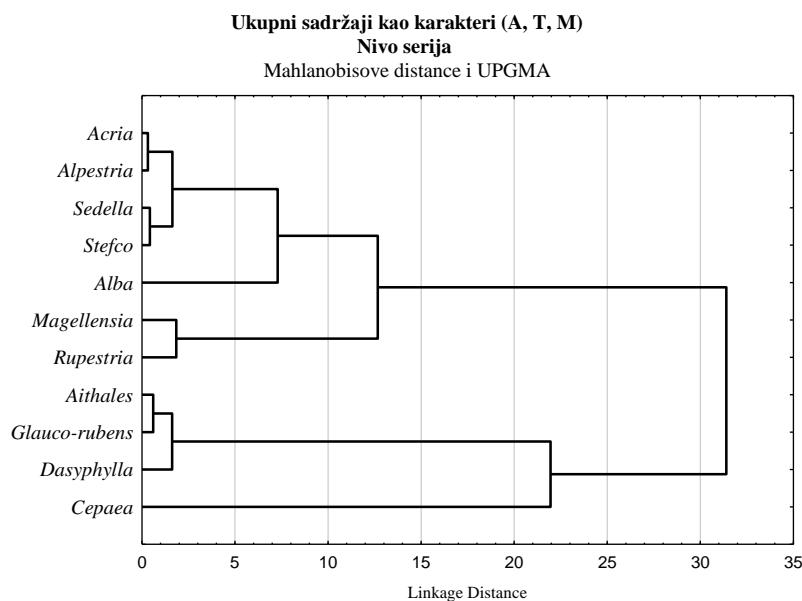


**Slika 44.** Dendrogram serija roda *Sedum* i taksona spoljne grupe na osnovu diskriminantne analize; karakteri epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata, kumulativni efekat

Sagledavanje varijabilnosti na nivou svih analiziranih karaktera (voskova i metanolnih ekstrakata) pruža znatno bolji uvid u kompleksnost odnosa u grupi istraživanih taksona u odnosu na rezultate dobijene testiranjem samo jedne grupe hemotaksonomskih parametara. Rezultati klaster analize u ovom slučaju pružaju jasniju sliku klasifikacije uzoraka, koja se istovremeno u velikoj meri podržava klasičnu taksonomskom strukturu familije Crassulaceae. Rod *Crassula* se, zauzimajući zasebnu poziciju u kladogramu (što je u skladu sa njenom pripadnošću posebnoj potfamiliji) u najvećoj meri se razlikuje od svih ostalih taksona (distanca oko 525). Potom, na distanci 430, dolazi do izdvajanja druge značajne grupe koja obuhvata serije *Acria*, *Dasyphylla* roda *Sedum* i rod *Kalanchoe*, dok je *Echeveria* obuhvaćena drugom granom, zajedno sa serijama roda *Sedum* (slika 44). Ovakav raspored ispitivanih uzoraka je u podudarnosti sa rezultatima diskriminantne analize za isti set podataka.

#### 4.3.3.3. Klaster analiza na osnovu ukupanih sadržaja *n*-alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta kao karaktera

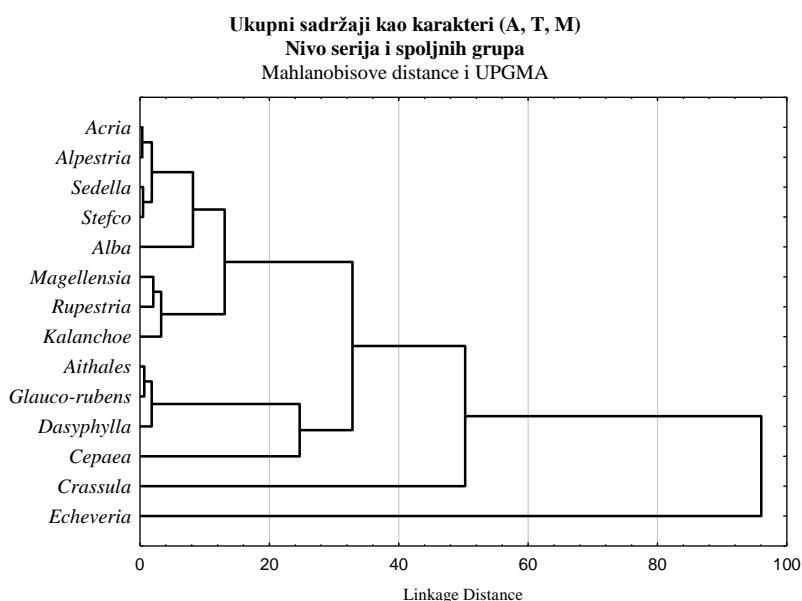
##### A) Grupisanje serija roda *Sedum* na osnovu ukupnih sadržaja komponenti epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata



**Slika 45.** Dendrogram serija roda *Sedum* na osnovu diskriminantne analize; ukupni sadržaji kao karakteri

Na prikazanom kladogramu (slika 45) se jasno izdvajaju dve grupe elemenata (distanca 22). Na bazi sličnosti u distribuciji *n*-alkana i triterpena, sa jedne strane se izdvaja grupa koju čine serije *Cepaea*, *Dasyphylla*, *Glauco-rubens* i *Aithales*, koja je različita u odnosu na ostale serije koje su na istoj vrednosti distance obuhvaćene drugom granom. Serije *Magellensia* i *Rupestria* su u okviru druge grupe taksona, kao međusobno sličnije, izdvajaju u vidu diskretne podgrupe zbog sličnosti u sadržaju *n*-alkana (75,32 % i 70,07 %, respektivno), dok je razlika u sastavu ostala dva karaktera reda veličine ~10 %. Distribucija taksona na kladogramu ukazuje na izvesnu sličnost obrasca grupisanja elementa u klaster analizi sa izdvajanjem grupa u diskriminantnoj analizi, kada se analizira isti set podataka.

B) Grupisanje serija roda *Sedum* i spoljnih grupa taksona na osnovu ukupnih sadržaja komponenti epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata



**Slika 46.** Dendrogram serija roda *Sedum* i spoljnih grupa taksona na osnovu diskriminantne analize; ukupni sadržaji kao karakteri

Kada su setu podaka iz predhodne analize dodaju adekvatne vrednosti komponenti epikutikularnih voskova i metanolnih ekstrakata taksona spoljne grupe, dobijen je kladogram koji pruža prikaz taksonomskih odnosa u grupi prikazanih na slici 46 rodovi *Echeveria*, a potom i rod *Crassula* formiraju zasebne grane kladograma, koje se formiraju na samom početku analize. Izdvajanje roda *Echeveria* je donekle neočekivano u odnosu na njegovu filogenetsku povezanost sa rodom *Sedum* u okviru istog tribusa Sedeae. Neophodno je naglasiti da upadljivo izdvajanje roda *Echeveria* u odnosu na ostale taksone u ovoj analizi, osim specifičnog sastava, verovatno predstavlja posledicu značajnog prinosa voska kod vrste *E. lilacina*. Osim što ta činjenica predstavlja izuzetak u odnosu na predhodne analize, pozicija ostalih taksona spoljne grupe u manjoj ili većoj meri prati već ustaljeni obrazac; *Crassula* je i dalje izdvojena u vidu posebne grane, dok je *Kalanchoe* je grupisan sa taksonima koji pripadaju rodu *Sedum*. U hemotaksonomskom smislu, *Kalanchoe* ispoljava najveću sličnost sa serijama *Rupestria* i *Magellensia* sa kojima se nalazi u istoj podgrupi. Grupisanje elementa u analizi, u opštem smislu, prati obrazac varijabilnosti i distribuciju analiziranih elemenana u diskriminantnoj analizi. Generalno, pozicije serija roda *Sedum* i njihov odnos/redosled u okviru grupa se nije u znatnijem obimu promenio nakon uključivanja taksona spoljne grupe, izuzimajući izdvajanje roda *Echeveria*.

#### 4.3.4. Korespodentna analiza

Poznata je činjenica da svi predstavnici familije Crassulaceae na površini listova poseduju dobro razvijen sloj voska koji u zavisnosti od sastava, u manjoj ili većoj meri utiče na boju površine listova (Stevens, et al. 1994b). Prisustvo ili odsusvo određenih klasa jedinjenja (kao što su *n*-alkani i triterpeni) na lisnoj površini može uticati na njegovu teksturu i pojavu ili odsustvo karakterističnog odsjaja (refleksije) lisne površine. Boja površine lista, kao specifičan kvalitativni karakter biljaka, u zavisnosti od predstavnika, može da varira u okviru različitih nijansi (stanja) zelene, ili da bude modifikovana u različite nijanse sive, plavičaste (glaukozne) ili skoro bele boje.

U cilju ispitivanja povezanosti navedenih kvalitativnih osobina primenjena je korespodentna analiza. Razmatrana je asociranost između karakteristične obojenosti površine lista kod analiziranih vrsta i sastava epikutikularnih voskova, tj. na koji način prisustvo i/ili odsustvo pojedinih klasa jedinjenja može da utiče na izgled površine lista. Praćenjem varijabilnosti navedenih kvalitativnih parametara kod predstavnika roda *Sedum*, ali i drugih rodova familije Crassulaceae predstavljena je mogućnost primene rezultata analize u daljim ekološkim i biološkim istraživanjima. Sa druge strane, rezultati korespodentne analize ukazuju na karakterističan obrazac asociranosti između hemijskog sastava voska i određenih grupa taksona, naglašavajući značaj određenih grupa jedinjenja u tumačenju taksonomskih odnosa u okviru familije.

Analiza je realizovana kroz tri različita aspekta. U prvom slučaju je razmatrana pravilnost pojave triterpena u epikutikularnim voskovima ispitivanih taksona na nivou serija roda *Sedum*; u drugom slučaju su osim navedenih serija razmatrani i taksoni iz takozvane spoljne grupe; u trećem slučaju je razmatrana potencijalna povezanost između zastupljenosti triterpenskih komponenti i stanja površine lista na nivou serija roda *Sedum*. Problem statističke analize nemerljivih, kvalitativnih karaktera prevaziđen je posmatranjem njihovih kodiranih oblika, koji su posmatrani kao matične vrednosti njihovih stanja. Na taj način, varijabilnost pojedinačnih kvalitativnih karaktera opisana je frekvencom koja odgovara pojavi njihovog određenog stanja. U analizi kvalitativnih osobina posmatrana su 4 od ukupno 5 karaktera, koji se javlju u nekoliko različitih oblika, zavisno od tipa karaktera (prilog 4). Karakter obojenosti listova analiziranih predstavnika varira u okviru 2 osnovna stanja (zelena i glaukozna površina) na nivou serija roda *Sedum*, odnosno u nešto širem dijapazonu (zelena, glaukozna i pruinozna), kada se razmatraju i taksoni spoljne grupe. Razmatranje odnosa dva

navedena kvalitativna karakterna, ovom prilikom je vršeno samo na nivou serija roda *Sedum*. Stanje karakterna epikutikularnih voskova (*n*-alkani, oleani, lupani, tarakserani) sagledavano je kroz prisustvo, odnosno odsustvo određene frakcije u analiziranim uzorcima. *n*-Alkani, kao univerzalno prisutna grupa jedinjenja u ispitivanim uzorcima voskova, ne pokazuju varijabilnost u pomenutom kontekstu, te u ovoj analizi njihova uloga nije razmatrana. Povezanost kvalitativnih karakterna i njihovih stanja sa odgovarajućim taksonima ili grupama taksona grafički je prikazan je u prostoru prve dve ose korespondentne analize.

#### A) Obrazac distribucije triterpena na nivou serija roda *Sedum*

Kodiranjem stanja elemenata triterpenske frakcije epikutikularnih voskova i posmatranjem oblika njihove grupisanosti sa taksonima roda *Sedum* mogu se uočiti četiri grupe međusobno asociranih elemenata (slika 47).

Serije *Glauco-rubens* i *Aithales*, izdvojene u odnosu na obe korespondentne ose, jasno su asocirane sa prisustvom lupanske serije i donekle slabije asocirane sa prisustvom oleanske serije triterpena. Ovakvo stanje asociranosti ukazuje na značaj prisustva lupana koji se svojim prisustvom izdvaja kao karakterističan konstituent voskova za dve pomenute serije. Grupa koja se karakteriše takođe jasnom asociranošću sa prisustvom tarakseranske serije obuhvata serije *Rupestria* i *Sedella*. Pomenuta grupa je nešto jasnije definisana u odnosu na drugu korespondentnu osu. Tarakseranska i lupanska serija su se pokazale kao značajni karakteri u izdvajanju pomenutih serija, dok oleanska serija predstavlja karakter od manjeg hemotaksonomskog značaja, obzirom da je njeno prisustvo u podjednakoj meri asocirano sa većim brojem ispitivanih serija. Ipak, može se reći da prisustvo oleanske serije ima određeni značaj u izdvajanju grupa koje se nalaze u pozitivnoj zoni prve ose, ali da gubi ulogu u njihovoj daljoj međusobnoj diferencijaciji.

Druge dve grupe taksona su blisko pozicionirane u odnosu na prvu osu, dok se u odnosu na drugu osu i ne diferenciraju. Ono što u generalnom smislu izdvaja ove dve velike grupe taksona jeste skoro potpuno odsustvo triterpenskih serija u epikutikularnim voskovima. Grupa koju čine serije *Stefco*, *Acria*, *Alpestria*, *Alba* i *Rubra* su u velikoj meri asocirane sa odsustvom lupanske i oleanske serije u epikutikularnim voskovima. Druga grupa obuhvata međusobno asocirane serije *Dasyphylla*, *Cepaea*, *Magellensia* i *Litorea* za koje je takođe karakteristično odsustvo tarakseranske serije, ali se za njih u manjoj meri vezuje i prisustvo oleanske serije.



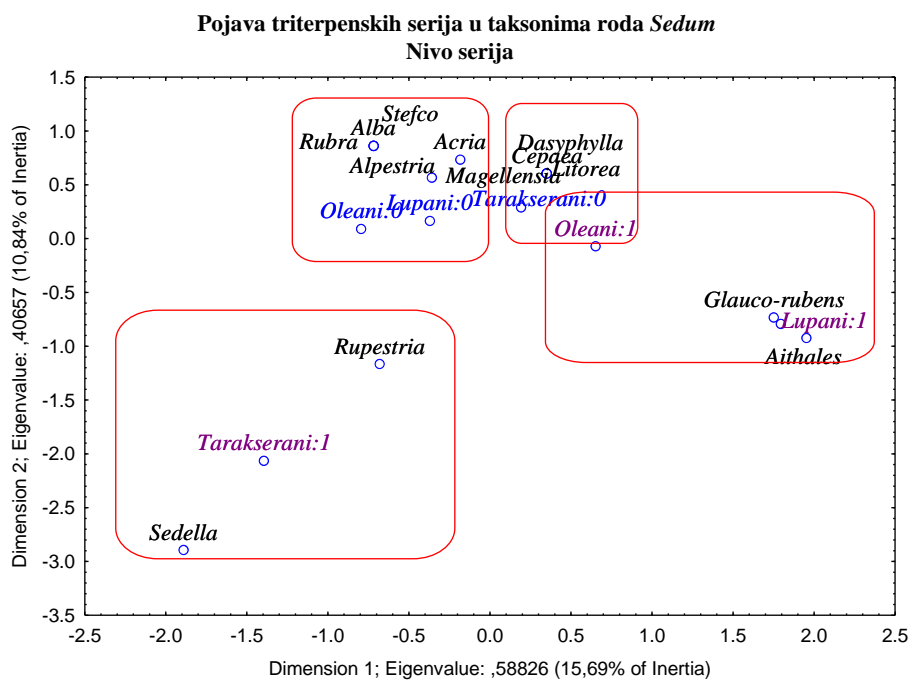
B) Obrazac distribucije triterpena na nivou serija i spoljne grupe taksona

Kada se u analizu, pored serija roda *Sedum*, uključe i taksoni spoljne grupe, asociranost stanja njihovih karaktera ponovo ukazuje na formiranje četiri grupe elemenata (slika 48). Obrazac asociranosti taksona sa prisustvom ili odsustvom triterpenskih serija je slična kao u prethodnom slučaju, pri čemu su serije okarakterisane odsustvom triterpena blisko asocirane sa predstavnicima rodova *Crassula* i *Hylotelephium*. Rodovi *Kalanchoe* i *Echeveria* su se izdvojili u odnosu na većinu ispitivanih serija, asocirajući se sa prisustvom tarakseranske serije triterpena. Prisustvo lupanske serije triterpena u ovoj analizi još više govori o nenoj univerzalnosti na nivou čitave familije, pošto se asocira sa relativno velikim brojem grupa, uključujući i rodove *Kalanchoe* i *Echeveria*. U tom smislu je značaj oleana kao jemotaksonomskih markera znatno manji nego u slučaju ostalih serijha triterpena. Uvođenjem spoljnih grupa uočena je sličnost u pojavljivanju i odnosu triterpenkih serija u epikutikularnim voskovima kod rodova *Crassula* i *Hylotelephium* i serija *Stefco*, *Acria*, *Alpestris*, *Alba* i *Rubra* sa jedne strane, odnosno kod rodova *Kalanchoe* i *Echeverian* i serije *Sedella* sa druge strane.

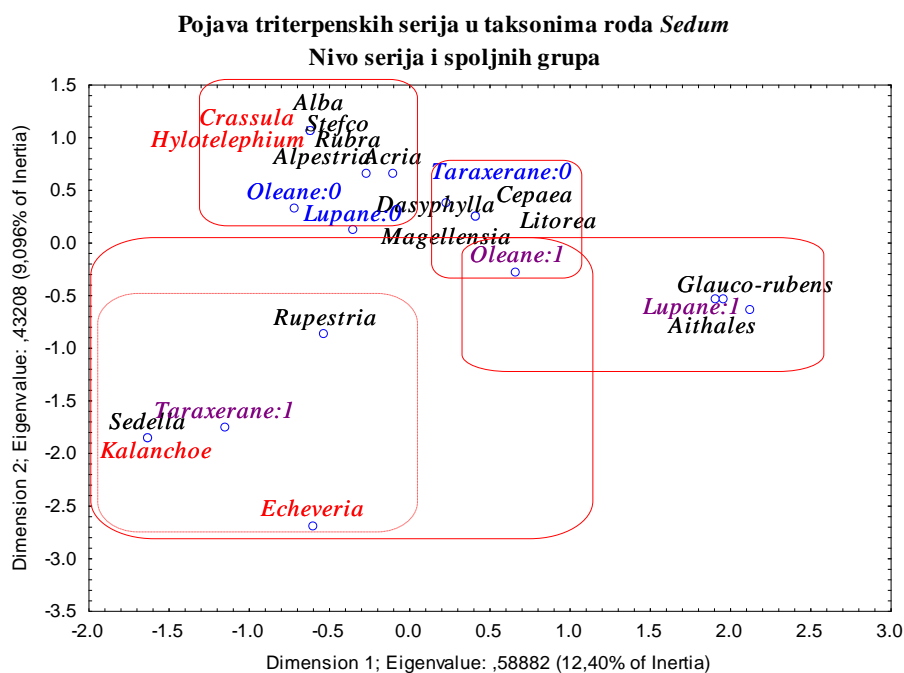
C) Obrazac povezanosti prisustva triterpena i karaktera površine lista – nivo serija roda *Sedum*

Rezultati korespodentne analize ukazuju da je boju površine lista kod predstavnika roda *Sedum*, koja varira od svetlo zelene do plavo- ili zelenosive (glaukozne) ili u izdvojenim slučajevima skoro sivobeke (pruinozne), moguće dovesti u vezu sa sastavom epikutikularnih voskova, a pre svega sa prisustvom određenih serija triterpena. Stanje asociranosti kvalitativnih karaktera koji se odnose na obojenost lista i prisustvo triterpenskih serija prikazano je grafičkim putem na slici 49. Uočava se da se najveći broj serija kao što su: *Stefco*, *Acria*, *Alpestris*, *Alba*, *Rubra*, *Cepaea*, *Magellensia* i *Litorea* odlikuje svetlo zelenom površinom listova, koja se povezuje sa skoro potpunim odsustvom triterpena u epikutikularnim voskovima. Podrazumeva se da u slučaju obojenosti lista treba razmatrati u kontekstu prisustva *n*-alkana, koji iako nisu razmatrani u analizi, u ovom slučaju predstavljaju dominantnu komponentu voskova koja određuje stanje lisne površine. Drugu grupu taksona gde spadaju serije *Dasyphylla*, *Rupestria*, *Sedella*, *Glauco-rubens* i *Aithales* odlikuje pojava sive do sivo plave voštane prevlake na listovima i asocirana sa pojavom svih serija triterpenske frakcije. Dalju diferencijaciju u okviru ove grupe moguće je pratiti na osnovu

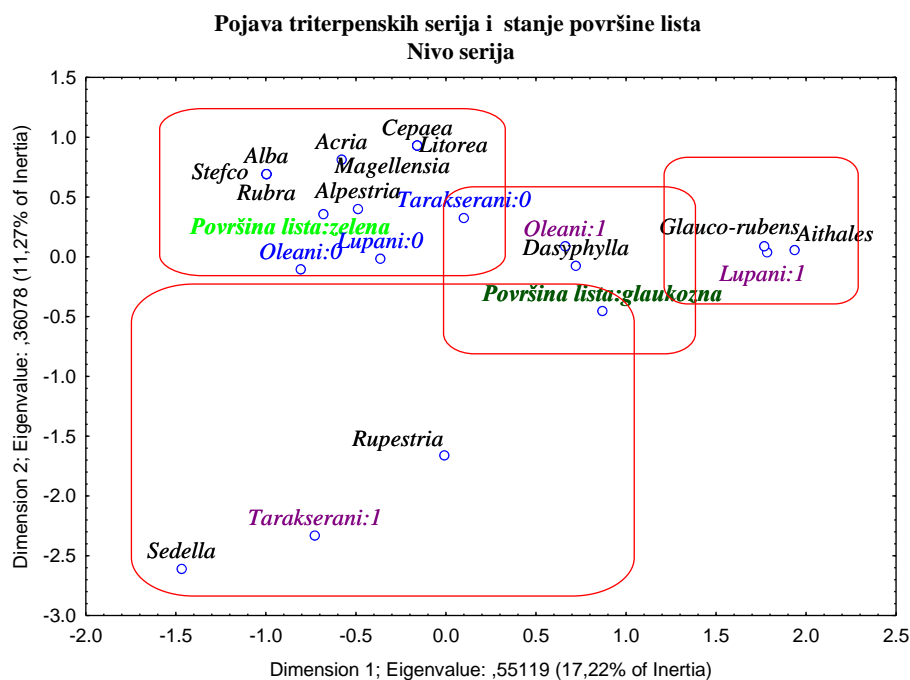
uloge tarakserana sa jedne, odnosno oleana i lupana sa druge strane. Naime, tarakserani su kao frakcija veoma jasno asocirani sa serijama *Rupestria*, *Sedella*; lupani sa serijama *Aithales* i *Glauco-rubensi*, dok se oleani više vezuju za seriju *Dasyphylla*. Uticaj navedenih triterpenskih serija na nijanse lisne površine je svakako moguć uz detaljniju podelu stanja i detaljnije razmatranje obojenosti površine lista, što ovom prilikom nije razmatrano.



**Slika 47.** Asociranost pojave triterpena i serija roda *Sedum* u prostoru I i II korespondentne ose;  
(stanje kvalitativnih karaktera: 1-prisustvo, 0-odsustvo)



**Slika 48.** Asociranost pojave triterpena sa serijama roda *Sedum* i taksonima spoljnih grupa u prostoru I i II korespondentne ose; (stanje kvalitativnih karaktera: 1-prisustvo, 0-odsustvo)



**Slika 49.** Asociranost pojave triterpena i boje lisne površine kod serija roda *Sedum* u prostoru I i II korespondentne ose; (triterpeni: 1-prisustvo, 0-odsustvo; površina lista: zelena, glaukozna)

---

## 5. DISKUSIJA

---

Fitohemija u okviru istraživanja sekundarnih metabolita biljaka predstavlja jedan od značajnijih aspekata proučavanja biološke raznovrsnosti biljnog sveta. Rezultati fitohemijskih istraživanja pružaju svojevrstni doprinos u rešavanju taksonomskih i evolutivnih nedoumica, na različitim hijerarhijskim nivoima. Sistematika, kao disciplina koja objedinjuje taksonomske principe i evoluciju biljaka, je zasnovana na čitavom nizu različitih pristupa čiji je zajednički cilj formiranje filogenetskog stabla koje maksimalno odražava stepen srodnosti između biljaka (Marin, 2003). Jedan od pristupa je praćenje varijabilnosti sekundarnih metabolita na različitim nivoima klasifikacije koja se kroz multidisciplinarnost može uvrstiti u određeni sistem klasifikacije i postupak raznjašnjevanja filogenetstih odnosa.

Najveći rod familije Crassulaceae – *Sedum* je u okviru mnogih taksonomskih istraživanja definisan kao problematičan i kontraverzan takson. Rod je sa aspekta infrageneričke klasifikacije i definisanja filogenetskih odnosa najčešće istraživan na osnovu morfoloških, biohemijskih i molekularnih karaktera. Međutim, svako prethodno istraživanje je za sobom ostavljalo delimično nerazjašnjene odnose u okviru roda koji su predstavljali izazov za dalja istraživanja, dok je svako naredno istraživanje roda koristeći različite markere i tehnike analize podataka (usklađeno sa potrebama sistematike, odnosno filogenije) unapređivalo saznanja o pomenutom rodu. Diskusija prezentovanih rezultata predstavlja doprinos razjašnjanju odnosa u okviru roda *Sedum* posmatranih na nivou serija kao taksonomske kategorije.

### 5.1. Karakteri epikutikularnog voska predstavnika roda *Sedum*

Lisni epikutikularni voskovi predstavnika roda *Sedum* se najčešće karakterišu sadržajem derivata masnih kiselina (DMK) i triterpena. Obzirom na univerzalno prisustvo voskova u biljnom svetu, određivanje njegovog hemijskog sastava i razmatranje obrasca distribucije smatra se pouzdanim hemotaksonomskim kriterijumom na osnovu koga se može izvršiti klasifikacija taksona na različitim taksonomskim nivoima. Predstavnici roda *Sedum*

poseduju dobro razvijen sloj epikutikularnog voska. Razmatrajući distribuciju i varijabilnost DMK evropskih vrsta pomenutog roda, *Stevens* i saradnici (1994a) su došli do zaključka da se *n*-alkanski i triterpenski obrazac distribucije izdvaja u odnosu na distribuciju drugih karaktera voska prema značajnosti za sistematiku. Inače, u okviru grupe DMK, kod evropskih vrsta roda su identifikovani i alkoholi, aldehidi, ketoni, masne kiseline i estri. Alkoholi i masne kiseline (C<sub>16</sub>-C<sub>34</sub>) su okarakterisani kao karakteri sa najmanjim sadržajem u vosku. Od svih identifikovanih estara (C<sub>42</sub>-C<sub>50</sub>), estri palmitinske i stearinske kiseline, C<sub>46</sub> i C<sub>48</sub> estri su najdominantniji. Od identifikovanih dugolančanih aldehida, sa parnim brojem C-atoma su dominantni C<sub>30</sub>, C<sub>32</sub> i C<sub>34</sub>. Pored normalnih alkana, identifikovani su i račvasti alkani (*i*-C<sub>31</sub> i *i*-C<sub>33</sub> sa najvećim sadržajem). Triterpenska frakcija sadrži: ursansku, oleansku, lupansku, tarakseransku, multifloransku i fernansku seriju.

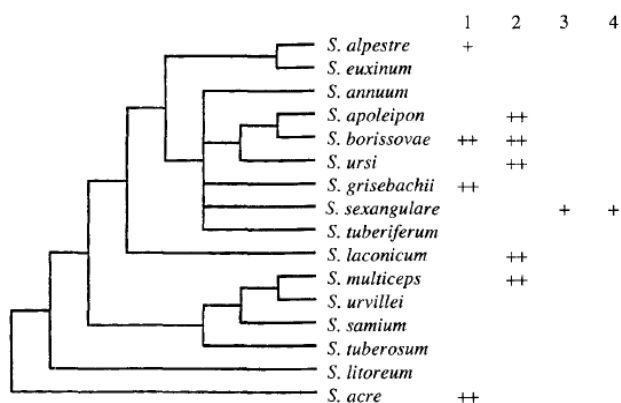
Razmatrajući distribuciju serije *n*-alkana od C<sub>20</sub> do C<sub>35</sub> (prilog 3) primećuje se da je ukupan prosečni sadržaj *n*-alkana sa neparnim brojem C-atoma veći u odnosu na sadržaj *n*-alkana sa parnim brojem C-atoma; među njima, sadržaj C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> i C<sub>33</sub> kod nekih serija premašuje 10%. Ova pojava je već uočena i opisana u biljnom svetu (Marin, 2003) i u slučaju evropskih vrsta roda *Sedum* (*Stevens*, et al. 1994a, 1994b). U slučaju triterpenskih serija, oleanska serija se izdvaja prema distribuciji i značajnom sadržaju u voskovima ispitivanih vrsta.

Generalno, može se opisati nekoliko oblika distribucije ispitivanih karaktera epikutikularnih voskova kod vrsta roda *Sedum* zastupljenih u centralnom delu Balkanskog poluostrva:

1. Prosečan sadržaj C<sub>31</sub> *n*-alkana značajno manji od sadržaja C<sub>33</sub> *n*-alkana:
  - a. Prosečan sadržaj triterpena je nizak (*Acria*, *Alpestria*, *Litorea* i *Sedella*).
  - b. Prosečan sadržaj triterpena je značajan (*Aithales*, *Rupestria*, *Cepaea*, *Glauco-rubens* i *Magellensia*).
2. Prosečan sadržaj C<sub>31</sub> *n*-alkana značajno veći od sadržaja C<sub>33</sub> *n*-alkana:
  - a. Odsustvo triterpenske frakcije, dok je prosečan sadržaj C<sub>29</sub> *n*-alkana veći od prosečnog sadržaja C<sub>33</sub> *n*-alkana (*Stefco* i *Rubra*).
  - b. Odsustvo triterpenske frakcije, dok je prosečan sadržaj C<sub>29</sub> *n*-alkana je blizak sadržaju C<sub>33</sub> *n*-alkana (*Alba*).
  - c. Odsustvo triterpenske frakcije, dok je prosečan sadržaj C<sub>29</sub> *n*-alkana je manji od sadržaja C<sub>33</sub> *n*-alkana (*Dasyphylla*).

Obrazac distribucije komponenti epikutikularnih voskova kod roda *Sedum* je primenom osnovnih statističkih metoda, pre svega klaster analizom, delimično već ispitivan

(Stevens, et al. 1994a). Rezultati pomenutih istraživanja naglašavaju ulogu C<sub>33</sub> *n*-alkana (C<sub>31</sub> ili C<sub>35</sub> drugi po procentu zastupljenosti) u smislu značajnog hemotaksonomskog markera za morfološki kompleksnu grupu taksona iz serija *Acria*, *Alpestria*, *Litorea*, *Alba* i *Rupestria*, kao i serija *Lydia* i *Pedicellata*, čiji predstavnici nisu obuhvaćeni grupom ispitivanih balkanskih taksona). Može se reći da su napred navedeni oblici distribucije ispitivanih karaktera u određenoj meri u skladu sa publikovanim podacima. Serije *Alpestria* i *Acria* se povezuju sa niskim sadržajem triterpena, dok je situacija kod serije *Rupestria* obrnuta. Nedoslednost se primećuje u slučaju serije *Alba*. Kod balkanskih predstavnika ove serije C<sub>31</sub> *n*-alkan je dominantan, ali se osim njega i C<sub>29</sub> *n*-alkan karakteriše relativno visokim sadržajem u vosku. Istraživanje Harta (1995), koje je imalo za cilj definisanje filogenetskih odnosa unutar grupe *Sedum acre*, je, pored drugih ispitivanih markera, predstavilo distribuciju triterpena kod taksona pomenute grupe (slika 49). Za razliku od rezultata predstavljenih u ovoj doktorskoj disertaciji, predstavnik serije *Litorea* ne sadrži ni jednu od ispitivanih triterpenskijh serija. Takođe ne postoji slaganje u distribuciji triterpena kod predstavnika serija *Alpestria* i *Acria* (Jovanović, et al. 2016; 't Hart, 1995).



**Slika 50.** Distribucija triterpena u voskovima *Sedum acre* grupe.  
1 i 2 – Triterpeni lupanskog tipa; 3 – ursani i 4 – oleani ('t Hart, 1995).

U razmatranja ukupnih sadržaja *n*-alkana i triterpena, moguće je izdvojiti tri specifična obrasca njihove distribucije.

1. Prosečni sadržaj normalnih alkana je veći od 90 %:
  - a. Prosečan sadržaj triterpena je nizak; *Acria*:  $\bar{X}=1,86\pm 3,22$ .
  - b. Odsustvo triterpenske frakcije; *Alba* i *Stefco*.
2. Prosečni sadržaj normalnih alkana se nalazi između vrednosti 50 i 90 %:
  - a. Prosečan sadržaj triterpena je nizak; *Alpestria*:  $\bar{X}=0,88\pm 2,00$  i *Sedella*:  $\bar{X}=0,10\pm 0,00$ .

b. Prosečan sadržaj triterpena je značajan; *Magellensia*:  $\bar{X}=12,50\pm 0,06$  i *Rupestria*:  $\bar{X}=12,69\pm 19,06$ .

3. Prosečni sadržaj normalnih alkana je manji od 50 %:

a. Prosečan sadržaj triterpena je veći od 50%; *Glauco-rubens*:  $\bar{X}=58,03\pm 11,06$ , *Aithales*:  $\bar{X}=52,21\pm 0,11$  i *Dasyphylla*:  $\bar{X}=51,13\pm 13,36$ .

## 5.2. Karakteri metanolnog ekstrakta predstavnika roda *Sedum*

Osim komponenti epikutikularnog voska i alkaloida, jedinjenja fenolnog tipa su često istraživana u okviru roda *Sedum*, kako zbog činjenice da se neka farmakološka dejstva povezuju sa prisustvom ovih sekundarnih metabolita, tako i zbog primene u hemosistematici. *Stevens* i saradnici (1996) su istraživali varijabilnost flavonoida kod evro-azijskih predstavnika rodova *Sedum* i *Sempervivum* koji se smatraju međusobno bliskim u filogeneskom smislu. Aglikoni su, u pomenutoj studiji, izolovani iz vegetativnih delova biljaka nakon postupka kisele hidrolize, a kvantifikovani i analizirani pomoću hromatografskih i spektroskopskih metoda. Rezultati pomenute studije ukazuju na karakterističan oblik distribucije proantocijana i flavonola u okviru roda *Sedum*. Pored navedenih jedinjenja, u okviru aglikona flavonolnog tipa, vrlo često su distribuirani i 3'-*O*-metil-, 8-hidroksi- i 8-*O*-metil derivati miricetina, kvercetina i kemferola.

Osim navedenih, i druge komponente fenolnog tipa su značajne u hemotaksonomskom smislu, na primer galna kiselina ('t *Hart*, 1999). Prisustvo ili odsustvo galne kiseline kod predstavnika roda *Sedum* podržava infrageneričku klasifikaciju roda, koja je izvedena na bazi hibridizacionog obrasca taksona i stoji u korelaciji sa morfološkim karakteristikama. Serija *Aithales* se karakteriše prisustvom galne kiseline, što je potvrđeno i kod ispitivanih balkanskih vrsta, kod kojih prosečni sadržaj galne kiseline iznosi oko 12,83 %. Prema publikovanim podacima serija *Dasyphylla* se ne karakteriše uniformnim distribucijom ovog markera. Balkanski predstavnici, naprotiv, sadrže galnu kiselinu u svim ispitivanim uzorcima, pri čemu se neuniformnost može pripisati varijabilnosti datog jedinjenja čija koncentracija varira u opsegu od 4,64 do 11,68 %.

U slučaju balkanskih vrsta roda *Sedum*, ispitivana je distribucija komponenti metanolnog ekstrakta koja, u najvećoj meri, pripadaju grupi jedinjenja fenolnog tipa. Lista identifikovanih jedinjenja u tabeli 8. Na osnovu deskriptivnih statističkih parametara (prilog 3), tj. prosečnih vrednosti odabranih jedinjenja primećuje se da su polarnije komponente

dominantno prisutne kod većine ispitivanih serija. To se naročito odnosi na komponentu II koja je kod ispitivanih taksona zastupljena iznad 10 %, izuzimajući serije *Cepaea* i *Stefco* kod kojih je sadržaj ove komponente manji od 10 %. One se karakterišu visokim sadržajem heterozida.

### 5.3. Testiranje statističke značajnosti

Kao što je već napomenuto, fokusiranost na distribuciju i varijabilnost dugolančanih *n*-alkana i triterpenskih serija kod predstavnika roda je proizišla iz obrasca njihove distribucije. Analiza varijanse (ANOVA) omogućava da se iz grupe *n*-alkana i triterpenskih serija izdvoje ili označe karakteri sa najvećim značajem.

Prilikom testiranja statističke značajnosti, izdvojio se veliki broj značajnih karaktera epikutikularnog voska. Međutim, među njima se kao, najznačajnija izdvaja je oleanska serija triterpena ( $F_{(12,81)}=25,45$ ), koja ostvaruje najveći doprinos u razlikovanju analiziranih grupa taksona. U slučaju metanolnog ekstrakata, takvu ulogu ima komponenta XIII. U slučaju razmatranja komponenti epikutikularnog voska i metanolnog ekstrakta zajedno, ispostavilo se da je navedena komponenta metanolnog ekstrakta statistički najznačajnija u diferencijaciji grupa. Međutim, ukoliko se sagledaju sve statistički značajne komponente, ne mogu se izostaviti komponente voska koje se karakterišu visokim F vrednostima, kao što su oleani i C<sub>33</sub> za koje je  $F_{(11,58)} > 20$ . U slučaju ukupnih sadržaja karaktera ekstrakata, odnosno *n*-alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta, sva tri karaktera su označena kao statistički značajna, pri čemu se ukupan sadržaj triterpena ima najveću F vrednost ( $F_{(10,58)}=36,23$ ).

### 5.4. Analiza glavnih komponenti

Kao što je već obrazloženo u prethodnom poglavlju, rezultati PCA su sistematizovani u zavisnosti od nivoa, odnosno grupe taksona za koju je sagledavana varijabilnost karaktera. Shodno tome, varijabilnost karaktera se na specifičan odrazila na grupisanje ispitivanih taksona u individualnim slučajevima.

Ispitivanjem karaktera epikutikularnog voska dobijeni su rezultati koji objašnjavaju više od 50 % ukupne varijabilnosti (slika 23). Iako većina predstavnika pokazuje jasne tendencije grupisanja na nivou serija, upadljiva je disperzija taksona koji pripadaju serijama *Rupestria* i *Alpestris*. Navedene činjenice ukazuju da se *n*-alkani i triterpeni ne mogu koristiti



kao pouzdani taksonomski markeri u svim slučajevima, i da je za preciznije određivanje njihove taksonomske pozicije neophodno uljučiti markere iz drugih grupa jedinjenja. Sa druge strane, visoka varijabilnost komponenti epikutikularnih voskova ukazuje na prirodnu heterogenost serija *Rupestria* i *Alpestria* i otvara prostor dalje taksonomske diferencijacije u okviru pomenutih serija. Kod ispitivanih predstavnika serije *Rupestria* sadržaj *n*-alkana čija je srednja vrednost veća od 5 % varira u velikoj meri (prilog 2). Na primer, opseg C<sub>33</sub> *n*-alkana je 28,69-62,81 %. Takođe je primećena značajna varijabilnost i u pogledu sadržaja triterpena oleanске i tarakseranske serije (na primer, oleani variraju u opsegu 0,00-61,01 %) kao i u slučaju zastupljenijih karaktera metanolnog ekstrakta II, V, XI (na primer za komponentu II je opseg variranja 4,55-43,70 %).

Uvođenjem spoljnih grupa u analizu (poseban slučaj PCA, slika 26) ne dolazi do značajnijeg pregrupisanja i promena odnosa između serija roda *Sedum*. Njihova bliža pozicija na dijagramu ukazuje na hemotaksonomsku homogenost grupe koju serije formiraju. Posmatranje relacija sa drugim rodovima ukazuje na izvestan stepen njihove samostalnosti u odnosu na rod *Sedum*. Na nivou ispitivanih markera, rod *Hylotelephium* pokazuje poseban oblik varijabilnosti, pri čemu se u znatnoj meri odvajaju svih od serija roda *Sedum*. Izdvajanje taksona *Hylotelephium* se može pripisati karakterističnom sadržaju nižih *n*-alkana, naročito C<sub>24</sub>, koji je nešto viši u vosku datog predstavnika spoljnih grupa u odnosu na ostale ispitivane uzorke. Inače se kao i ostali karakteriše visokim sadržajem C<sub>33</sub>, zatim C<sub>31</sub> i C<sub>29</sub> *n*-alkana, kao i odsustvom triterpenske frakcije. Hemotaksonomsko izdvajanje roda *Hylotelephium* pruža potvrdu novijim morfo-anatomskim i molekularnim dokazima koji ukazuju na potrebu razdvajanja rodova *Hylotelephium* i *Sedum*, što je naglašeno u literaturi novijeg datuma (*Thiede i Egli, 2007*). Iako je na nivou epikutikularnih voskova izdvajanje ostalih taksona spoljne grupe nešto manje upadljivo, može se reći da pokazuju značajan nivo taksonomske samostalnosti u odnosu na kompaktnu grupu koju čine predstavnici roda *Sedum*.

Rezultati testiranja karaktera metanolnog ekstrakta objašnjavaju nešto manji procenat varijabilnosti ukupnog uzorka (<50 %). Razlika u odnosu na primenu prethodnih markera se ogleda pre svega u značajnom izdvajanju serije *Magellensia* u odnosu na ostale formirane grupe serija koje ispoljavaju tendenciju gravitiranja u okviru iste taksonomske celine (slika 24). Sličan oblik varijabilnosti markera metanolnog ekstrakta pre svega odlikuje taksone iz serija *Dasyphylla*, *Acria* i *Sedella*. Spoljnih grupa su pokazale manji ili veći afinitet u odnosu na relativno homogenu grupu koju u analizi formiraju serije roda *Sedum*. U odnosu na ovaj tip markera, rod *Crassula* se izdvaja u najvećoj meri, potom i *Echeveria*, dok

je rod *Kalanchoe* relativno blizak sa pojedinim taksonima roda *Sedum* kao što su serije *Alpestria* i *Aithales* (slika 27).

Kao što je već pomenuto, istraživanje koje je ispitivalo odnose između predstavnika tri roda familije Crassulaceae: *Sedum*, *Sempervivum* i *Jovibarba* na osnovu distribucije flavonoidnih aglikona korišćenjem PCA (Stevens, et al. 1996) pokazalo je da je flavonoidni obrazac za rod *Sedum* prilično varijabilan sa visokim nivoom paralelizma. Naime, izdvojila su se 3 hemotipa čime je potvrđena primenljivost aglikona na nivou roda kao taksonomske kategorije. Takođe, na infrageneričkom nivou, iz velikog broja predstavnika roda *Sedum*, izdvojila se serija *Rupestria*, deo serije *Alpestria*, *S. album* i vrsta *S. brevifolium*. Serija *Rupestria* se na osnovu jedinstvenog obrasca flavonoida, triterpena i morfoloških karaktera izdvaja u odnosu na ostale predstavnike potfamilije Sedoidea, što je potvrđuju i rezultati ove studije. Ova serija se karakteriše jedinstvenom kombinacijom tri aglikona: kvercetin i miricetin, uz minimalnu količinu limocitrina. Iako je serije *Alpestria* okarakterisana i na homogenom obrascu distribucije alkaloida, podeljenost predstavnika iste serije na osnovu flavonoida prepisuje se prisustvu seksanguleretina kao karaktera sa ograničenom distribucijom u okviru serije. *S. album* se karakteriše prisustvom kvercetina, gosipetina, herbecetina i izoramnetin glikozida. Generalno, kvercetin, kemferola i limocitrin su aglikoni koji su najčešće identifikovani kod ostalih ispitivanih predstavnika roda. Kod balkanskih vrsta serija *Alpestria* opažen je fenomen rasutosti, dok se deo predstavnika serije *Rupestria* blisko grupisao; predstavnici serije *Alba* su međusobno relativno blisko grupisani, ali su takođe bliski i sa predstavnicima drugih serija. U slučaju ispitivanih balkanskih predstavnika istog roda, spoljna grupa *Kalanchoe* je bliska sa serijama roda *Sedum*.

Taksonomska heterogenost serija *Rupestria* i *Alpestria* je nešto slabije ispoljena u slučaju istovremenog testiranja markera metanolnog ekstrakta i markera voska (slika 25). Naime, u datom slučaju se primećuje bolje grupisanje taksona u okviru navedenih serija u odnosu na obe ose analize glavnih komponenti. Takođe, rezultati analize ukazuju na grupisanje serija *Dasyphylla*, *Magellensia*, *Cepaea* i *Glauco-rubens* (navesti na bazi koje komponente ili komponenti). Obrazac koji podrazumeva primenu svih karaktera objašnjava mali deo ukupne varijabilnosti uzorka, što ukazuje na nisku pouzdanost. Uvođenje spoljnih grupa u analizu ukazuje na jasno odvajanje rodova *Echeveria* i *Crassula*, dok je *Kalanchoe* i u ovom slučaju blizak sa rodom *Sedum*, u najvećoj meri sa serijama *Acria* i *Rupestria* (slika 28).

U slučaju ukupanih sadržaja *n*-alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta kao karaktera, dobijeni rezultati se mogu shvatiti kao veoma reprezentativni, jer objašnjavaju

veoma visok nivo varijabilnosti uzorka koji iznosi gotovo 97,19 % (slika 29). Kao rezultat analize, formirano je nekoliko taksonomskih entiteta u okviru roda *Sedum*. U prvom slučaju se izdvaju predstavnici serija *Dasyphylla*, *Glauco-rubens* i *Aithales* koji čine prvu grupu. Druga grupa povezuje serije *Alpestria*, *Sedella*, *Stefco*, *Acria* i *Alba*, dok serija *Magellensia* odlikuje intermedijarnom pozicijom pokazujući nejasan afinitet ka pomenutoj grupi serija. Serija *Cepaea* je jasno izdvojena. Serija *Rupestria* karakteriše izraženom varijabilnošću analiziranih karaktera, jer su se njeni predstavnici rasporedili između prve dve grupe. Primena kombinovanog obrasca jasnije ističe izdvojenost taksona spoljne grupe u odnosu na predstavnike roda *Sedum* (slika 30), pri čemu se je posebno upadljivo izdvajanje roda *Echeveria*. Rod *Crassula*, iako se odlikuje karakterističnim oblikom varijabilnosti ispitivanih markera, u izvesnoj meri pokazuje sličnost sa grupom koju čine predstavnici serija *Alba* i *Alpestria*. Korišćenjem većeg broja markera je pozitivno uticalo na pouzdanost analize, ali i na definisanost pozicije pojedinih taksona čiji položaj nije bio dovoljno jasan u prethodnim analizama. Kao primer se može navesti rod *Kalanchoe* koji se, za razliku od prethodnih analiza, u većoj meri diferenciran u odnosu na ostale elemente, pre svega pojedine serije roda *Sedum* sa kojima je pokazivao bliskost posmatrano kroz varijabilnost samo jednog tipa markera.

## 5.5. Diskriminantna analiza i klaster analiza

Grupisanje taksona roda *Sedum* na osnovu sličnosti u obliku varijabilnosti odabranih hemijskih karaktera epikutikularnog voska i metanolnog ekstrakta prikazano je i primenom kanonijske diskriminante analize koja naglašava razlike između unapred definisanih grupa, u ovom slučaju serija pomenutog roda. Diskriminacija taksona iz različitih taksonomskih grupa, tj. serija je razmatrana na istom broju uzoraka, kao i u slučaju PCA, odnosno u prisustvu ili odsustvu tzv. spoljnih grupa. Takođe, izračunate su i Mahlanobisove distance koje su korišćene za dobijanje klastera naglašavajući sličnost između elemenata u analizi, pri čemu je raspored klada u klasteru u najvećoj meri ekvivalentan rasporedu grupa u dvodimenzionalnom prikazu CDA rezultata. Kombinovanje dve navedene metode daje jasniju sliku o grupisanju serija i pruža potpuniji uvid u taksonomske odnose.

Rezultati diskriminantne analize na osnovu sadržaja *n*-alkana i triterpena u epikutikularnim voskovima je prikazana na slici 31. Validnost rezultata se može oceniti kao zadovoljavajuća, jer je objašnjeno nešto više od 50 % ukupne varijabilnosti. Ovako visok

nivo objašnjene varijabilnosti na nivo dve pomenute kanonijske ose govori o nesumnjivom taksonomskom značaju karaktera koji svojim koeficijentima vrše njihovo opterećenje. Rezultati kanonijske diskriminantne analize na nivou sekcija, uključujući prikazivanje na nivou centroida, ukazuju da se svi taksoni roda *Sedum* mogu podeliti u 3, manje ili više kompaktne grupe. Na pomenuto definisanje grupa uticala je varijabilnost sledećih karaktera: C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>-C<sub>33</sub>, C<sub>34</sub>, C<sub>35</sub> i oleanska serija. Prvoj grupi pripadaju serije *Rupestria*, *Cepaea*, *Glauco-rubens* i *Aithales*; drugu grupu čine predstavnici serije *Dasyphylla*, dok treću grupu čine serije *Sedella*, *Alpestria*, *Litorea*, *Acria*, *Alba*, *Stefco*, *Magellensia* i *Rubra*. U okviru prve grupe, *Glauco-rubens* i *Aithales* su međusobno bliže orjentisane, dok se *Rupestria* blago odvojila. Isti slučaj je sa serijama *Sedella* i *Rubra* iz treće grupe. Uvođenje spoljnih grupa taksona dovodi do značajnog smanjenja distanci između serija roda *Sedum*, što naglašava njihovu taksonomsku bliskost, ali i promene pozicija pojedinih serija (slika 34). U datom slučaju serija *Magellensia* je donekle izdvojena u odnosu na druge serije. Suprotno od očekivanog, rod *Hylotelephium* se kao jedan od elementa spoljnih grupa neočekivano priključio serijama roda *Sedum*. Pregrupisanje elementa u ovom slučaju naglašava promenu značaja koji su navedeni hemotaksonomski markeri imali u predhodnoj analizi. Odnosno, u formiranju relacija na višem, pre svega intergeneričkom nivou, dolazi do naglašavanja uloge novih taksonomskih markera. Iz grupe pomenutih jedinjenja sada značajniju ulogu igraju: C<sub>22</sub>-C<sub>26</sub>, C<sub>29</sub>-C<sub>35</sub> i oleanska serija. Ostali analizirani rodovi familije Crassulaceae se na osnovu varijabilnosti istih markera znatno udaljavaju od serija roda *Sedum*, pri čemu se rod *Crassula* u najvećoj meri distancira od ostalih. Obrazac varijabilnosti na nivou serija pokazuje nešto drugačiji raspored pojedinačnih elemenata i formiranja grupa u klaster analizi. Na prikazanom kladogramu (slika 39) se vidi upadljivo izdvajanje serije *Litorea*, što je već komentarisano u prethodnom poglavlju. Nakon uključivanja rodova iz spoljne grupe formira se klaster (slika 42) koji ukazuje na pravilnost taksonomskih tendencija u okviru familije na višem nivou.

Diskriminacija grupa na osnovu komponenti metanolnog ekstrakta u daleko većoj meri ukazuje na formiranje entiteta predstavljenih u vidu daleko kompaktnijih grupa koje čine serije roda *Sedum* (slika 32). Navedena slika govori o daleko većoj ulozi koju imaju markeri metanolnih ekstrakata u odnosu na elemente kutikularnih voskova. Validnost rezultata dobijenih na ovom obrascu je veća u odnosu na CDA u kojoj su karakterima epikutikularnog voska serije *Dasyphylla*, *Acria*, *Stefco*, a zatim i *Magellensia* i *Cepaea* izdvojene u najvećoj meri. Ostale serije su se blisko rasporedile na dijagramu i formiraju jednu grupu, pri čemu se samo serija *Alba* donekle izdvaja iz nje. Kao i u slučaju testiranja

markera epikutikularnih voskova, uvođenje spoljnih grupa u izvesnoj meri menja sliku diferencijacije taksona. Zapravo, rodovi *Crassula* i *Echeveria* se odlikuju sličnošću u pogledu vrednosti koeficijenta CDA (tabela 21) sa većim brojem serija, naročito u odnosu na komponentu II. U skladu sa opštim trendom varijabilnosti rod *Kalanchoe* se diferencirala zajedno sa serijama *Cepaea* i *Magellensia* u odnosu na ostale grupe (slika 35). Na izdvajanje pomenutog roda u najvećoj meri utiče jedinstven sadržaj komponente XVI. Klaster analiza se u velikoj meri slaže sa slikom taksonomskih odnosa koju pruža CDA, pri čemu su serije *Dasyphylla* i *Acria* prikazane kao međusobno najbližije, dok serija *Litorea* ponovo izdvojena. Klaster analiza na nivou spoljnih grupa (slika 43) jasnije naglašava taksonomsku bliskost roda *Kalanchoe* sa serijama *Magellensia* i *Cepaea*, dok su rodovi *Crassula* i *Echeveria* i u ovoj analizi prikazani kao bliži sa serijama roda *Sedum*.

Testiranjem obrasca varijabilnosti koji uključuje sve karaktere dolazi do izrazitog grupisanja ispitivanih taksona koje je u skladu sa njihovom pripadnošću datoj seriji. *Dasyphylla*, *Acria* i *Magellensia*, su se ipak, na nivou grupe fitohemijskih karaktera jasno izdvojile u odnosu na ostale serije. Uvođenjem spoljnih grupa ukazuje na još veći nivo taksonomske individualnosti roda *Sedum* u odnosu na druge predstavnike familije Crassulaceae, osim serija *Magellensia*, *Dasyphylla* i *Acria* koje su u smislu hemotaksonomske individualnosti već komentarisane. Predstavnici koji pripadaju drugim potfamilijama, kao što su *Crassula* i *Kalanchoe* su na bazi obe grupe markera pokazali očekivan nivo autentičnosti. Rod *Echeveria* je, u skladu sa svojom tradicionalnom pozicijom u okviru istog tribusa sa rodom *Sedum*, pozicionirana zajedno sa serijama *Stefco* i *Sedella*. Imajući u vidu na visok procenat objašnjene varijabilnosti, može se reći da je validnost rezultata dobijenih CDA analizom na zadovoljavajućem nivou. Dendrogram konstruisan na osnovu distanci vrednosti u matrici ukazuje na donekle drugačiji model varijabilnosti (slika 41) unutar roda, što je donekle uočljivo i na nivou diskriminantnih skorova centroida (slika 33). Serije *Acria* i *Dasyphylla* su izdvojene na najvećoj vrednosti distance, što je drugačije od CDA koja ukazuje na njihovu relativnu taksonomsku bliskost sa serijama *Sedella* i *Stefco*. Iako je serija *Magellensia* u najvećoj meri diferencirana u odnosu na ostale grupe u okviru CDA, ovde je približena većini serija, pokazujući najveću sličnost sa serijom *Rupestria*. Na sličnost njihove taksonomske pozicije u najvećoj meri ukazuju hemotaksonomski markeri označeni u tabeli 22. Kladogram sa spoljnim grupama, upadljivo izdvaja rod *Crassula*, dok se *Kalanchoe* nalazi u grupi sa serijama *Acria* i *Dasyphylla*. U skladu sa već iznetim činjenicama o njegovoj poziciji rod *Echeveria*, je najmanje izdvojen takson spoljne grupe. Kao pripadnik tradicionalno izdvojenog tribusa Sedeeae, nalazi se u grupi sa ostalim serijama

roda *Sedum*, pri čemu naročitu sličnost ispoljava u odnosu na serijom *Glauco-rubens*. Njegova sličnost sa serijom *Glauco-rubens*, ali i većim brojem ostalih serija roda *Sedum* u velikoj meri je zasnovana na sličnosti u obliku varijabilnosti triterpena oleanskog tipa, što je ispoljeno i u drugom analizama. Sa druge strane specifičnost roda *Echeveria* se ogleda kroz upadljivo prisustvo pre svega oleana, a potom i tarakserana, što ga u taksonomskom smislu čini bližim seriji *Rupestria* ali i rodu *Kalanchoe*.

Slika taksonomskih relacija u okviru roda *Sedum* na osnovu ukupanih sadržaja *n*-alkana, triterpenskih serija komponenti metanolnog ekstrakta kao karaktera predstavljena je na dijagramima (slike 37. i 38). Prikaz je zasnovan na visokoj validnosti rezultata diskriminante analize, koja je u ovom slučaju podržana sa preko 90% objašnjene varijabilnosti uzorka. Razmatranje isključivo na nivou roda *Sedum* ukazuje na upadljivije izdvajanje nekoliko grupa elemenata u analizi. Predstavnici različitih serija roda *Sedum* su u odnosu na ukupne sadržaje vrednosti komponenti formirale dve grupe u velikoj meri jasno izdvojenih elemenata. Prvu grupu grade serije *Alba*, *Acria*, *Alpestria*, *Sedella* i *Stefco*, drugu čine serije *Aithales*, *Glauco-rubens* i *Dayphylla*, dok serije *Rupestria* i *Magellensia* odlikuje intermedijerna pozicija. Grupe su definisane na osnovu razlika u varijabilnosti triterpena. Serija *Cepaea* pokazuje izvestan nivo taksonomske samostalnosti izdvajajući se na bazi varijabilnosti i sadržaju komponenti metanolnih ekstrakata, dok se po sadržaju ostalih komponenti približava grupi koju čine serije *Aithales*, *Glauco-rubens* i *Dayphylla*. Rezultati klaster analize skoro u potpunosti podržavaju takvu sliku taksonomskih odnosa na infrageneričkom nivou (slika 45). Uvođenjem spoljnih grupa, snažno naglašava diferencijaciju rodova *Crassula* i *Echeveria* sa jedne strane, i roda *Kalanchoe* i svih serija roda *Sedum* sa druge strane. Izdvajanje grupa je zasnovano pre svega na varijabilnosti *n*-alkana i triterpena. Takođe, potrebno je naglasiti da se taksonomska diferencijacija *Crassula* i *Echeveria* prvenstveno ogleda kroz prisustvo i varijabilnost triterpenskih serija u epikutikularnom vosku. Dok se rod *Echeveria* karakteriše izuzetno visokim sadržajem triterpena i niskim sadržajem *n*-alkana, *Kalanchoe* u vosku sadrži oko devet puta niži sadržaj triterpena i daleko veći sadržaj *n*-alkana. Poseban slučaj u pogledu sadržaja ova dva karaktera je izdvojio rod *Crassula* u najvećoj meri, koja se karakteriše visokim sadržajem *n*-alkana i izostankom triterpena iz voska. Pomalo neočekivana sličnost roda *Kalanchoe* i većeg broja taksona roda *Sedum*, zasnovana je na podudarnosti u obliku varijabilnosti *n*-alkana i triterpena. U prvoj grupi elementa se u vidu zasebne taksonomske celine, ponovo na bazi sadržaja triterpenske frakcije, diferencija grupa serija koju čine *Aithales*, *Glauco-rubens* i *Dayphylla*. Iako diskretno izdvojena, serija *Cepaea* i u ovom slučaju ispoljava taksonomske

tendencije ka grupi koju čine serije *Aithales*, *Glauco-rubens* i *Dayphylla*. Rezultati klaster analize (slika 46) u velikoj meri potvrđuju već objašnjenu sliku diferencijacije. Interesantno je da ova klaster analiza ukazuje da rod *Kalanchoe*, kada se posmatra u grupi analiziranih taksona, takođe ima nejasnu taksonomsku poziciju u odnosu na dve glavne grupe taksona. U tom smislu on se pridružuje serijama *Rupestris* i *Magellensis* čiji predstavnici ispoljavaju upadljiv nivo heterogenosti i taksonomske nedefinisanosti u većini analiza.

## 5.6. Korespondentna analiza

Prema nekim istraživanjima, glaukozan izgled površine lista dovodi se u vezu sa sastavom epikutikularnog voska – kod trava, familija Gramineae, vezuje se za sadržaj  $\beta$ -diketona, dok kod roda *Dudleya* (Crassulaceae) za sadržaj triterpena (Manheim, et al. 1979). Stevens i saradnici su, proučavajući epikutikularne voskove evropskih vrsta roda *Sedum*, takođe konstatovali vezu između stanja (izgleda) površine lista i sadržaja (prisustva i odsustva) triterpena u voskovima (Stevens, et al. 1994b). Generalno, prisustvo triterpena kod potfamilije Sedoideae je u korelaciji sa bojom, odnosno izgledom površine listova. Naime, utvrđeno je da voskovi izolovani sa površine sjajnih i zelenih listova ne sadrže triterpene ili ih sadrže u veoma malim količinama. U drugom slučaju, voskovi koji su izolovani sa površina listova koji se pruinozni ili glaukozni sadrže triterpene obilato. Fitohemijaska analiza, zajedno sa analizom strukture voska, je nagovestila povezanost između triterpenske frakcije u lisnim voskovima i strukture voska koja posmatrana na velikom uvećanju (SEM) otkriva prisustvo raznovrsnih voštanih ultrastruktura, kao i generalnu hrapavost površne lista. Multivarijantne statističke analize voska ukazuju da se sjajna površine listova pojedinih vrsta iz serije *Rupestris* odlikuju niskim sadržajem triterpena ili njihovim odsustvom, te su listovi prekriveni amorfnim slojem voska. Sa druge strane, pojava voštanih mikrostruktura na amorfnom sloju povezuje se sa visokim sadržajem triterpena, što površini lista daje glaukozan izgled. Ovaj fenomen nije univerzalno prisutan u biljnom svetu, jer postoje primeri (*Eucaliptus*, *Malus*, *Prunus* i dr.) sa amorfnim slojem voska koji je bogat triterpenima (Stevens, et al. 1994b; Hart, et al. 1999).

Zahvaljujući specifičnosti u izgledu površine lista različitih predstavnika roda *Sedum* iz centralnog dela Balkanskog poluostrva, izdvojeno je nekoliko tipova obojenosti lisne površine. Tako se na primer *Sedum rupestre* i *S. dasyphyllum* odlikuju odlikuju sivoplavom (glaukoznom) površinom, *S. ochroleucum* i *S. rubens* i *S. urvileii* sivozelenom, dok vrste kao

što su *S. alpestre*, *S. grisebachii* i *S. litoreum* imaju poseduju izrazito svetlo zelene lisne površine. Pomenuti karakteri u kvalitativnom smislu već sami po sebi mogu biti upotrebljeni u sklopu karakterizacije pojedinačnih taksona. Međutim, povezivanje opisanih stanja kvalitativnih karaktera sa prisustvom ili odsustvom određenih frakcija u sastavu epikutikularnih voskova predstavlja set osobina koje mogu biti upotrebljene u potpuno nezavisnom taksonomskom razmatranju statusa taksona, kako na nivou roda, tako i na višim taksonomskim nivoima. Rezultati korespodentne analize ukazuju na jasan obrazac povezanosti asociranost između kvalitativnih osobina listova ispitivanih taksona i sastava njihovog epikutikularnog voska. Posmatranje varijabilnosti pojedinih karaktera, ukazuje na frekvencu njihovog stanja i nivo asociranosti sa drugim karakteristikama u analizi. Rezultati multivarijantne korespodentne analize koja rezultira u pozicioniranju pojedinih karaktera u prostorima korespodentnih osa ukazuju na nekoliko oblika asociranosti elementa. U zavisnosti od tipa odabranih setova karaktera uočeni su sledeći obrasci udruženosti navedenih kvalitativnih karaktera:

Kada je razmatra distribucija (prisustvo ili odsustvo) triterpenske frakcije na nivou ispitivanih serija roda *Sedum*, može se primetiti izdvajanje tri do četiri grupe elemenata: serije *Stefco*, *Acria*, *Alpestris*, *Alba* i *Rubra* su jasno asocirane sa potpunim izostankom triterpena u epikutikularnim voskovima; serije *Dasyphylla*, *Cepaea*, *Magellensia* i *Litorea* sa izostankom triterpena, ali ih odlikuje povremeno prisustvo oleanske serije; Serije *Glauco-rubens* i *Aithales* su karakterišu se visokom asociranošću sa prisustvom lupanske serije, kao i sa prisustvom oleanske serije u pojedinim slučajevima (slika 47). Dva poslednja slučaja se mogu shvatiti i kao jedna slabo hemotaksonomski diferencirana grupa koju povezuje prisustvo lupana kao hemotaksonomskog markera. Prisustvo tarakseranske serije predstavlja hemotaksonomski marker koji na prilično jasan način izdvaja predstavnike serija *Rupestris* i *Sedella* u odnosu na ostale razmatrane grupe taksona. Značaj tarakseranske serije u diferencijaciji roda *Sedum* je u skladu sa već publikovanim rezultatima, pri čemu je njihova taksonomska uloga dokazana na nivou serije *Rupestris* (Stevens, et al. 1994b). U pomenutoj studiji, u PCA analizi, su se jasno odvojile vrste sa sjajnom, zelenom površinom lista od onih koji imaju glaukozan izgled. Grupisanje je bilo uslovljeno odsustvom (ili malim procentom, 0-5 %) i obilatom prisustvom (4-62 %) triterpena u voskovima. Oleanska serija se karakteriše kao marker od manjeg značaja obzirom da je asocirana sa većinom taksona ispitivanih serija. Generalno, predstavljeni obrazac diferencijacije na nivou serija ukazuje na veliku ulogu pojave triterpena u voskovima koji sve predstavnike balkanskih vrsta roda *Sedum* deli u dve glavne taksonomske celine.



Uključivanje rodova iz spoljnih grupa taksona ukazuje na sličan obrazac varijabilnosti posmatranih kvalitativnih karaktera, pre svega na nivou posmatranih serija. Produkt analize ukazuje da se rod *Crassula* asocira sa predstavnicima roda *Sedum* koje karakteriše odsustvo tripterpena, odnosno vosak u čijem sastavu dominiraju *n*-alkani. Rodovi *Kalanchoe* i *Echeveria* asociraju se sa serijama *Rupestria* i *Sedella*, šireći grupu taksona koji se izdvajaju po prisustvu tarakseranske serije u vosku (slika 48).

Demonstrirana je povezanost prisustva terpena i stanja obojenosti lisne površine kod balkanskih vrsta roda *Sedum* (slika 49). Obrazac varijabilnosti kvalitativnih osobina, ukazuje da prisustvo triterpena u epikutikularnim voskovima utiče na pojavu glaukoznog izgleda površine lista kod ispitivanih taksona. Sa druge strane njihovo odsustvo, kod većeg broja serija gde spadaju: *Alba*, *Alpestris*, *Acria*, *Stefco*, *Cepaea*, *Litorea*, *Magellensia* i *Rubra* povezuje se sa pojavom svetlije ili tamnije zeleno obojenih listova, često sa karakterističnim odsjajem na površini. U studiji Stivensa i saradnika (1994a), dokazano je da pojava sjajnih i zeleno obojenih listova kod predstavnika serije *Alpestris* povezana sa izostankom triterpenskih serija u vosku. Rezultati ove doktorske disertacije, u skladu sa podacima iz literature ('t Hart, et al. 1999), ukazuju da je prisustvo triterpena u voskovima u znatnoj meri povezano sa pojedinim osobinama biljaka, kao i sa klasifikacijom roda *Sedum* koja može da se izvede na osnovu hibridizacionog obrasca njegovih taksona. Iz svih navedenih razloga, triterpeni se mogu smatrati vrednim markerima koji se mogu koristiti u sagledavanju varijabilnosti i hemotaksonomskoj diferencijaciji pomenutog roda.

---

## 6. ZAKLJUČAK

---

Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje varijabilnosti sekundarnih metabolita odabranih predstavnika roda *Sedum* (Crassulaceae) sa teritorije centralnog Balkanskog poluostrva u hemotaksonomske svrhe. Na osnovu prezentovanih rezultata može se zaključiti sledeće:

- *n*-Alkani sa neparnim brojem C-atoma su dominantno prisutni u voskovima svih ispitivanih predstavnika serija roda *Sedum* i spoljnih grupa. Među njima, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> i C<sub>33</sub> su najzastupljeniji. U pogledu distribucije triterpenskih serija, oleanska serija triterpena je, često u najznačajnijem procentu, prisutna u voskovima. Na osnovu obrasca zastupljenosti *n*-alkana i triterpena, utvrđeno je da ukoliko voskovi dominantno sadrže *n*-alkane, sadržaj triterpena je niži, i obratno. Prisustvo polarnih komponenti kod ispitivanih vrsta se može oceniti kao značajno i široko zastupljeno; komponenta II se može okarakterisati kao opšte prisutna u metanolnim ekstraktima ispitivanih uzoraka. Sadržaj aglikona u ekstraktima je izuzetno nizak, dok su fenolne kiseline i heterozidi dominantno prisutni.

- Testiranjem statističke značajnosti izdvojio se veći broj značajnih karaktera u okviru svih ispitivanih obrazaca, međutim, generalno govoreći, karakteri sa najvećim doprinosom u razlikovanju analiziranih grupa taksona jesu triterpeni, odnosno oleanska serija i komponenta XIII metanolnog ekstrakta.

- Opisana varijabilnost i način grupisanja ispitivanih taksona na nivou serija ili na višem taksonomskom nivou (nivo roda, kada su uključeni i predstavnici spoljne grupe) zavisi od vrste primenjenih karaktera i tipa analize.

- Visoka varijabilnost ispitivanih karaktera voska i metanolnog ekstrakta u sklopu PCA analize je rezultovala tendencijom grupisanja na nivou serija. Izuzetak su predstavnici serija *Rupestris* i *Alpestris* kod kojih je uočen fenomen disperzije elemenata, te se *n*-alkani i triterpeni ne mogu koristiti kao pouzdani taksonomski markeri u svim analiziranim slučajevima. Osim toga, ovakav oblik grupisanja ukazuje na heterogenost u okviru pomenutih serija i implicira dalju diferencijaciju u okviru dve pomenute serije. Uključivanje predstavnika drugih rodova ukazuje na hemotaksonomsku homogenost ispitivanih serija roda *Sedum*, pri čemu je obrazac varijabilnosti jasniji kada se analiziraju samo karakteri voska.

- Reprezentativnost dobijenih rezultata je ipak najveća kada su kao hemotaksonomski markeri korišćeni ukupni sadržaji *n*-alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta, dok je najniži nivo reprezentativnosti uočen kod obrasca sa karakterima metanolnog ekstrakta i svim karakterima zajedno.

- Razlike između ispitivanih taksona u CDA i klaster analizi su uočljivije u poređenju sa drugim analizama, a dobijeni rezultati su daleko reprezentativniji. Rezultati CDA i klaster analize u velikoj meri prikazuju sličan način grupisanja. Najbolja slika diferencijacije grupa na nivou serija je postignuta na osnovu svih karaktera, zatim na nivou metanolnog ekstrakta i voska, dok je najslabija diskriminacija primećena kod obrasca koji podrazumeva distribuciju ukupnih sadržaja *n*-alkana, triterpena i komponenti metanolnog ekstrakta. Iako je u svim slučajevima postignuta visoka reprezentativnost rezultata (CDA), njihova pouzdanost je najveća kada se kao markeri koriste ukupni sadržaja *n*-alkana, triterpenskih serija i komponenti metanolnog ekstrakta, a najmanja izdvojenom primenom markera epikutikularnog voska.

- Rezultati korespondentne analize ukazuju na postojanje jasnog modela varijabilnosti kvalitativnih karaktera. Obrazac varijabilnosti je nedvosmisleno uslovljen prisustvom, odnosno odsustvom triterpenske frakcije u epikutikularnom vosku, što se odražava na jasnu razdvojenost grupa. Prisustvo određenih triterpenskih serija u vosku ne samo da utiče na boju površine lista, već ostvaruje značajnu ulogu u diferencijaciji taksona u okviru roda *Sedum*.

---

## 7. LITERATURA

---

- Abdi H., Valentin D., in „Encyclopedia of Measurement and Statistics“, Ed. Salkind N., SAGE Publications, Inc., **2007**.
- Adams R.P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Illinois, **2007**.
- Bahmani M., Golshahi H., Saki K., Rafieian-Kopaei M., Delfan B., Mohammadi T., *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **2014**, 4(2):687-692.
- Bai Y., Lu H., Zhang Ge, Wu Cunzao, Lin Chengcheng, Liang Yong, Chen Bicheng, *Life Sciences*, **2014**, 105(1-2):22-30.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S., *Food Chemistry*, **2006**, 99(1):191-203.
- Balick M.J., Cox P.A., Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany, Scientific American Library, **1997**.
- Barthlott W., Neinhuis C., Cutler D., Ditsch F., Meusel I., Theisen I., Wilhelmi H., *Botanical Journal of the Linnean Society*, **1998**, 126(3):237-260.
- Barthlott W., Neinhuis C., *Planta*, 1997, 202(1):1-8.
- Bewick V., Cheek L., Ball J., *Critical Care*, **2004**, 8(2):508-512.
- Bianchi G., Vlahov G., Anglani C., Murelli C., *Phytochemistry*, **1992**, 32(1):49-52.
- Bohm B.A., Introduction to flavonoids, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, **1998**.
- Bojović S., Mitrović S., Biostatistika - primena statističkih metoda u biologiji, Institut za šumarstvo, Beograd, **2010**.
- Bojović S., Sarac Z., Nikolić B., Tesević V., Todosijević M., Veljić M., Marin P., *Chemistry and Biodiversity*, **2012**, 9(12):2761-2774.
- Bopda O.S.M., Longo F., Bella T.N., Edzah P.M.O., Taiwe G.S., Bilanda D.C., Tom E.N.L., Kamtchoung P., Dimo T., *Journal of Ethnopharmacology*, **2014**, 153(2):400-407.
- Brcanović J., Pavlović A., Mitić S., Stojanović G., Manojlović D., Kalicanin B., Veljković J., *Food Technology And Biotechnology*, **2013**, 51 (4):460-470.
- Bush R.T., McInerney F.A., *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2013**, 117:161-179.
- Byalt V. V., *Russian Journal of Biological Invasions*, **2011**, 2, (2-3):155-157.
- Carrasco V., Pintoa L.A., Wolff Cordeiro K., Lima Cardosoc C.A., de Cássia Freitas K., *Journal of Ethnopharmacology*, **2014**, 158(A):345-351.
- Carrillo-Reyes P., Sosa V., Mort M.E., *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **2009**, 53(1):267-276.
- Catchpole O., Mitchell K., Bloor S., Davis P., Suddes A., *Fitoterapia*, 2015, 106:167-174.
- Chiang H.-M., Chena H.-C., Wua C.-S., Wub P.-Y., Wena K.-C., *Journal Of Food And Drug Analysis*, **2015**, 23(3):359-369.

- Chiang H.-M., Chien Y.-C., Wu C.-H., Kuo Y.-H., Wu W.-C., Pan Y.-Y., Su Y.-H., Wen K.-C., *Food and Chemical Toxicology*, **2014**, 65:129-139
- Cushman J.C., *Plant Physiology*, **2001**, 127(4):1439-1448.
- Da Silva M.S de Sousa D.P., de Medeiros V.M., Folly M.A.B., Tavares J.F., Barbosa-Filho J.M., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2008**, 36(5-6):500-503.
- Dai J., Mumper R.J., *Molecules*, **2010**, 15(10):7313-7352.
- Daszykowski M., Kaczmarek K., Vander Heyden Y., Walczak B., *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2007**, 85(2):203-219.
- Dedon P.C., Tannenbaum S.R., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2004**, 423(1):12-22.
- Denton M.F., *Brittonia*, 1982, 34(1):48-77.
- Denton M.F., *Brittonia*, **1994**, 46(4):296-308.
- Dewick P.M., *Natural Product Reports*, **2002**, 19:181-222.
- Domínguez E., Cuartero J., Heredia A., *Plant Science*, **2011**, 181(2):77-84.
- Dos Santos H.T.L., de Oliveira A.M., de Melo P.G., Freitas W., Rodrigues de Freitas A.P., *Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences*, InTech, **2013**.
- Dunn W.B., Ellis D.I., *Trends in Analytical Chemistry*, **2005**, 24(4):285-294.
- Ereshefsky M., in „A Companion to the Philosophy of Biology“, Ed. Sahotra, Plutynski A., Blackwell Publishing Ltd., **2008**.
- Fang S.-D., Yan X.-Q., Li C.-F., Fan Z.-Y., Xu X.-Y., Xu J.-S. *Kexue Tongbao*, **1979**, 24:431-432.
- Fisher M.J., Marshall A.P., *Australian Critical Care*, **2009**, 22(2):93-97.
- Gajić M., *Sedum L.* in „Flora SR Srbije IV“, Ed. Josifović M., SANU, Beograd, **1972**.
- Gan G., Ma C., Wu J., *Data Clustering: Theory, Algorithms, and Applications*, Copyright, American Statistical Association and the Society for Industrial and Applied Mathematics, **2007**.
- García S., Heinzen H., Hubbuch C., Martínez R., de Vries X., Moyna P., *Phytochemistry*, **1995**, 39(6):1381-1382.
- GBIF Data Portal, 2011 <http://www.gbif.org/species/2406> i <http://www.gbif.org/species/5361975>
- Gleason P., Boushey C., Harris J., Zoellner J., *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, **2015**, 115(7):1072-1082.
- Gontcharova S.B., Artyukova E.V., Gontcharov A.A., *Russian Journal of Genetics*, 2006, 42(6):654-661.
- Gontcharova S.B., Gontcharov A.A., *Genes, Genomes and Genomics*, **2007**, 1(1):40-46.
- Gontcharova S.B., Gontcharov A.A., *Molecular Biology*, **2009**, 43(5):794-803.
- Gottlieb O.R., *Journal of ethnopharmacology*, 1982, 6(2):227-238.
- Grant W.F., *Plant Biosystematics*, Academic Press, Canda, **1984**.
- Grecco S.S., Gimenes L., Ferreira M.J.P., Romoff P., Favero O.A., Zalewski C.A., Lago J.H.G., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2010**, 38(6):1234-1237.
- Guo Sh., Duan J., Tang Y., Qian Y., Zhao J., Qian D., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2011**, 39(4-6):880-882.

- Harborne J.B., Introduction to Ecological Biochemistry, Academic Press London, UK, **1993**.
- Harborne J.B., Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall, New York, **1998**.
- He A., Wang M., Hao H., Zhang D., Lee K.-H., *Phytochemistry*, **1998**, 49(8):2607-2610.
- Hegnauer R., *Phytochemistry*, **1986**, 25(7):1519-1535.
- Heredia A., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2003**, 1620:1-7.
- Heredia A., Domínguez E., in „Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in East European Countries“, Ed. Dishovsky C., Pivovarov A., Springer Science + Business Media B.V., 2009.
- Hernández Vázquez L., Palazon J., Navarro Ocaña A., in „Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health“, Ed. Rao V., CC BY 3.0 license, **2012**.
- Hoang K.-D. T., Huynh K.-C. T., Nguyen T.-D., *Bioorganic Chemistry*, **2015**, 63:45-520.
- Humphrey A.J., Beale M.H., in „Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet“, Ed. Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H., Blackwell Publishing Ltd., **2006**.
- Ieri F., Innocenti M., Andrenelli L., Vecchio V., Mulinacci N., *Food Chemistry*, **2011**, 125(2):750-759.
- Iglesias A.A., Gonzalez D.H., Andreo C.S., *Biochemical Education*, **1987**, 15(3):111-115.
- Jeffree, C.E., Baker, E.A., Holloway, P.J. (1976) in „Microbiology of Aerial Plant Surfaces“, Ed. Dickinson C.H., Elsevier Inc., **1976**.
- Jefree C.E., Sandford A.P., *New Phytologist*, **1982**, 91(3):549-559.
- Jovanović S., Zlatković B., Stojanović G., *Chemistry and Biodiversity*, **2016**, 13(4):459-65.
- Jovanović S., Zlatković B., Stojanović G., *Chemistry and Biodiversity*, 2015, 12(5):767-780.
- Julkunen-Tiitto R., *Phytochemistry*, **1986**, 25(3):663-667.
- Jung H.-J., Kang H.-J., Seon Song Y., Park E.-H., Kim Y.-M., Limb C.-J., *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, 116(1):138-143.
- Kang T.H., Pae H.O., Yoo J.C., Kim N.Y., Kim Y.C., Ko G.I., Chung H.T., *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, 70 (2):177-182.
- Kim J.H., 't Hart H., Stevens J.F., *Phytochemistry*, **1996**, 41(5):1319-1324.
- Kirby J., Nishimoto M., Chow R.W.N., Baidoo Edward E.K., George W., Martin J., Schackwitz W., Chan R., Fortman J.L., Keasling J.D., *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1):130-138.
- Koch K., Barthlott W., *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, **2009**, 367(1893):1487-1509.
- Koch K., Bhushan B., Barthlott W., *Progress in Materials Science*, **2009**, 54(2):137-178.
- Koch K., Bhushan B., Barthlott W., *Soft Matter*, **2008**, 4:1943-1963.
- Kolattukudy P.E., In „Biopolymers Online“, Ed. Steinbüchel A., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, **2005**.

- Korul'kin D.Y., *Chemistry of Natural Compounds*, **2001**, 37(3): 219-223.
- Kovačević N., Osnovi farmakognozije, Srpska školska knjiga, Beograd, Srbija, **2004**.
- Kumar S., i Pandey A.K., *The Scientific World Journal*, **2013**, 1-16.
- Kunst L., Samuels L., *Current Opinion in Plant Biology*, **2009**, 12(6):721-727.
- Kunjin F., Ohba H., *Flora of China*, 2001, 8:202-268.
- Kuzuyama T., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **2002**, 66(8):1619–1627.
- Lake R., Optimized RP-HPLC Method for Hydroxybenzoic Acids. Balanced Retention for a Range of Polarities, Using an Ultra Aqueous C18 Column, Copyright Restek Corporation, **2016**.
- Lakhal H., Kabouche A., Magid A.A., Voutquenne-Nazabadioko L., Harakat D., Kabouche Z., *Phytochemistry*, **2014**, 102:145-151.
- Lavrieux M., Jacob J., LeMilbeau C., Zocatelli R., Masuda K., Bréheret J-G. , Disnar J-R., *Organic Geochemistry*, 2011, 42, 1315-1323.
- Lee H.S., in „Food Analysis by HPLC“, Ed. L.M.L. Nollet, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, **2000**.
- Lemieux B., *Trends in plant science*, **1996**, 1(9):312-318.
- Lix L.M., Sajobi T.T., *Frontiers in Psychology*, 2010, 1(146):1-9.
- Lovrić M., Osnovi statistike, Ekonomski fakultet, Kragujevac, **2008**.
- Maffei M., Badino S., Bossi S., *Journal of Biological Research*, **2004**, 1(1):3-19.
- Maffei M., Badino S., Rossi S., *Journal of Biological Research*, **2004**, 1(1):3-19.
- Maffei M., *Biochemical Systematics and Ecology*, **1994**, 22(7):711-728.
- Maffei M., *Biochemical Systematics and Ecology*, **1996a**, 24(6):531-545.
- Maffei M., *Biochemical Systematics and Ecology*, **1996b**, 24(1):53-64.
- Mallavadhani U.V., Panda A.K., Rao Y.R., *Phytochemistry*, **1998**, 49(4):901-951.
- Mallavadhani U.V., Panda A.K., Rao Y.R., *Phytochemistry*, **1998**, 49(4):901-951.
- Manheim B.S. Jr., Mulroyt T.W., Hogness D.K., Kerwin J.L., *Biochemical Systematics and Ecology*, **1979**, 7(1):17-19.
- Marin P., Biohemijska i molekularna sistematika, izdavač Miroslav Damjanović, Beograd, Srbija, **2003**.
- Mark H., Workman J., in „Chemometrics in Spectroscopy“, Ed. Mark H., Workman J., Elsevier B.V., **2007**.
- Mayuzumi S., Ohba h., *Systematic Botany*, **2004**, 29(3):587-598.
- Medina E., Aguiar G., Gómez M., Aranda J., Medina J.D., Winter K., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2006**, 34(4):319-326.
- Mehrotra R. S., Aggarwal A., Plant Pathology, Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi, India, **2003**.
- Mekonnen A., Sidamo T., Asres K., Engidawork E., *Journal of Ethnopharmacology*, **2013**, 145(3):638-646.
- Míka V., Kubáň V., Klejdus B., Odstrčilová V., Nerušil P. *Plant Soil And Environment*, **2005**, 51(11):506-512.
- Miller J.N., Miller J.C., Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Printed by Ashford Colour Press Ltd., Gosport, UK, **2010**.

- Mitić S., Paunović D., Pavlović A., Tosić S., Stojković M., Mitić M., *International Journal Of Food Properties*, **2014**, 17(4):908-922.
- Mitić V., Stankov-Jovanović V., Dimitrijević M., Cvetković J., Simonović S., Nikolić-Mandić S., *Fruits*, **2014**, (69):413-422.
- Mohd Hafiz I., Hawa Z.E.J., Asmah R., Zaharah A.R. 2011, *Molecules*, **2011**, 16:162-174.
- Morikawa T., Ninomiya K., Zhang Y., Yamada T., Nakamura S., Matsuda H., Muraoka O., Hayakawa T., Yoshikawa M., *Phytochemistry Letters*, **2012**, 5(1):53-58.
- Mort M.E., Levens N., Randle C.P., Van Jaarsveld E., Palmer A., *American Journal of Botany*, **2005**, 92(7):1170-1176.
- Mort M.E., Soltis D.E., Soltis P.S., Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A., *American Journal of Botany*, **2001**, 88(1):76-91.
- Moss W.W., Hendrickson J.A., *Annual Review of Entomology*, **1973**, 18:227-258
- Nahrstedt A., Walther A., Wray V., *Phytochemistry*, **1982**, 21(1):107-110.
- National Institute of Standards and Technology – NIST Chemistry WebBook, Nist Standard Reference database; Available from: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- National Institute of Standards and Technology – NIST Chemistry WebBook, Nist Standard Reference database; Available from: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Niu X.F., Liu X., Pan L., Qi L., *Fitoterapia*, 2011, 82(7):960-963
- Niu Y., Luo H., Suna C., Yang T-Y., Donga L., Huang L., Chen S., *Gene*, **2014**, 533(1): 295-303.
- Nogrady T., in „Chapter Rotifera VIII: A Comparative Approach“, Ed. Wurdak E., Wallace R., Segers H., *Hydrobiology* 387/388, Kluwer Academic Publishers, **1998**.
- Nollet L.M.L., Toldra F., *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*, CRC Press, Taylor and Francis group, **2012**.
- Ohmoto, T., Ikuse, M., Natori S., *Phytochemistry*, **1970**, 9(10):2137-2148.
- Okuda T., Yoshida T., Hatano T., Iwasaki M., Kubo M., Orime T., Yoshizakia M., Naruhashi N., *Phytochemistry*, 1992, 31(9):3091-3096.
- Oliveri P., Forina M., In „Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications“, Ed. Picó Y., Academic Press Elsevier Inc., **2012**.
- Osborne R., Stevens J.F., 1996, *Phytochemistry*, **1996**, 42(5):1335-1339.
- Pant P., Rastogi R., *Phytochemistry*, **1979**, 18(7):1095-1108.
- Parente E., in „Encyclopedia of Dairy Sciences“, Ed. Fuquay J.W., Elsevier Ltd., **2011**.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A., *Phylogenetics & Evolutionary Biology*, **2014**, 2(2):131-140.
- Pedersen J.A., *Biochemical Systematics and Ecology*, **1982**, 10(1):3-9.
- Pedersen J.A., *Biochemical Systematics and Ecology*, 2000, 28(3):229-253.
- Perić-Grujić A., *Osnovi hemometrije*, TMF, Beograd, **2012**.
- Petrović S., Löscher R., Gorunović M.S., Merfort I., *Biochemical Systematics and Ecology*, **1999**, 27(6):651-656.
- Phillips D.R., Rasbery J.M., Bartel B., Matsuda S.P.T, *Current Opinion in Plant Biology*, **2006**, 9(3):305-314.



- Post-Beittenmiller D., 1996; *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **1996**, 47:405-430.
- Reicosky D.A., Hanover J.W., *Plant Physiology*, 1978, 62(1):101-104.
- Reinert F., Blankenship R.E., *Oecologia Australis*, **2010**, 14(2):359-368.
- Riedel M., Eichner A., Jetter R., *Planta*, **2003**, 218(1):87-97.
- Rieder M., in „Biology of the Plant Cuticle“, Ed. Riederer M., Muller C., *Annual Plant Reviews*, Wiley-Blackwell, **2006**.
- Robards K., *Journal of Chromatography A*, **2003**, 1000(1-2):657-691.
- Roberts R.A., Smith R.A., Safe S., Szabo C., Tjalkens R.B., Robertson F.M., *Toxicology*, **2010**, 276(2):85-94.
- Sakar M.K., Petereit F., Nahrstedt A., *Phytochemistry*, **1993**, 33(1):171-174.
- Saltan Çitoğlu G., Acıkara Ö.B., in „Biochemistry, Genetics and Molecular Biology“, Ed. Dhanarasu S., InTech, **2012**.
- Sato Y., Itagaki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T., Sugawara M., Iseki K., *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 403(1-2):136-138.
- Saxena M., Saxena J., Nema R., Singh D., Gupta A., *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2013, 1(6):168-182.
- Seigler D.S., *Plant secondary metabolism*, Springer Science+BusinessMedia New York, **1998**.
- Senthilkumar R., Chandran R., Parimelazhagan T., *Saudi Journal of Biological Sciences*, **2014**, 21(5):409-416.
- Sevindik H.G., Güvenalp Z., Özden Yerdelen K., Yuca H., Demirezer L.O., *Industrial Crops and Products*, **2015**, 76:873-879.
- Sharma O.P., *Plant Taxonomy*, Tata McGraw-Hill Education Pvt. Ltd., New Delhi, DELHI, India, **2009**.
- Sheean P.M., Bruemmer B., Gleason P., Harris J., Boushey C., Van Horn L., *Journal of the American Dietetic Association*, 2011, 111(1):103-110.
- Sieberl T.N., Petrini O., Greenacre M.J., *Systematic and Applied Microbiology*, **1998**, 21(3):433-41.
- Singh A.K., *Indian Journal of Science and Technology*, **2012**, 2(1):143-147.
- Singh G., *Plant Systematics: An Integrated Approach*, Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA, **2004**.
- Singh V., Jain D. K., *Taxonomy of Angiosperms*, Rajson Printers, New Delhi, India, **1981**.
- Slimestad R., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2003**, 31(11):1247-1255
- Sneath P.H.A., Sokal R.R., *Numerical taxonomy – the principles and practice of numerical classification*, W. H. Freeman and Company: San Francisco, USA, **1973**.
- Sneath P.H.A., *Systematic Biology*, 1995, 44(3):281-298.
- Sokal R.R., Sneath P.H.A., *Principles of Numerical Taxonomy*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, USA, **1963**.
- Soreanu G., Dixon M., Darlington A., *Chemical Engineering Journal*, **2013**, 229:585-594.
- Stace C., *New Flora of the British Isles*, Cambridge University Press, UK, **2010**.

- Stein S.E., National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectral Database and Software, Version 3.02, USA, **1990**.
- Stevens J.F., 't Hart H., Bolck A., Zwaving J.H., Malingre T.M., *Phytochemistry*, **1994a**, 35(2):389-399.
- Stevens J.F., 't Hart H., Hendriks H., Malingre T.M., *Phytochemistry*, **1992**, 31(11):3917-3924.
- Stevens J.F., 't Hart H., Hendriks H., Malingré T.M., *Phytochemistry*, **1992**, 31(11):3917-3924.
- Stevens J.F., 't Hart H., Hendriks H., Malingré T.M., *Plant Systematics and Evolution*, **1993**, 185(3/4):207-217.
- Stevens J.F., 't Hart H., Vanham C.H.J., Elema E.T., Vandenant M.M.V.X., Wildeboer M., Zwaving J. H., *Biochemical Systematics and Ecology*, **1995**, 23(2):157-165.
- Stevens J.F., 'T Hart H.T., Pouw, A.J.A., Bolck A., Zwaving J.H., *Phytochemistry*, **1994b**, 36(2): 341-348.
- Stevens J.F., 't Hart H., Elema E.T., Bolck A., *Phytochemistry*, **1996**, 41(2):503-512.
- Stevens J.F., 't Hart H., Elema E.T., Bolck A., *Phytochemistry*, **1996**, 41(2): 503-512.
- Stevens J.F., 'T Hart H., Van Ham R.C.H.J., Elema E.T., Van Den Ent M.M.V.X., Wildeboer M., Zwaving J.H., *Biochemical Systematics and Ecology*, **1995**, 23(2):157-165.
- Stojanović G., Jovanović S., Zlatković B., Djordjević A., Petrović G., Jovanović O., Stankov-Jovanović V., Mitić V., *Records of Natural Products*, **2014**, 8(3):272-276.
- Švehlíková V., Mráz P., Piacentec S., Marhold K., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2002**, 30(11):1037-1049.
- Takhtajan, A. *Flowering Plants*, Springer Science & Business Media B.V., Dordrecht, **2009**.
- Taylor P., 2011, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2011**, 16(4):326-334.
- Theodoulou F.L., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, 1465(1-2):79-103.
- Thiede J., Eggli U., in „Flowering Plants Eudicots“, Ed. Kubitzki K., Springer Berlin Heidelberg, Germany, **2007**.
- Thuong P.T., Kang H.J., Na M.K., Jin W.Y., Youn U.J., Seong Y.H., Song Kyung-Sik Min Byung-Sun, Bae K.H., *Phytochemistry* **2007**, 68(19):2432–2438.
- Tomaszewski D., Zielinski J., *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **2014**, 209(5-6):215–232.
- Tumbas V., Mandić A., Četković G., Đilas S., Čanadanović-Brunet J., *Acta Periodica Technologica*, **2004**, 35:1-280.
- Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., *Flora Europea: Psilotaceae to Platanaceae*, Cambridge University Press, **2010**.
- Van Den Dool H., Kratz P.D., *Journal Of Chromatography*, **1963**, 11:463-471.
- Van der Plas L.H.W., Eijkelboom C., Hagendoorn M.J.M., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **1995**, 43(2):111-116.
- Van Ham R.C.H.J., 't Hart H., *American Journal of Botany*, **1998**, 85(1):123-134.
- Van Maarseveen C., Jetter R., *Phytochemistry*, **2009**, 70(7):899-906.

- Veljković J., Pavlović A., Mitić S., Tosić S., Stojanović G., Kalicanin B., Stanković D., Stojković M., Mitić M., Brčanović J., *Journal Of Food And Nutrition Research*, **2013**, 52(1):12-24.
- Vernon K., *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, **2001**, 32(2):315-341.
- Vickery M.L., Vickery B., *Secondary Plant Metabolism*, Macmillan Education UK, **1981**.
- Vogt T., 2010, *Molecular Plant* , **2010**, 3(1):2-20.
- Vuković N., Spasić S., *Statistika za inženjere*, Univerzitet Singidunum, Beograd, **2011**.
- Walters S.M., in „Chemical Plant Taxonomy“, Ed. Swain T., Academic Press Inc., 1963.
- Wang M., Hao H., Zhang D., Lee K.-H, *Phytochemistry*, **1998**, 49(8):2607-2610.
- Wang Z., Yeats T., Han H., Jetter R., *The Journal Of Biological Chemistry*, **2010**, 285(39):29703-29712.
- Waterman P.G., *Phytochemistry*, **2007**, 68(22):2896-2903.
- Wilkins C.K., Bohm B.A., *Canadian Journal of Botany*, **1976**, 54(18):2133-2140.
- Wiley E.O., Lieberman B.S., *Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics*, Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Inc., **2011**.
- Williams S.G., Rayner J.P., Raynor K.J., *Urban Forestry & Urban Greening*, **2010**, 9(3):245-251.
- Wink M., *Phytochemistry*, **2003**, 64(1):3-19.
- Wink M., *Phytochemistry*, **2003**, 64(1):3-19.
- Wink M., Waterman P.G., in „Biochemistry of Plant Secondary Metabolism“, Ed. Wink M., *Annual Plant Reviews*, CRC Press, Boca Roton, FL, **1999**.
- Wojtaś-Wasilewska M., Trojanowski J., Luterek J., *Acta Biocimica Polonica*, **1983**, 30(3/4):291-302.
- Wolbis M., Królikowska M., *Phytochemistry*, **1988**, 21(12):3941-3943.
- Wolbis M., *Phytochemistry*, **1989**, 28(8):2187-2189.
- Xu T., Wang Z., Lei T., Lv C., Wang J., Lu J., *Fitoterapia*, **2015**, 101:125-132.
- Yea J., Liuc C., Zhao Z., Li Y., Yua S., *Ecological Engineering*, 2013, 55:29-34
- Yelland P.M., *The Mathematica Journal*, **2010**, 12:1-23.
- Zgórka G., Główniak K., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2001**, 26, 79-87.
- Zhang A., Wan L., Wu C., Fang Y., Han G., Li H., Zhang Z., Wang H., *Molecules*, **2013**, 18(11):14241-14257.
- Zuckerandl E. i Pauling L., in „Evolving Genes and Proteins“, Ed. Bryson V., Vogel H.J., Academic Press, New York, USA, **1965**.
- Zuckerandl E. i Pauling L., *Journal of Theoretical Biology.*, **1965**, 8(2):357-366.
- ’t Hart H., *Lagascaria*, **1997**, 19(1-2):93-100.
- ’t Hart H., van Ham R.D.H.J., Stevens J.F., Elema E.T., van der Klis H., Gadella T.W.J., *Biochemical systematics and ecology*, **1999**, 27(4):407-426.
- ’t Hart, *Bocconea*, 1995, 5(1):119-128.
- ’t Hart, *Flora Mediterranea*, **1991**, 1:31-61.

---

## 8. PRILOZI

---

**Prilog 1.** Pregled ispitivanih taksona porodice Crassulaceae sa podacima o vrsti ekstrakta, lokalitetu, godini sakupljanja biljnog materijala i prinosu voska

**Prilog 2.** Identifikacija predstavnika triterpenskih serija: oleani, tarakserani i lupani

**Prilog 3.** Rezultati deskriptivne statistike: serije roda *Sedum* i taksoni spoljnih grupa

**Prilog 4.** Stanja kvalitativnih karaktera konstituenata epikutikularnog voska i površine lista pojedinačnih uzoraka: vrste roda *Sedum* i komponente korišćene u korespondentnoj analizi

**Prilog 1.** Pregled ispitivanih taksona porodice Crassulaceae sa podacima o vrsti ekstrakta, lokalitetu, godini sakupljanja biljnog materijala i prinosu voska

**Prilog 1-1.** Pregled ispitivanih taksona roda *Sedum* sa podacima o vrsti ekstrakta, lokalitetu, godini sakupljanja biljnog materijala i prinosu voska

<u>Rod porodice Crassulaceae</u>							
Serijski broj	Vrsta	Podvrsta/Varijacija	Vrsta ekstrakta	Lokalitet	Godina	PV (%)	
<b><u>Sedum L.</u></b>	<b><u>Subfamilija Sempervivoideae Arn., tribus Sedeae Fr.</u></b>						
	<i>Sedum acre</i> L.		EV	Vitolište, Golema Skrka, Makedonija	2012.	0.09	
<i>Acria</i> Berger	<i>Sedum acre</i> L.		EV, ME	Rudnica, Kopaonik, Srbija	2012.	0.18	
	<i>Sedum acre</i> L.		EV, ME	Podvis, Knjaževac, Srbija	2012.	0.16	
	<i>Sedum acre</i> L.		EV, ME	Rtanj, Ledenička strana, Srbija	2012.	0.23	
<i>Alba</i> Berger	<i>Sedum album</i> L.	<i>album</i>	EV	Demir Kapija, Makedonija	2012.	0.32	
	<i>Sedum album</i> L.	<i>album</i>	EV, ME	Niševac, Svrljig, Srbija	2012.	0.16	
	<i>Sedum album</i> L.	<i>album</i>	EV, ME	Sićevačka Klisura, Višegrad, Srbija	2012.	0.25	
	<i>Sedum album</i> L.	<i>micranthum</i>	EV, ME	Kopaonik, Treska, Srbija	2012.	0.22	
	<i>Sedum album</i> L.	<i>micranthum</i>	EV, ME	Hortikultura, Ostrovica, Šar Planina, Srbija	2012.	0.09	
<i>Alpestris</i> Berger	<i>Sedum alpestre</i> Vill.		EV, ME	Stara Planina, Babin Zub, Srbija	2013.	0.81	
	<i>Sedum annuum</i> L.	<i>annuum</i>	EV	Prilep, Makedonija	2012.	0.19	
	<i>Sedum annuum</i> L.	<i>annuum</i>	EV	Crna Trava, Srbija	2012.	0.22	
	<i>Sedum annuum</i> L.	<i>annuum</i>	EV	Hortikultura, Sv. Prohor, dolina Pčinje, Srbija	2012.	0.18	
	<i>Sedum annuum</i> L.	<i>annuum</i>	EV, ME	Markovi Kuli, Prilep, Makedonija	2012.	0.16	
	<i>Sedum grisebachii</i> Boiss. & Heldr.		EV, ME	Hortikultura, Pomporovo, Bugarska	2012.	0.09	
	<i>Sedum grisebachii</i> Boiss. & Heldr.		EV, ME	Hortikultura, Crna Trava, Srbija	2012.	0.09	
	<i>Sedum grisebachii</i> Boiss. & Heldr.		EV, ME	Hortikultura, Brezovica, Šar Planina	2012.	0.08	
	<i>Sedum sexangulare</i> L.		EV, ME	Niševac, Svrljig, Srbija	2012.	0.18	
	<i>Sedum sexangulare</i> L.		EV, ME	Miljkovac, Knajževac, Srbija	2012.	0.16	
	<i>Sedum sexangulare</i> L.		EV, ME	Perućac, Derventa, Srbija	2012.	0.23	

	<i>Sedum tuberiferum</i> Stoj. & Stefanov	EV	Demir Kapija, Makedonija	2012.	0.21
	<i>Sedum tuberiferum</i> Stoj. & Stefanov	EV, ME	Hortikultura, Trgovište, dolina Pčinje, Srbija	2012.	0.09
	<i>Sedum tuberiferum</i> Stoj. & Stefanov	EV, ME	Prespa, Konjsko, Makedonija	2013.	0.98
	<i>Sedum urvillei</i> DC.	EV	Vitolište, Golema Skrka, Makedonija	2012.	0.39
	<i>Sedum urvillei</i> DC.	EV	Periklija, Grčka	2012.	0.23
	<i>Sedum urvillei</i> DC.	EV	Klisura Pčinje, Kastel, Makedonija	2012.	0.22
	<i>Sedum urvillei</i> DC.	EV, ME	Niševac, Svrljig, Srbija	2012.	0.15
	<i>Sedum urvillei</i> DC.	EV, ME	Sivec, Prilep, Makedonija	2012.	0.21
	<i>Sedum urvillei</i> DC.	EV, ME	Markovi Kuli, Prilep, Makedonija	2012.	0.16
	<i>Sedum urvillei</i> DC.	EV, ME	Zdunje, Makedonija	2012.	0.12
	<i>Sedum urvillei</i> DC.	EV, ME	Podvis, Knjaževac, Srbija	2012.	0.19
	<i>Sedum urvillei</i> DC.	EV, ME	Hortikultura, klisura reke Prizrenska Bistrica, Srbija	2012.	0.30
<b><i>Aithales</i></b> (Web & Berth) Hart	<i>Sedum rubens</i> L.	EV	Klisura Pčinje, Kastel, Makedonija	2012.	0.22
	<i>Sedum rubens</i> L.	EV	Bogdanci, Gevgelija, Makedonija	2012.	0.26
	<i>Sedum rubens</i> L.	EV	Katlanovska Banja, Makedonija	2012.	0.16
	<i>Sedum rubens</i> L.	EV, ME	Mariovo, Makedonija	2012.	0.12
<b><i>Cepaea</i></b> (Koch) Fröderström	<i>Sedum cepaea</i> L.	EV, ME	Klisura reke Babune, Veles, Makedonija	2013.	0.31
	<i>Sedum cepaea</i> L.	EV, ME	Katlanovo, Makedonija	2013.	0.04
<b><i>Dasyphylla</i></b> Hart	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	EV	Demir Kapija, Makedonija	2012.	0.18
	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	EV, ME	Niševac, Svrljig, Srbija	2012.	0.19
	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	EV, ME	Markovi Kuli, Prilep, Makedonija	2012.	0.15
	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	EV, ME	Peručac, Derventa, Srbija	2012.	0.31
	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	EV, ME	Zaovine, Spajići, Srbija	2012.	0.39
	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	EV, ME	Kotor, Orašac, Crna Gora	2013.	0.49
<b><i>Glauco-rubens</i></b> Fröderström	<i>Sedum hispanicum</i> L.	EV	Vitolište, Golema Skrka, Makedonija	2012.	0.11
	<i>Sedum hispanicum</i> L.	EV	Sv. Prohor, dolina Pčinje, Srbija	2012.	0.21
	<i>Sedum hispanicum</i> L.	EV	Katlanovska Banja, Makedonija	2012.	0.28
	<i>Sedum hispanicum</i> L.	EV, ME	Podvis, Knjaževac, Srbija	2012.	0.16

	<i>Sedum hispanicum</i> L.		EV, ME	Miljkovac, Knajževac, Srbija	2012.	0.18
	<i>Sedum hispanicum</i> L.	var. <i>minus</i>	EV, ME	Hortikultura, Niš, Srbija	2012.	0.20
	<i>Sedum hispanicum</i> L.	var. <i>minus</i>	EV, ME	Popšica, Srbija	2013.	0.24
	<i>Sedum hispanicum</i> L.		ME	Markovi Kuli, Prilep, Makedonija	2012.	0,12
<b>Litorea</b> Hart	<i>Sedum litoreum</i> Guss.		EV	Hortikultura, Parga, Grčka	2012.	0.12
<b>Magellensia</b> Hart	<i>Sedum magellense</i> Ten.	<i>olympicum</i> (Boiss.) Greuter & Burdet	EV, ME	Komovi, Kom Vasojevički, Crna Gora	2013.	0.13
<b>Rubra</b> Borissova	<i>Sedum caespitosum</i> (Cav.) DC.		EV	Štavica, Prilep, Makedonija.	2012.	0.11
	<i>Sedum caespitosum</i> (Cav.) DC.		EV	Sv. Prohor, dolina Pčinje, Srbija	2012.	0.13
	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix		EV	Katlanovska Banja, Makedonija	2012.	0.36
	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix		EV, ME	Sivec, Prilep, Makedonija	2012.	0.27
	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix		EV, ME	Zlatibor, Tornik, Srbija	2012.	0.47
	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix		EV, ME	Rtanj, Ledeninka strana, Srbija	2012.	0.33
	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix		EV, ME	Sićevačka Klisura, Višegrad, Srbija	2012.	0.24
<b>Rupestria</b> Berger	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix		EV, ME	Hortikultura, Kanjon Mrtvice, Crna Gora	2012.	0.12
	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix		ME	Zaovine, Spajići, Srbija	2012.	0.21
	<i>Sedum rupestre</i> L.	<i>rupestre</i>	EV, ME	Sićevačka klisura, Srbija	2012.	0.42
	<i>Sedum rupestre</i> L.	<i>rupestre</i>	EV, ME	Hortikultura, Niš, Srbija	2013.	0.98
	<i>Sedum amplexicaule</i> DC	<i>tenuifolium</i> (Sm.) Greuter	EV, ME	Dunje, Štavica, Makedonija	2012.	0.26
<b>Sedella</b> (Fourr.) Hart	<i>Sedum atratum</i> L.	<i>carinthiacum</i> (Pacher) D. A. Webb	EV, ME	Komovi, Kom Vasojevički, Crna Gora	2013.	0.28
	<i>Sedum stefco</i> Stefanov		EV, ME	Dunje, Štavica, Makedonija	2012.	0.15
<b>Stefco</b> Hart	<i>Sedum stefco</i> Stefanov		EV, ME	Sivec, Prilep, Makedonija	2012.	0.19
	<i>Sedum stefco</i> Stefanov		EV, ME	Markovi Kuli, Prilep, Makedonija	2012.	0.23

**Prilog 1-2.** Pregled ispitivanih taksona spoljne grupe sa podacima o vrsti ekstrakta, lokalitetu, godini sakupljanja biljnog materijala i prinosu voska

<b><u>Rod familije Crassulaceae</u></b>					
	Podvrsta/Varijetet	Vrsta ekstrakta	Lokalitet	Godina	PV (%)
<b><u>Echeveria DC.</u></b>	<u>Subfamilija Sempervivoideae Arn.,</u> <u>tribus Telephieae</u> <i>Echeveria lilacina</i> Kimn. et Moran	EV, ME	Hortikultura, Niš, Srbija	2012.	0.06
<b><u>Hylotelephium H. Ohba</u></b>	<u>Subfamilija Sempervivoideae Arn.,</u> <u>tribus Telephieae</u> <i>Hylotelephium telephium</i> (L.) H. Ohba	EV	Sv. Prohor, dolina Pčinje, Srbija	2013.	0.01
<b><u>Crassula L.</u></b>	<u>Subfamilija Crassuloideae Burnett</u> <i>Crassula ovata</i> (Miller) Druce	EV, ME	Hortikultura, Niš, Srbija	2013.	0.08
<b><u>Kalanchoe Adans.</u></b>	<u>Subfamily Kalanchoideae A. Berger</u> <i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym.-Hamet & H. Perrier	EV, ME	Hortikultura, Niš, Srbija	2013.	0.03

†Klasifikacija taksona na nivou familije prema Thiede i Egli (2007); pripadnost serijama roda *Sedum* prema sistemu koji je predložio 't Hart (1991).

†EV – epikutikularni vosak (heksanski ekstrakt); ME – metanolni ekstrakt; PV – prinos voska (% , w/w).



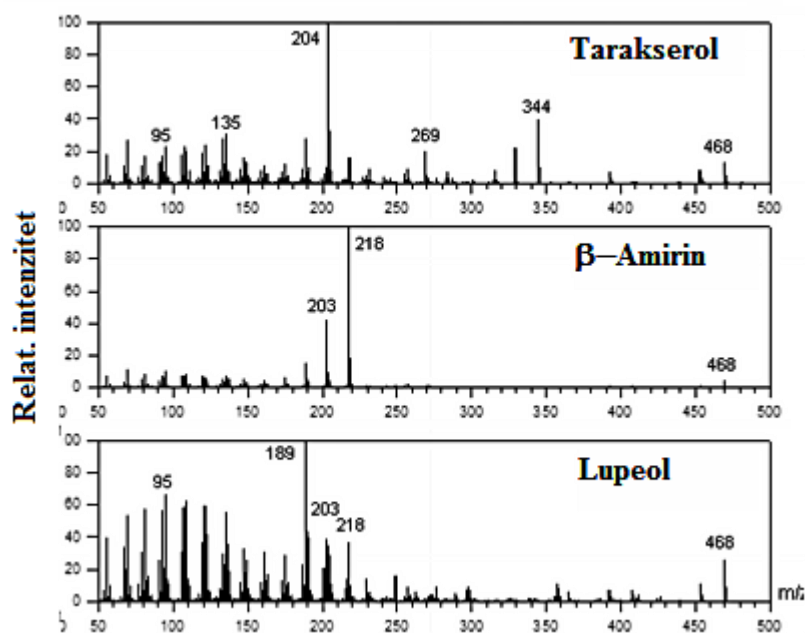
**Prilog 2.** Identifikacija predstavnika triterpenskih serija: oleani, tarakserani i lupani

Maseni fragmenti triterpena detektovanih u voskovima vrsta roda *Sedum* GC-EIMS tehnikom, predstavljeni kao m/z (relativan intenzitet):

Oleani.  $\alpha$ -Amirenil-acetat: 218 (100), 203 (17), 189 (30), 175 (19);  $\beta$ -amirenil-acetat: 218 (100), 203 (63), 189 (22), 175 (10); germanicil-format: 439 (4), 218 (15), 205 (39), 204 (83), 189 (92), 177 (100), 175 (28), 161 (23), 147 (22), 135 (35), 121 (53), 109 (55); germanicil-acetat: 218 (7), 204 (38), 189 (100), 177 (89).

Tarakserani. Tarakseril-format: 218 (8), 204(50), 189 (20), 175 (15); tarakseril-acetat: 453 (2), 344 (11), 329 (7), 218 (15), 205 (34), 204 (100), 189(30), 175(17), 161 (19), 147 (32), 135 (63); tarakseron: 300 (24), 285 (21), 204 (63), 189 (33), 175 (17), 133 (100). Pored navedenih, u voskovima su detektovani i ursani, multiflorani, fernani i lupani (*Stevens, et al. 1994a; Stevens, et al. 1994b*).

Na slici 52 je prikazan izgled masenih spektara pentacikličnih alkohola: tarakserola,  $\beta$ -amirina i lupeola (*Wang, et al. 2010*).



**Slika 51.** Maseni spektri pentacikličnih triterpena (*Wang, et al. 2010*)

**Prilog 3.** Rezultati deskriptivne statistike: serije roda *Sedum* i taksoni spoljne grupe

*Sedum* ser. *Acria* A.Berger

**Prilog 3-1.** Rezultati deskriptivne statistike serije *Acria* A.Berger: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	4	0.05	0.01	0.09	0.05
C <sub>21</sub>	4	0.03	0.01	0.09	0.04
C <sub>22</sub>	4	0.09	0.01	0.33	0.16
C <sub>23</sub>	4	0.13	0.00	0.38	0.18
C <sub>24</sub>	4	0.23	0.01	0.66	0.31
C <sub>25</sub>	4	0.12	0.00	0.33	0.16
C <sub>26</sub>	4	0.06	0.00	0.23	0.11
C <sub>27</sub>	4	0.90	0.10	3.06	1.44
C <sub>28</sub>	4	0.00	0.00	0.01	0.01
C <sub>29</sub>	4	0.94	0.41	2.25	0.87
C <sub>30</sub>	4	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>31</sub>	4	<b>8.82</b>	1.00	13.39	5.39
C <sub>32</sub>	4	1.90	1.59	2.39	0.37
C <sub>33</sub>	4	<b>70.38</b>	52.00	80.35	12.59
C <sub>34</sub>	4	0.49	0.23	0.69	0.22
C <sub>35</sub>	4	1.74	1.42	2.10	0.28
<b>Oleani</b>	4	1.74	0.00	5.57	2.64
<b>Lupani</b>	4	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	4	0.00	0.00	0.00	0.00

**Prilog 3-1a.** Rezultati deskriptivne statistike serije *Acria* A.Berger: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	3	1.50	0.00	2.93	1.47
<b>II</b>	3	<b>13.25</b>	5.82	22.53	8.51
<b>III</b>	3	<b>13.08</b>	7.01	16.78	5.30
<b>IV</b>	3	2.07	0.96	3.90	1.59
<b>V</b>	3	0.73	0.19	1.29	0.55
<b>VI</b>	3	<b>12.04</b>	0.49	19.16	10.09
<b>VII</b>	3	1.02	0.21	1.87	0.83
<b>VIII</b>	3	0.70	0.00	1.48	0.74
<b>IX</b>	3	2.48	1.60	4.08	1.39
<b>X</b>	3	1.30	1.10	1.48	0.19
<b>XI</b>	3	3.53	1.74	6.24	2.39
<b>XII</b>	3	<b>6.57</b>	4.20	9.56	2.73
<b>XIII</b>	3	2.52	1.60	4.20	1.45
<b>XIV</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>XV</b>	3	3.33	2.30	3.95	0.90
<b>XVI</b>	3	1.12	0.74	1.87	0.65

*Sedum ser. Alpestris* A.Berger

Prilog 3-2. Rezultati deskriptivne statistike serije *Alpestris*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	27	0.04	0.01	0.13	0.05
C <sub>21</sub>	27	0.08	0.01	0.44	0.12
C <sub>22</sub>	27	0.13	0.01	0.50	0.16
C <sub>23</sub>	27	0.23	0.01	0.81	0.24
C <sub>24</sub>	27	0.38	0.01	1.13	0.39
C <sub>25</sub>	27	0.31	0.01	0.90	0.26
C <sub>26</sub>	27	0.19	0.00	0.98	0.27
C <sub>27</sub>	27	1.19	0.17	2.78	0.75
C <sub>28</sub>	27	0.25	0.00	0.93	0.23
C <sub>29</sub>	27	9.04	0.43	21.13	6.95
C <sub>30</sub>	27	0.40	0.01	1.07	0.32
C <sub>31</sub>	27	<b>23.67</b>	4.66	45.81	12.09
C <sub>32</sub>	27	1.88	0.54	2.78	0.54
C <sub>33</sub>	27	<b>46.78</b>	14.39	71.94	18.73
C <sub>34</sub>	27	0.42	0.01	1.32	0.35
C <sub>35</sub>	27	2.47	0.01	6.62	1.62
<b>Oleani</b>	27	0.45	0.00	3.29	0.86
<b>Lupani</b>	27	0.13	0.00	3.62	0.70
<b>Tarakserani</b>	27	0.22	0.00	5.98	1.15

Prilog 3-2a. Rezultati deskriptivne statistike serije *Alpestris* A.Berger: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	19	4.17	0.00	20.08	5.48
<b>II</b>	19	<b>14.81</b>	1.59	45.26	11.49
<b>III</b>	19	4.93	1.52	14.19	3.94
<b>IV</b>	19	3.96	0.46	13.19	4.33
<b>V</b>	19	1.83	0.00	11.77	3.24
<b>VI</b>	19	0.66	0.00	1.70	0.60
<b>VII</b>	19	1.47	0.00	9.03	2.22
<b>VIII</b>	19	4.01	0.00	17.48	6.01
<b>IX</b>	19	2.16	0.00	8.04	2.08
<b>X</b>	19	3.11	0.00	12.68	3.34
<b>XI</b>	19	4.12	0.00	12.94	3.91
<b>XII</b>	19	5.04	0.00	16.74	5.90
<b>XIII</b>	19	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>XIV</b>	19	2.73	0.00	16.45	4.38
<b>XV</b>	19	2.33	0.00	16.63	3.68
<b>XVI</b>	19	0.44	0.00	1.22	0.46

Sedum ser. *Litorea* 't Hart

Prilog 3-3. Rezultati deskriptivne statistike serije *Litorea*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	3	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>21</sub>	3	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>22</sub>	3	0.14	0.11	0.17	0.03
C <sub>23</sub>	3	0.15	0.09	0.19	0.05
C <sub>24</sub>	3	0.37	0.34	0.40	0.03
C <sub>25</sub>	3	0.20	0.19	0.21	0.01
C <sub>26</sub>	3	0.14	0.14	0.14	0.00
C <sub>27</sub>	3	0.68	0.65	0.71	0.03
C <sub>28</sub>	3	0.86	0.80	0.92	0.06
C <sub>29</sub>	3	2.68	2.66	2.70	0.02
C <sub>30</sub>	3	0.13	0.13	0.13	0.00
C <sub>31</sub>	3	<b>24.02</b>	23.91	24.15	0.12
C <sub>32</sub>	3	1.56	1.52	1.61	0.05
C <sub>33</sub>	3	<b>59.14</b>	58.84	59.35	0.27
C <sub>34</sub>	3	0.19	0.16	0.22	0.03
C <sub>35</sub>	3	1.07	1.05	1.10	0.03
<b>Oleani</b>	3	<b>6.08</b>	6.04	6.13	0.05
<b>Lupani</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00

*Sedum ser. Aithales* (Webb & Berthel.) ‘t Hart

Prilog 3-4. Rezultati deskriptivne statistike serije *Aithales*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	6	0.07	0.01	0.13	0.05
C <sub>21</sub>	6	0.07	0.01	0.12	0.05
C <sub>22</sub>	6	0.17	0.01	0.30	0.14
C <sub>23</sub>	6	0.19	0.01	0.31	0.14
C <sub>24</sub>	6	0.38	0.09	0.62	0.25
C <sub>25</sub>	6	0.18	0.01	0.36	0.16
C <sub>26</sub>	6	0.16	0.01	0.30	0.13
C <sub>27</sub>	6	0.16	0.06	0.23	0.08
C <sub>28</sub>	6	0.07	0.01	0.11	0.05
C <sub>29</sub>	6	1.19	0.40	1.68	0.53
C <sub>30</sub>	6	0.09	0.06	0.10	0.02
C <sub>31</sub>	6	<b>7.91</b>	4.47	9.22	1.84
C <sub>32</sub>	6	0.86	0.38	1.14	0.26
C <sub>33</sub>	6	<b>24.18</b>	20.67	26.76	2.05
C <sub>34</sub>	6	0.05	0.01	0.16	0.06
C <sub>35</sub>	6	1.10	0.77	1.68	0.38
<b>Oleani</b>	6	<b>52.41</b>	49.79	59.35	3.72
<b>Lupani</b>	6	2.84	2.19	4.18	0.83
<b>Tarakserani</b>	6	0.00	0.00	0.00	0.00

Prilog 3-4a. Rezultati deskriptivne statistike serije *Aithales*: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	3	4.42	4.40	4.44	0.02
<b>II</b>	3	<b>19.66</b>	19.58	19.80	0.12
<b>III</b>	3	<b>12.83</b>	12.78	12.89	0.06
<b>IV</b>	3	4.65	4.61	4.71	0.05
<b>V</b>	3	1.72	1.69	1.75	0.03
<b>VI</b>	3	1.71	1.69	1.73	0.02
<b>VII</b>	3	0.23	0.23	0.23	0.00
<b>VIII</b>	3	<b>6.02</b>	5.91	6.10	0.10
<b>IX</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>X</b>	3	1.57	1.55	1.61	0.03
<b>XI</b>	3	2.98	2.94	3.00	0.03
<b>XII</b>	3	2.22	2.15	2.33	0.10
<b>XIII</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>XIV</b>	3	2.23	2.19	2.28	0.05
<b>XV</b>	3	2.05	2.03	2.07	0.02
<b>XVI</b>	3	0.67	0.64	0.69	0.03

*Sedum ser. Alba* A.Berger

Prilog 3-5. Rezultati deskriptivne statistike serije *Alba*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	5	0.02	0.01	0.05	0.02
C <sub>21</sub>	5	0.02	0.01	0.04	0.01
C <sub>22</sub>	5	0.05	0.01	0.10	0.04
C <sub>23</sub>	5	0.09	0.01	0.20	0.07
C <sub>24</sub>	5	0.20	0.06	0.28	0.09
C <sub>25</sub>	5	0.24	0.16	0.39	0.10
C <sub>26</sub>	5	0.16	0.07	0.34	0.11
C <sub>27</sub>	5	2.43	1.17	4.80	1.45
C <sub>28</sub>	5	0.61	0.23	0.98	0.34
C <sub>29</sub>	5	<b>18.65</b>	14.36	23.78	3.61
C <sub>30</sub>	5	1.13	0.59	1.67	0.49
C <sub>31</sub>	5	<b>47.19</b>	42.67	56.55	5.75
C <sub>32</sub>	5	1.51	0.97	1.89	0.38
C <sub>33</sub>	5	<b>21.18</b>	14.82	25.28	4.47
C <sub>34</sub>	5	0.12	0.01	0.35	0.16
C <sub>35</sub>	5	1.18	0.11	1.72	0.69
<b>Oleani</b>	5	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Lupani</b>	5	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	5	0.00	0.00	0.00	0.00

Prilog 3-5a. Rezultati deskriptivne statistike serije *Aithales*: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	4	0.98	0.00	3.90	1.95
<b>II</b>	4	<b>16.55</b>	7.52	28.86	9.54
<b>III</b>	4	4.86	4.32	6.26	0.94
<b>IV</b>	4	2.23	1.66	3.17	0.71
<b>V</b>	4	2.36	1.49	3.06	0.81
<b>VI</b>	4	3.41	0.00	6.71	2.76
<b>VII</b>	4	1.29	0.00	2.02	0.92
<b>VIII</b>	4	<b>12.07</b>	9.41	16.45	3.04
<b>IX</b>	4	0.32	0.00	0.63	0.34
<b>X</b>	4	<b>6.84</b>	3.72	13.96	4.78
<b>XI</b>	4	1.07	0.23	1.52	0.58
<b>XII</b>	4	0.87	0.54	1.56	0.47
<b>XIII</b>	4	0.54	0.00	1.31	0.56
<b>XIV</b>	4	0.30	0.00	0.57	0.28
<b>XV</b>	4	2.56	1.95	4.30	1.16
<b>XVI</b>	4	0.16	0.00	0.64	0.32

*Sedum ser. Dasyphylla* 't Hart

Prilog 3-6. Rezultati deskriptivne statistike serije *Dasyphylla*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	6	0.02	0.00	0.07	0.03
C <sub>21</sub>	6	0.02	0.00	0.06	0.02
C <sub>22</sub>	6	0.07	0.00	0.14	0.05
C <sub>23</sub>	6	0.02	0.00	0.07	0.03
C <sub>24</sub>	6	0.05	0.00	0.11	0.05
C <sub>25</sub>	6	0.04	0.00	0.16	0.06
C <sub>26</sub>	6	0.01	0.00	0.03	0.01
C <sub>27</sub>	6	0.17	0.01	0.43	0.16
C <sub>28</sub>	6	0.04	0.00	0.10	0.04
C <sub>29</sub>	6	1.10	0.31	1.96	0.58
C <sub>30</sub>	6	0.43	0.06	0.73	0.23
C <sub>31</sub>	6	<b>25.58</b>	15.37	43.17	10.21
C <sub>32</sub>	6	1.84	1.21	2.67	0.61
C <sub>33</sub>	6	<b>9.89</b>	4.64	15.95	4.49
C <sub>34</sub>	6	0.03	0.00	0.06	0.02
C <sub>35</sub>	6	0.01	0.00	0.05	0.02
<b>Oleani</b>	6	<b>53.50</b>	36.44	66.93	13.28
<b>Lupani</b>	6	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	6	0.00	0.00	0.00	0.00

Prilog 3-6a. Rezultati deskriptivne statistike serije *Dasyphylla*: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	5	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>II</b>	5	<b>15.25</b>	13.05	16.48	1.32
<b>III</b>	5	<b>7.19</b>	4.64	11.68	2.65
<b>IV</b>	5	4.07	1.15	7.07	2.75
<b>V</b>	5	0.66	0.00	3.28	1.47
<b>VI</b>	5	2.39	1.75	3.02	0.54
<b>VII</b>	5	2.12	0.00	5.22	2.27
<b>VIII</b>	5	2.53	1.20	4.73	1.67
<b>IX</b>	5	1.13	0.14	2.29	1.07
<b>X</b>	5	1.19	0.65	2.00	0.50
<b>XI</b>	5	1.98	0.66	4.85	1.67
<b>XII</b>	5	0.89	0.67	1.42	0.30
<b>XIII</b>	5	<b>8.34</b>	3.95	11.51	3.25
<b>XIV</b>	5	1.71	0.80	2.83	0.98
<b>XV</b>	5	3.63	1.49	6.36	1.76
<b>XVI</b>	5	1.03	0.52	1.98	0.56

*Sedum ser. Glauco-rubens* Fröd.

**Prilog 3-7.** Rezultati deskriptivne statistike serije *Glauco-rubens*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	8	0.03	0.01	0.18	0.06
C <sub>21</sub>	8	0.12	0.01	0.37	0.16
C <sub>22</sub>	8	0.10	0.01	0.69	0.24
C <sub>23</sub>	8	0.11	0.01	0.72	0.25
C <sub>24</sub>	8	0.21	0.01	1.24	0.42
C <sub>25</sub>	8	0.11	0.01	0.74	0.25
C <sub>26</sub>	8	0.11	0.01	0.82	0.29
C <sub>27</sub>	8	0.26	0.01	1.18	0.39
C <sub>28</sub>	8	0.09	0.01	0.27	0.10
C <sub>29</sub>	8	2.29	0.17	9.00	2.81
C <sub>30</sub>	8	0.13	0.01	0.28	0.10
C <sub>31</sub>	8	<b>9.42</b>	3.79	15.86	3.37
C <sub>32</sub>	8	0.99	0.43	1.69	0.39
C <sub>33</sub>	8	<b>26.35</b>	15.01	56.28	13.31
C <sub>34</sub>	8	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>35</sub>	8	0.52	0.01	2.49	0.91
<b>Oleani</b>	8	<b>46.64</b>	1.77	67.51	19.62
<b>Lupani</b>	8	5.01	0.00	10.83	3.88
<b>Tarakserani</b>	8	0.00	0.00	0.00	0.00

**Prilog 3-7a.** Rezultati deskriptivne statistike serije *Glauco-rubens*: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	5	<b>10.83</b>	0.00	32.10	13.49
<b>II</b>	5	<b>13.48</b>	0.00	29.15	10.89
<b>III</b>	5	5.83	4.39	8.57	1.63
<b>IV</b>	5	4.21	2.64	5.98	1.36
<b>V</b>	5	1.08	0.43	1.95	0.63
<b>VI</b>	5	1.95	0.00	3.92	1.90
<b>VII</b>	5	3.41	1.71	5.51	1.94
<b>VIII</b>	5	3.55	0.16	10.27	4.31
<b>IX</b>	5	<b>6.27</b>	0.00	11.13	5.67
<b>X</b>	5	1.61	0.80	2.85	0.83
<b>XI</b>	5	4.67	0.82	10.67	4.13
<b>XII</b>	5	1.79	0.26	3.61	1.33
<b>XIII</b>	5	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>XIV</b>	5	0.94	0.34	1.67	0.51
<b>XV</b>	5	1.32	0.82	2.20	0.56
<b>XVI</b>	5	0.83	0.00	1.91	0.82



**Sedum ser. Rubra Boriss.**

**Prilog 3-8.** Rezultati deskriptivne statistike serije *Rubra*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>C<sub>20</sub></b>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
<b>C<sub>21</sub></b>	2	0.10	0.01	0.19	0.13
<b>C<sub>22</sub></b>	2	0.06	0.01	0.11	0.07
<b>C<sub>23</sub></b>	2	0.23	0.09	0.37	0.20
<b>C<sub>24</sub></b>	2	0.13	0.01	0.24	0.16
<b>C<sub>25</sub></b>	2	0.45	0.22	0.68	0.33
<b>C<sub>26</sub></b>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
<b>C<sub>27</sub></b>	2	8.90	5.71	12.08	4.50
<b>C<sub>28</sub></b>	2	0.46	0.34	0.58	0.17
<b>C<sub>29</sub></b>	2	<b>26.92</b>	19.23	34.60	10.87
<b>C<sub>30</sub></b>	2	0.40	0.35	0.45	0.07
<b>C<sub>31</sub></b>	2	<b>31.86</b>	19.25	44.47	17.83
<b>C<sub>32</sub></b>	2	0.51	0.46	0.56	0.07
<b>C<sub>33</sub></b>	2	<b>8.71</b>	7.27	10.15	2.04
<b>C<sub>34</sub></b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>C<sub>35</sub></b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Oleani</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Lupani</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00

*Sedum ser. Rupestris* A.Berger

Prilog 3-9. Rezultati deskriptivne statistike serije *Rupestris*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	12	0.02	0.00	0.07	0.02
C <sub>21</sub>	12	0.03	0.00	0.10	0.04
C <sub>22</sub>	12	0.12	0.00	0.41	0.17
C <sub>23</sub>	12	0.15	0.00	0.31	0.12
C <sub>24</sub>	12	0.15	0.00	0.32	0.13
C <sub>25</sub>	12	0.13	0.00	0.32	0.13
C <sub>26</sub>	12	0.06	0.00	0.15	0.06
C <sub>27</sub>	12	0.48	0.00	0.94	0.32
C <sub>28</sub>	12	0.14	0.00	0.29	0.10
C <sub>29</sub>	12	<b>5.86</b>	0.01	19.41	8.18
C <sub>30</sub>	12	0.18	0.00	0.39	0.13
C <sub>31</sub>	12	<b>11.25</b>	2.90	18.00	4.32
C <sub>32</sub>	12	1.20	0.00	2.38	0.74
C <sub>33</sub>	12	<b>41.44</b>	28.69	62.81	9.81
C <sub>34</sub>	12	0.40	0.00	1.39	0.48
C <sub>35</sub>	12	<b>6.57</b>	0.00	13.94	4.87
<b>Oleani</b>	12	<b>12.22</b>	0.00	61.01	21.01
<b>Lupani</b>	12	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	12	<b>12.58</b>	0.00	46.72	16.34

Prilog 3-9a. Rezultati deskriptivne statistike serije *Rupestris*: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	11	0.34	0.00	1.07	0.49
<b>II</b>	11	<b>18.42</b>	4.55	43.70	13.89
<b>III</b>	11	<b>7.29</b>	3.41	12.25	3.06
<b>IV</b>	11	2.88	1.40	9.36	2.49
<b>V</b>	11	<b>12.33</b>	0.62	42.61	19.39
<b>VI</b>	11	0.49	0.00	1.27	0.50
<b>VII</b>	11	1.45	0.38	3.71	1.17
<b>VIII</b>	11	1.45	0.00	2.46	0.83
<b>IX</b>	11	0.86	0.21	1.82	0.43
<b>X</b>	11	2.34	0.16	5.85	2.00
<b>XI</b>	11	<b>9.20</b>	1.65	17.13	5.71
<b>XII</b>	11	0.88	0.24	2.43	0.74
<b>XIII</b>	11	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>XIV</b>	11	1.95	0.23	3.68	1.43
<b>XV</b>	11	1.48	0.15	6.01	2.04
<b>XVI</b>	11	0.36	0.11	1.17	0.30

*Sedum ser. Sedella* (Four r.) 't Hart

Prilog 3-10. Rezultati deskriptivne statistike serije *Sedella*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>21</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>22</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>23</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>24</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>25</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>26</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>27</sub>	3	0.09	0.09	0.09	0.00
C <sub>28</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>29</sub>	3	0.22	0.21	0.24	0.02
C <sub>30</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>31</sub>	3	<b>7.02</b>	6.97	7.10	0.07
C <sub>32</sub>	3	0.43	0.42	0.45	0.02
C <sub>33</sub>	3	<b>79.04</b>	78.77	79.20	0.24
C <sub>34</sub>	3	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>35</sub>	3	0.20	0.19	0.21	0.01
Oleani	3	0.00	0.00	0.00	0.00
Lupani	3	0.00	0.00	0.00	0.00
Tarakserani	3	0.10	0.10	0.10	0.00

Prilog 3-10a. Rezultati deskriptivne statistike serije *Sedella*: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
I	3	0.00	0.00	0.00	0.00
II	3	<b>12.23</b>	12.14	12.30	0.08
III	3	<b>8.75</b>	8.65	8.84	0.10
IV	3	2.27	2.22	2.33	0.06
V	3	0.20	0.19	0.21	0.01
VI	3	2.51	2.50	2.53	0.02
VII	3	<b>9.40</b>	9.00	9.83	0.42
VIII	3	3.39	3.28	3.54	0.13
IX	3	0.62	0.59	0.64	0.03
X	3	0.38	0.38	0.38	0.00
XI	3	2.17	2.13	2.20	0.04
XII	3	<b>7.02</b>	6.91	7.10	0.10
XIII	3	0.00	0.00	0.00	0.00
XIV	3	0.00	0.00	0.00	0.00
XV	3	2.00	1.96	2.03	0.04
XVI	3	0.19	0.18	0.20	0.01

*Sedum ser. Stefco* 't Hart

Prilog 3-11. Rezultati deskriptivne statistike serije *Stefco*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	3	0.05	0.01	0.07	0.03
C <sub>21</sub>	3	0.06	0.01	0.09	0.04
C <sub>22</sub>	3	0.15	0.01	0.23	0.12
C <sub>23</sub>	3	0.17	0.01	0.28	0.14
C <sub>24</sub>	3	0.32	0.07	0.47	0.22
C <sub>25</sub>	3	0.32	0.11	0.45	0.19
C <sub>26</sub>	3	0.14	0.01	0.23	0.12
C <sub>27</sub>	3	1.43	0.92	2.00	0.54
C <sub>28</sub>	3	0.23	0.18	0.31	0.07
C <sub>29</sub>	3	19.34	16.85	23.78	3.86
C <sub>30</sub>	3	1.32	1.14	1.66	0.30
C <sub>31</sub>	3	<b>57.28</b>	55.12	61.56	3.71
C <sub>32</sub>	3	0.99	0.66	1.20	0.29
C <sub>33</sub>	3	<b>9.90</b>	9.84	9.98	0.07
C <sub>34</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>35</sub>	3	0.45	0.30	0.64	0.17
<b>Oleani</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Lupani</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00

Prilog 3-11a. Rezultati deskriptivne statistike serije *Stefco*: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
I	3	1.48	1.28	1.87	0.34
II	3	2.14	1.41	3.24	0.97
III	3	2.36	1.75	3.01	0.63
IV	3	3.48	2.62	4.38	0.88
V	3	3.32	1.72	5.65	2.07
VI	3	<b>11.76</b>	10.85	12.23	0.79
VII	3	1.53	1.27	1.70	0.23
VIII	3	2.37	1.10	3.78	1.35
IX	3	1.46	0.81	1.85	0.57
X	3	0.96	0.27	1.35	0.60
XI	3	1.26	0.54	1.68	0.63
XII	3	<b>22.98</b>	21.05	24.54	1.78
XIII	3	0.00	0.00	0.00	0.00
XIV	3	1.04	0.37	1.57	0.61
XV	3	2.15	0.83	3.05	1.17
XVI	3	2.18	0.00	6.54	3.78

*Sedum ser. Cepaea* (Koch) Fröd.

Prilog 3-12. Rezultati deskriptivne statistike serije *Cepaea*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>21</sub>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>22</sub>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>23</sub>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>24</sub>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>25</sub>	2	0.05	0.01	0.08	0.05
C <sub>26</sub>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>27</sub>	2	0.31	0.08	0.53	0.32
C <sub>28</sub>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>29</sub>	2	0.28	0.20	0.36	0.11
C <sub>30</sub>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>31</sub>	2	2.53	2.36	2.69	0.23
C <sub>32</sub>	2	0.39	0.37	0.40	0.02
C <sub>33</sub>	2	<b>39.31</b>	32.61	46.01	9.48
C <sub>34</sub>	2	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>35</sub>	2	0.26	0.01	0.50	0.35
<b>Oleani</b>	2	<b>24.49</b>	20.33	28.65	5.88
<b>Lupani</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00

Prilog 3-12a. Rezultati deskriptivne statistike serije *Cepaea*: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	2	1.49	0.00	2.98	2.11
<b>II</b>	2	<b>8.49</b>	8.20	8.77	0.40
<b>III</b>	2	2.90	2.26	3.53	0.90
<b>IV</b>	2	0.83	0.52	1.13	0.43
<b>V</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>VI</b>	2	0.50	0.41	0.58	0.12
<b>VII</b>	2	0.77	0.43	1.11	0.48
<b>VIII</b>	2	2.60	0.93	4.27	2.36
<b>IX</b>	2	0.11	0.00	0.22	0.16
<b>X</b>	2	3.65	2.28	5.01	1.93
<b>XI</b>	2	<b>14.51</b>	13.48	15.54	1.46
<b>XII</b>	2	2.00	1.51	2.49	0.69
<b>XIII</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>XIV</b>	2	<b>23.93</b>	19.68	28.17	6.00
<b>XV</b>	2	1.77	0.91	2.63	1.22
<b>XVI</b>	2	0.66	0.64	0.67	0.02

*Sedum ser. Magellensia* 't Hart

**Prilog 3-13.** Rezultati deskriptivne statistike serije *Magellensia*: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	3	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>21</sub>	3	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>22</sub>	3	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>23</sub>	3	0.16	0.15	0.17	0.01
C <sub>24</sub>	3	0.27	0.26	0.29	0.02
C <sub>25</sub>	3	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>26</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>27</sub>	3	0.44	0.41	0.47	0.03
C <sub>28</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>29</sub>	3	0.81	0.80	0.82	0.01
C <sub>30</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>31</sub>	3	<b>15.29</b>	15.17	15.39	0.11
C <sub>32</sub>	3	0.87	0.84	0.92	0.04
C <sub>33</sub>	3	<b>57.37</b>	56.59	58.08	0.75
C <sub>34</sub>	3	0.07	0.06	0.09	0.02
C <sub>35</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Oleani</b>	3	<b>12.50</b>	12.46	12.57	0.06
<b>Lupani</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00

**Prilog 3-13a.** Rezultati deskriptivne statistike serije *Magellensia*: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	3	<b>17.34</b>	17.09	17.64	0.28
<b>II</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>III</b>	3	4.18	4.15	4.21	0.03
<b>IV</b>	3	0.56	0.52	0.61	0.05
<b>V</b>	3	1.12	1.08	1.17	0.05
<b>VI</b>	3	3.93	3.89	3.95	0.03
<b>VII</b>	3	0.95	0.88	1.00	0.06
<b>VIII</b>	3	<b>14.26</b>	14.16	14.35	0.10
<b>IX</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>X</b>	3	0.75	0.70	0.84	0.08
<b>XI</b>	3	<b>11.89</b>	11.85	11.94	0.05
<b>XII</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>XIII</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>XIV</b>	3	<b>17.53</b>	17.40	17.67	0.14
<b>XV</b>	3	0.28	0.27	0.29	0.01
<b>XVI</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00

**Prilog 3-14.** Rezultati deskriptivne statistike za spoljne grupe: markeri epikutikularnog voska

Varijabla	N	<i>Echeveria lilacina</i> Kimn. et Moran				<i>Hylotelephium telephium</i> (L.) H. Ohba				<i>Crassula ovata</i> (Miller) Druce				<i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym.-Hamet & H. Perrier			
		$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
C <sub>20</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.08	0.10	0.01
C <sub>21</sub>	3	0.01	0.01	0.01	0.00	0.33	0.31	0.36	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.09	0.09	0.09	0.00
C <sub>22</sub>	3	0.01	0.01	0.01	0.00	1.02	1.00	1.06	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.09	0.07	0.11	0.02
C <sub>23</sub>	3	0.07	0.07	0.07	0.00	0.99	0.98	1.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.07	0.06	0.08	0.01
C <sub>24</sub>	3	0.07	0.06	0.08	0.01	2.09	2.06	2.14	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00	0.80	0.77	0.82	0.03
C <sub>25</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	1.05	1.16	0.06	1.24	1.20	1.28	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00
C <sub>26</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.96	0.95	0.97	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>27</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	0.90	0.90	0.00	1.38	1.32	1.47	0.08	0.19	0.18	0.20	0.01
C <sub>28</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.57	0.56	0.59	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C <sub>29</sub>	3	0.07	0.07	0.07	0.00	5.17	5.11	5.22	0.06	4.23	4.15	4.28	0.07	0.92	0.90	0.95	0.03
C <sub>30</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.13	0.13	0.00
C <sub>31</sub>	3	1.59	1.55	1.63	0.04	21.13	20.94	21.25	0.17	37.06	36.80	37.20	0.23	3.67	3.60	3.76	0.08
C <sub>32</sub>	3	0.13	0.13	0.13	0.00	1.73	1.64	1.78	0.08	0.01	0.01	0.01	0.00	1.16	1.10	1.24	0.07
C <sub>33</sub>	3	3.54	3.51	3.59	0.04	47.97	47.84	48.05	0.11	1.88	1.85	1.90	0.03	56.13	55.94	56.40	0.24
C <sub>34</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.49	1.43	1.54	0.06
C <sub>35</sub>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.64	0.64	0.00
<b>Oleani</b>	3	81.11	80.09	82.09	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Lupani</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Tarakserani</b>	3	11.06	11.00	11.10	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	11.68	11.58	11.80	0.11

**Prilog 3-14a.** Rezultati deskriptivne statistike za spoljne grupe: markeri metanolnog ekstrakta

Varijabla	N	<i>Echeveria lilacina</i> Kimn. et Moran				<i>Crassula ovata</i> (Miller) Druce				<i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym.-Hamet & H. Perrier			
		$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$	$\bar{X}$	Min	Max	$\sigma$
<b>I</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	19.42	19.13	19.68	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>II</b>	3	27.58	27.31	27.83	0.26	15.86	15.79	15.99	0.11	16.33	16.04	16.65	0.31
<b>III</b>	3	8.03	7.87	8.12	0.14	8.69	8.67	8.71	0.02	3.87	3.84	3.92	0.04
<b>IV</b>	3	3.66	3.58	3.78	0.11	1.83	1.82	1.84	0.01	0.64	0.63	0.65	0.01
<b>V</b>	3	0.28	0.27	0.30	0.02	7.02	6.87	7.19	0.16	0.42	0.42	0.42	0.00
<b>VI</b>	3	0.30	0.24	0.35	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.62	0.56	0.68	0.06
<b>VII</b>	3	0.91	0.91	0.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26	0.20	0.38	0.10
<b>VIII</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>IX</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	1.09	1.00	1.17	0.09	0.95	0.84	1.01	0.10
<b>X</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.30	0.43	0.07
<b>XI</b>	3	0.18	0.16	0.20	0.02	0.35	0.34	0.36	0.01	1.96	1.87	2.01	0.08
<b>XII</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.83	1.79	1.85	0.03
<b>XIII</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>XIV</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.95	0.91	0.99	0.04	5.24	5.09	5.35	0.13
<b>XV</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.52	0.52	0.52	0.00	0.85	0.85	0.86	0.01
<b>XVI</b>	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	27.55	27.05	28.00	0.48



**Prilog 4.** Stanja kvalitativnih karaktera konstituenata epikutikularnog voska i površine lista pojedinačnih uzoraka: vrste roda *Sedum* i komponente korišćene u korespondentnoj analizi

Serija	Vrsta	Izgled površine lista	Izgled			
			A	O	L	T
<i>Acria</i>	<i>Sedum acre</i> L.	Z	1	1	0	0
<i>Acria</i>	<i>Sedum acre</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Acria</i>	<i>Sedum acre</i> L.	Z	1	1	0	0
<i>Acria</i>	<i>Sedum acre</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alba</i>	<i>Sedum album</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alba</i>	<i>Sedum album</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alba</i>	<i>Sedum album</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alba</i>	<i>Sedum album</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alba</i>	<i>Sedum album</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum alpestre</i> Vill.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum alpestre</i> Vill.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum alpestre</i> Vill.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum annuum</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum annuum</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum annuum</i> L.	Z	1	1	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum annuum</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum grisebachii</i> Boiss. & Heldr.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum grisebachii</i> Boiss. & Heldr.	Z	1	1	0	1
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum grisebachii</i> Boiss. & Heldr.	Z	1	0	1	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum sexangulare</i> L.	Z	1	1	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum sexangulare</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum sexangulare</i> L.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum tuberiferum</i> Stoj. & Stefanov	Z	1	1	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum tuberiferum</i> Stoj. & Stefanov	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum tuberiferum</i> Stoj. & Stefanov	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum urvillei</i> DC.	G	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum urvillei</i> DC.	G	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum urvillei</i> DC.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum urvillei</i> DC.	Z	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum urvillei</i> DC.	G	1	0	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum urvillei</i> DC.	G	1	1	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum urvillei</i> DC.	G	1	1	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum urvillei</i> DC.	Z	1	1	0	0
<i>Alpestris</i>	<i>Sedum urvillei</i> DC.	G	1	1	0	0
<i>Aithales</i>	<i>Sedum rubens</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Aithales</i>	<i>Sedum rubens</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Aithales</i>	<i>Sedum rubens</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Aithales</i>	<i>Sedum rubens</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Aithales</i>	<i>Sedum rubens</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Aithales</i>	<i>Sedum rubens</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Cepaea</i>	<i>Sedum cepaea</i> L.	Z	1	1	0	0
<i>Cepaea</i>	<i>Sedum cepaea</i> L.	Z	1	1	0	0
<i>Dasyphylla</i>	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	G	1	1	0	0
<i>Dasyphylla</i>	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	G	1	1	0	0
<i>Dasyphylla</i>	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	G	1	1	0	0
<i>Dasyphylla</i>	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	G	1	1	0	0
<i>Dasyphylla</i>	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	G	1	1	0	0
<i>Dasyphylla</i>	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	G	1	1	0	0

<i>Glauco-rubens</i>	<i>Sedum hispanicum</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Glauco-rubens</i>	<i>Sedum hispanicum</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Glauco-rubens</i>	<i>Sedum hispanicum</i> L.	G	1	1	0	0
<i>Glauco-rubens</i>	<i>Sedum hispanicum</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Glauco-rubens</i>	<i>Sedum hispanicum</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Glauco-rubens</i>	<i>Sedum hispanicum</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Glauco-rubens</i>	<i>Sedum hispanicum</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Glauco-rubens</i>	<i>Sedum hispanicum</i> L.	G	1	1	1	0
<i>Litorea</i>	<i>Sedum litoreum</i> Guss.	Z	1	1	0	0
<i>Litorea</i>	<i>Sedum litoreum</i> Guss.	Z	1	1	0	0
<i>Litorea</i>	<i>Sedum litoreum</i> Guss.	Z	1	1	0	0
<i>Magellensia</i>	<i>Sedum magellense</i> Ten.	Z	1	1	0	0
<i>Magellensia</i>	<i>Sedum magellense</i> Ten.	Z	1	1	0	0
<i>Magellensia</i>	<i>Sedum magellense</i> Ten.	Z	1	1	0	0
<i>Rubra</i>	<i>Sedum caespitosum</i> (Cav.) DC.	Z	1	0	0	0
<i>Rubra</i>	<i>Sedum caespitosum</i> (Cav.) DC.	Z	1	0	0	0
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix	G	1	0	0	1
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix	G	1	0	0	1
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix	G	1	0	0	1
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix	G	1	1	0	1
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix	G	1	0	0	1
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix	Z	1	0	0	1
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix	Z	1	1	0	0
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum rupestre</i> L.	G	1	1	0	0
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum rupestre</i> L.	G	1	1	0	0
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum amplexicaule</i> DC	G	1	1	0	0
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum amplexicaule</i> DC	G	1	1	0	0
<i>Rupestria</i>	<i>Sedum amplexicaule</i> DC	G	1	1	0	0
<i>Sedella</i>	<i>Sedum atratum</i> L.	Z	1	0	0	1
<i>Sedella</i>	<i>Sedum atratum</i> L.	Z	1	0	0	1
<i>Sedella</i>	<i>Sedum atratum</i> L.	Z	1	0	0	1
<i>Stefco</i>	<i>Sedum stefco</i> Stefanov	Z	1	0	0	0
<i>Stefco</i>	<i>Sedum stefco</i> Stefanov	Z	1	0	0	0
<i>Stefco</i>	<i>Sedum stefco</i> Stefanov	Z	1	0	0	0

†A – n-Alkani; O – oleani; L – lupani; T – tarakserani; G – glaukozna; Z – zelena.

---

## 9. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

---

Snežana (Čedomir) Jovanović je rođena 11. januara 1987. godine u Gnjilanu. Osnovnu i srednju školu je završila u Vranju sa odličnim uspehom. Prirodno-matematički fakultet u Nišu (Univerzitet u Nišu), Odsek za hemiju, je upisala školske 2005/06. godine. Diplomirala je septembra 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,12 i ocenom 10 na diplomskom ispitu i stekla zvanje diplomirani hemičar. Školske 2011/12. godine je upisala doktorske akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu (Univerzitet u Nišu), Departman za hemiju, Katedra za organsku hemiju i biohemiju i položila sve planom i programom predviđene ispite.

Nakon što je 2012. godine stekla zvanje „istraživač-pripravnik“, zasnovala je radni odnos na Prirodno-matematičkom fakultetu (Univerzitet u Nišu) u navedenom svojstvu i započela istraživanja u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije („Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena“, evidencioni broj 172047 i „Razvoj novih i poboljšanje postojećih elektrohemijskih, spektroskopskih i protočnih (FIA) metoda za praćenje kvaliteta životne sredine“, evidencioni broj 172051). Na istom fakultetu, 2014. godine je zasnovala radni odnos kao asistent za užu naučnu oblast Organska hemija i biohemija.

U toku doktorskih studija, Snežana Jovanović je kao saradnik u nastavi (a kasnije kao asistent) bila agažovana u izvođenju eksperimentalnih vežbi iz predmeta Organska hemija (Departman za Biologiju) i Metode izolovanja i razdvajanja u organskoj hemiji. Učestvovala je na nučnim skupovima u zemlji i inostranstvu i kao autor i koautor je publikovala rezultate istraživanja u međunarodnim i nacionalnim časopisima.

### Rad u istaknutom međunarodnom časopisu, M22

- Snežana Č. Jovanović, Bojan K. Zlatković, Gordana S. Stojanović, **Chemotaxonomic Approach to the Central Balkan *Sedum* Species Based on Distribution of Triterpenoids in Their Epicuticular Waxes**, *Chemistry and Biodiversity*, (2016), 13, 459-65.
- Snežana Č. Jovanović, Bojan K. Zlatković, Gordana S. Stojanović, **Distribution and variability of *n*-alkanes in epicuticular waxes of *Sedum* species from central Balkan Peninsula: the chemotaxonomic importance**, *Chemistry and Biodiversity*, (2015), 12, 767-780.
- Gordana S. Stojanović, Snežana Č. Jovanović, Bojan K. Zlatković, Aleksandra S. Đorđević, Goran M. Petrović, Olga P. Jovanović, Vesna P. Stankov-Jovanović, Violeta D. Mitić, ***Hylotelephium Spectabile* (Boreau) H. Ohba x *Telephium* (L.) H. Ohba Leaf and Flower extracts: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity**, *Records of Natural Products*, (2014), 8, 272-276.

### Rad u međunarodnom časopisu, M23

- Gordana S. Stojanović, Snežana Č. Jovanović, Bojan K. Zlatković, **Distribution and Taxonomic Significance of Secondary Metabolites Occurring in the Methanol Extracts of the Stonecrops (*Sedum* L., Crassulaceae) from the Central Balkan Peninsula**, *Natural Product Communications*, (2015), 10, 941-944.
- Snežana Č. Jovanović, Olga P. Jovanović, Goran M. Petrović, Gordana S. Stojanović, **Endemic Balkan Parsnip *Pastinaca hirsuta*: the Chemical Profile of Essential Oils, Headspace Volatiles and Extracts**, *Natural Product Communications*, (2015), 10, 661-664.
- Olga P. Jovanović, Bojan K. Zlatković, Snežana Č. Jovanović, Goran M. Petrović, Gordana S. Stojanović, **Composition of *Peucedanum longifolium* Waldst. & Kit. essential oil and volatiles obtained by headspace**, *Journal Of Essential Oil Research*, (2015), 27, 182-185.
- Gordana S. Stojanović, Olga P. Jovanović, Goran M. Petrović, Violeta D. Mitić, Vesna P. Stankov-Jovanović, Snežana Č. Jovanović, **Composition of Headspace Volatiles and Essential Oils of Three *Thymus* Species**, *Natural Product Communications*, (2014), 9, 1609-12.
- Danica S. Dimitrijević, Danijela A. Kostić, Gordana S. Stojanović, Snežana Č. Jovanović, Gordana Kocić, **Superoxide Dismutase: Isolation Methods and Activity Determinations. A Review**, *Oxidation Communications*, (2014), 37, 755-773.

### Rad u naučnom časopisu, M53

- Snežana Č. Jovanović, Bojan K. Zlatković, Gordana S. Stojanović, **The chemical composition of *Sedum rupestre* L. ssp. *rupestre* epicuticular waxes: horticultural versus the natural plant habitat**, *Facta Universitatis Series: Physics, Chemistry and Technology*, (2015), 13, 77 – 82.

- Marija D. Ilić, Ljubica Svilar, Snežana Č. Jovanović, Aleksandra S. Đorđević, Violeta D. Mitić, Snežana D. Nikolić-Mandić, Vesna P. Stankov-Jovanović, **Determination of selected pesticides in honey by LC-MS-IT: Effects of sample preparation**, *Safety Engineering (Inženjerstvo zaštite)*, (2012), 2, 195-200.

#### Rad u časopisu nacionalnog značaja, M52

- Violeta D. Mitić, Vesna P. Stankov-Jovanović, Marija D. Ilić, Snežana Č. Jovanović, Snežana D. Nikolić-Mandić, **Uticaj požara na sadržaj teških metala u biljkama i zemljištu**, *Materials Protection (Zaštita materijala)*, (2013), 1, 75-82.

#### Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu, M34

- Snežana Č. Jovanović, Marija S. Marković, Strahinja R. Simonović, Marija D. Ilić, Vesna P. Stankov-Jovanović, Violeta D. Mitić, Snežana D. Nikolić-Mandić, **Distribution of iron, zinc, copper, cadmium and lead in *Aegopodium podagraria*, *Chelidonium majus* and *Hypericum perforatum* from Vidlic Mountain (Serbia)**, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Macedonia, 2012, Abstract book BFP-43, Society of Chemists and Technologists of Macedonia.
- Snežana Č. Jovanović, Marija S. Marković, Strahinja R. Simonović, Marija D. Ilić, Vesna P. Stankov-Jovanović, Violeta D. Mitić, Gordana S. Stojanović, **Relation of different concentration of *Allium flavum* bulb extract and its antioxidant characteristics**, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Macedonia, 2012, Abstract book BFP-44, Society of Chemists and Technologists of Macedonia.
- Jovana N. Veljković, Aleksandra Pavlović, Snežana Mitić, Snežana Tošić, Jelena Brcanović, Snežana Č. Jovanović, **Total polyphenols, flavonoid content and antioxidative capacity of commercially available fruit teas in Serbia**, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Macedonia, 2012, Abstract book BFP-19, Society of Chemists and Technologists of Macedonia.
- Marija D. Ilić, Snežana Č. Jovanović, Strahinja R. Simonović, Aleksandra Đorđević, Violeta D. Mitić, Snežana D. Nikolić-Mandić, Vesna P. Stankov-Jovanović, **Application of ANOVA single-factor analysis on toxic elements content in *Daucus carota* from south-east Serbia**, Belgrade Food International Conference“, Beograd, Srbija, 2012, Abstract book P 1.14, FCUB-ERA Faculty of Chemistry, University Belgrade (FCUB) Euroepa Research Area.
- Marija D. Ilić, Ljubica Svilar, Snežana Č. Jovanović, Aleksandra Đorđević, Violeta D. Mitić, Snežana D. Nikolić-Mandić, Vesna P. Stankov-Jovanović, **Effects of honey sample preparation on the determination of selected pesticides applying LC-MS-IT method**, Belgrade Food International Conference“, Beograd, Srbija, 2012, Abstract book P1.15, FCUB-ERA Faculty of Chemistry, University Belgrade (FCUB) Euroepa Research Area.
- Marija D. Ilić, Snežana Č. Jovanović, Strahinja R. Simonović, Violeta D. Mitić, Snežana D. Nikolić-Mandić, Vesna P. Stankov-Jovanović, **Antioxidative characteristics of the plant extracts from traffic polluted and unpolluted areas**, 15<sup>th</sup> JCF-Frühjahrssymposium, Berlin, Germany, 2013, Abstract Book P 041.

- Snežana Č. Jovanović, Goran M. Petrović, Bojan K. Zlatković, Aleksandra Đorđević, Olga P. Jovanović, Vesna P. Stankov-Jovanović, Violeta D. Mitić, Marija D. Ilić, Gordana S. Stojanović, **HPLC screening and evaluation of antioxidative capacity of *Hylotelephium spectabile* (Boreau) H. Ohba x *telephium* (L.) H. Ohba leaf and flower extracts, fraction and their hydrolysates**, 15<sup>th</sup> JCF-Frühjahrssymposium, Berlin, Germany, 2013, Abstract Book P 237.
- Gordana S. Stojanović, Olga Jovanović, Snežana Č. Jovanović, Bojan K. Zlatković, Goran M. Petrović, **GC-MS profile of *Peucedanum longifolium* Waldst. & Kit. Essential oil and volatiles obtained by head space**, The International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU), Bansko, Bulgaria, 2013, Abstract Book PP 121.
- Snežana Č. Jovanović, Olga P. Jovanović, Goran M. Petrović, Gordana S. Stojanović, **Endemic Balkan parsnip *Pastinaca hirsuta* Pančić: the GC-MS profile of essential oil and head-space volatiles**, 45<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils, Istanbul, Turkey, 2014, Abstract Book PP-069; NVEO (Natural Volatiles & Essential Oils, Vol1. Special Issue 2014).
- Ivana Radojković, Goran M. Petrović, Bojan K. Zlatković, Snežana Č. Jovanović, Gordana S. Stojanović, **Chemical composition of *Bunium alpinum* ssp. *Montanum* essential oil**, 45<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils, Istanbul, Turkey, 2014, Abstract Book PP-066; NVEO (Natural Volatiles & Essential Oils, Vol1. Special Issue 2014).
- Zorica Šarac, Bojan K. Zlatković, Snežana Č. Jovanović, Gordana S. Stojanović, Srđan Bojović, Petar Marin, **Are epicuticular waxes useful characters in differentiation of infraspecific taxa of *Pinus nigra* J.F. Arnold?**, 6th Balkan Botanical Congress, Rijeka, Croatia, 2015, Abstract Book PP-106.

#### Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu, M64

- Snežana Č. Jovanović, Aleksandra S. Đorđević, Bojan K. Zlatković, Goran M. Petrović, Olga P. Jovanović, Vesna P. Stankov-Jovanović, Violeta D. Mitić, Gordana S. Stojanović, **Phytochemical composition and antibacterial activity of the *Hylotelephium spectabile* (Boreau) H. Ohba x *telephium* (L.) H. Ohba leaf and flower extracts**, 11<sup>th</sup> Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighbouring regions (SFSES), 2013, Book of abstracts 84-85, oralna prezentacija.

---

## **10. PROPATNA DOKUMENTACIJA**

---

1. Izjava o autorstvu
2. Izjava o istovetnosti elektronskog i štampanog oblika doktorske disertacije
3. Izjava o korišćenju
4. Tipovi licenci kreativne zajednice



## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

**СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ПРЕДСТАВНИКА РОДА *Sedum* L.  
(Crassulaceae) ЦЕНТРАЛНОГ БАЛКАНСКОГ ПОЛУОСТРВА И ЊИХОВ  
ХЕМОТАКСОНОМСКИ ЗНАЧАЈ**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 13.06.2016.

**Аутор дисертације:**

Снежана Ч. Јовановић

Потпис аутора дисертације:





---

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ПРЕДСТАВНИКА РОДА *Sedum* L.  
(Crassulaceae) ЦЕНТРАЛНОГ БАЛКАНСКОГ ПОЛУОСТРВА И ЊИХОВ  
ХЕМОТАКСОНОМСКИ ЗНАЧАЈ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 13.06.2016.

**Аутор дисертације:**

Снежана Ч. Јовановић

Потпис аутора дисертације:

---



## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ПРЕДСТАВНИКА РОДА *Sedum* L. (Crassulaceae) ЦЕНТРАЛНОГ БАЛКАНСКОГ ПОЛУОСТРВА И ЊИХОВ ХЕМОТАКСОНОМСКИ ЗНАЧАЈ**

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

У Нишу, 13.08.2016.

**Аутор дисертације:**

Снежана Ч. Јовановић

Потпис аутора дисертације:



---

## ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ КРЕАТИВНЕ ЗАЈЕДНИЦЕ

### **1. Ауторство (CC BY)**

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

### **2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)**

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

### **3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

### **4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)**

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада

### **5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)**

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

### **6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)**

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.