

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET



Milan M. Gavrilović

Taksonomija i filogenija *Xeranthemum* grupe  
(Asteraceae) – morfološki, anatomski,  
fitohemijski i molekularni aspekti

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY



Milan M. Gavrilović

Taxonomy and phylogeny of the *Xeranthemum*  
group (Asteraceae) – morphological, anatomical,  
phytochemical and molecular aspects

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

**Podaci o mentoru i članovima komisije:**

**Mentor:**

**Dr Peđa Janačković,**

vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**Članovi komisije:**

**Dr Petar Marin,**

redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**Dr Zora Dajić - Stevanović**

redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

**Datum odbrane:**

*Posvećeno mojoj baki Bojani*

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka Biološkog fakulteta-Univerziteta u Beogradu, u SEM-EDS laboratoriji i Laboratoriji za kristalografiju Rudarsko-geološkog fakulteta-Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za ramansku spektroskopiju Fizičko-hemijskog fakulteta-Univerziteta u Beogradu, u Univerzitetskom centru za elektronsku mikroskopiju Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta-Univerziteta u Novom Sadu, u Laboratoriji za funkcionlanu anatomiju biljaka Katedre za agrobotaniku Poljoprivrednog fakulteta-Univeziteta u Beogradu, u Centru za instrumentalnu analizu IHTM-a, na Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta-Univeziteta u Beogradu, na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta-Univeziteta u Beogradu, u Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB), u Department of Botany Universidade Federal de Pernambuco Recife Brazil, u Institutu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu i u Mikološkoj laboratoriji Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu.*

*Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru i učitelju Prof. dr Peđi Janačkoviću sa Katedre za morfologiju i sistematiku biljaka Biološkog fakulteta-Univerziteta u Beogradu, pod čijim mentorstvom sam želeo da radim doktorsku disertaciju još na početku osnovnih studija. Hvala na svakodnevnoj neiscrpoj pomoći, stručnim savetima i sugestijama tokom celokupne izrade ove disertacije. Hvala što me je uveo i vodio kroz svet sistematike biljaka i familije Asteraceae. Takav izgrađen odnos je celoživotan.*

*Želeo bih da se zahvalim članovima komisije Prof. dr Petru D. Marinu sa Katedre za morfologiju i sistematiku biljaka Biološkog fakulteta-Univerziteta u Beogradu i Prof. dr Zori Dajić-Stevanović sa Katedre za agrobotaniku Poljoprivrednog fakulteta-Univerziteta u Beogradu na korisnim savetima i sugestijama koje su mi pružili prilikom pregledanja ove doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem Prof. dr Dragani Rančić sa Katedre za agrobotaniku Poljoprivrednog fakulteta-Univeziteta u Beogradu, na nesebičnoj pomoći i znanju iz anatomije biljaka. Takođe se zahvaljujem dipl. biol. Radenku*

*Radoševiću, rukovodiocu laboratorije za funkcionlanu anatomiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta-Univeziteta u Beogradu, na pomoći prilikom pravljenja anatomskih preparata.*

*Veliko hvala dugujem Núria Garcia-Jacas i Alfonso Susanna iz Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB), na znanju i savetima koje su mi pružili iz molekularnih analiza tokom boravka u institutu kao i tokom celokupnog istraživanja.*

*Veliko hvala Milutinu Prašćeviću iz Plava (Alpinetum Prokletije, Crna Gora) na velikoj i srdačnoj pomoći prilikom sakupljanja biljnog materijala u Crnoj Gori za potrebe ove disertacije.*

*Želeo bih da se zahvalim dipl. biol. Milošu Bokorovu na pomoći prilikom rada na SEM-u, u Univerzitetkom centru za elektronsku mikroskopiju, Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.*

*Zahvalnost dugujem Prof. dr Suzani Erić sa Rudarsko-geološkog fakulteta-Univerziteta u Beogradu, na pomoći prilikom rada na SEM-EDS-u i identifikaciji kristala.*

*Hvala Prof. dr Veletu Teševiću sa Katedre za organsku hemiju, Hemijskog fakulteta-Univeziteta u Beogradu, na pomoći prilikom rada na HPLC-u i NMR-u.*

*Hvala dr Urošu Gašiću sa Katedre za analitičku hemiju, Hemijskog fakulteta-Univeziteta u Beogradu na pomoći prilikom rada na Orbitrap-u i identifikacije fenolnih jedinjenja.*

*Hvala Antonio Fernando M. de Oliveira i Mariana O. Barbosa na pomoći prilikom ekstrakcije i identifikacije masnih kiselina iz cipsela.*

*Hvala Prof. dr Dmitru Lakušiću sa Katedre za ekologiju i geografiju biljaka Biološkog fakulteta-Univerziteta u Beogradu na pomoći prilikom tumačenja rezultata morfometrijskih analiza morfoloških karaktera.*

*Hvala dr Marini Soković, naučnom savetniku, iz Mikološke laboratorije, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerziteta u Beogradu, na pomoći vezanoj za antimikrobnu aktivnost. Takođe, hvala Prof. dr Milanu Stankoviću sa Instituta za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu na pomoći u radu za antioksidativnu aktivnost.*

*Hvala i svim članovima Katedre za morfologiju i sistematiku biljaka Biološkog fakulteta-Univerziteta u Beogradu.*

*Hvala mojim prijateljima koji su uvek bili uz mene i znali da ću da istrajem.*

*Ipak, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami Mirjani, baki Bojani i bratu blizancu Ljubiši na podršci koju su mi pružali celog života. Bez njih ne bih uspeo. Takođe, безусловna ljubav mog psa ljubimca Lukija mi je uvek davala dodatnu snagu. Sa njihovom ljubavlju ova disertacija dobija potpuni i pravi smisao.*

*Milan Gavrilović*

## Taksonomija i filogenija *Xeranthemum* grupe (Asteraceae) – morfološki, anatomski, fitohemijski i molekularni aspekti

### Sažetak

*Xeranthemum* grupu čine rodovi *Shangwua*, *Amphoricarpus*, *Chardinia*, *Xeranthemum* i *Siebera*, anatomski, mikromorfološki i fitohemijski gotovo neistraženi. Taksonomija čitave grupe, posebno roda *Amphoricarpus* je veoma kompleksna. U ovom istraživanju je pokazano da mikromorfološke osobine povezuju višegodišnje vrste, određene povezuju jednogodišnje, određene su specifične za vrste, a određene zajedničke za sve takson. Taksoni roda *Amphoricarpus* pokazuju slične anatomske karakteristike, dok su odabrani anatomski karakteri taksonomski značajni za diferencijaciju vrsta roda *Xeranthemum*. U cipselama taksona roda *Amphoricarpus* detektovano je osam masnih kiselina, od kojih je linolna dominantna, a u cipselama *X. cylindraceum* 12, od kojih je dominantna oleinska. Dominantan seskviterpenski lakton kod *A. elegans* je 3-deoksiamforikarpolid. Kod istraživanih taksona roda *Amphoricarpus* identifikovano je 30 fenolnih jedinjenja, gde je hrizoeriol dominantan među površinskim jedinjenjima svih taksona, a 5-*O*-kafeoilhinska kiselina među vakuolarnim, osim kod *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*. Biološka aktivnost taksona roda *Amphoricarpus* pokazala je veoma dobar ili umeren efekat. Određeni mikromorfološki, anatomski i molekularni markeri podržavaju filogeniju *Xeranthemum* grupe. Morfološki karakteri vegetativnih struktura i glavice najbolje su razdvojili četiri balkanska taksona roda *Amphoricarpus*. Mikromorfološki karakteri involukralne brakteje posebno izdvajaju bosansko-hercegovački takson. Fitohemijske razlike evidentne su između balkanskih taksona. Molekularne analize su pokazale da je rod *Amphoricarpus* monofiletski i da su balkanski taksoni podeljeni na dve klade: bosansko-hercegovačku i crnogorsku. Rezultati podržavaju podizanje taksonomskog ranga *Xeranthemum* grupe na nivo podtribusa.



**Ključne reči:** Asteraceae; *Xeranthemum* grupa; morfologija; mikromorfologija; anatomija; masne kiseline, seskviterpenski laktoni i fenolna jedinjenja; ITS i plastidni markeri; biološka aktivnost; taksonomija; filogenija.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Morfologija, fitohemija i sistematika biljaka

## **Taxonomy and phylogeny of the *Xeranthemum* group (Asteraceae) – morphological, anatomical, phytochemical and molecular aspects**

### **Abstract**

The *Xeranthemum* group includes *Shangwua*, *Amphoricarpos*, *Chardinia*, *Xeranthemum* and *Siebera*, anatomically, micromorphologically and phytochemically almost unexplored. The taxonomy of the whole group, especially of the *Amphoricarpos* is very complex. In this study, it was shown that micromorphological traits link together perennial species, some link annual ones, some are species-specific, and some are common to all taxa. *Amphoricarpos* taxa showed similar anatomical features, while selected anatomical characters differentiated *Xeranthemum* species. Eight fatty acids were found in the *Amphoricarpos* taxa cypselae, of which linoleic was dominant, while 12 fatty acids were found in *X. cylindraceum* cypselae, of which oleic was dominant. The dominant sesquiterpene lactone in the *A. elegans* is 3-deoxyamphoricarpolide. In *Amphoricarpos* taxa 30 phenolic compounds were identified, where chryzoeriol was dominant among the surface compounds of all taxa, and 5-*O*-caffeoylcholic acid among vacuolar ones, except for *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*. The biological activity of *Amphoricarpos* showed a very good or moderate effect. Certain micromorphological, anatomical and molecular markers support the phylogeny of the *Xeranthemum* group. The morphological characters of the vegetative structures and the capitulum best separated four Balkan *Amphoricarpos* taxa. The micromorphological characters of the involucre bract particularly distinguished the Bosnian-Herzegovinian taxon. Phytochemical differences are evident between Balkan taxa. Molecular analyzes have shown that the genus *Amphoricarpos* is monophyletic and that the Balkan taxa are divided into two clades: Bosnian-Herzegovinian and Montenegrin. The results support raising the taxonomic rank of the *Xeranthemum* group on subtribal level.

**Keywords:** Asteraceae; *Xeranthemum* group; morphology; micromorphology; anatomy; fatty acids, sesquiterpene lactones and phenolic compounds; ITS and plastid markers; biological activity; taxonomy; phylogeny.

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant morphology, phytochemistry and systematics

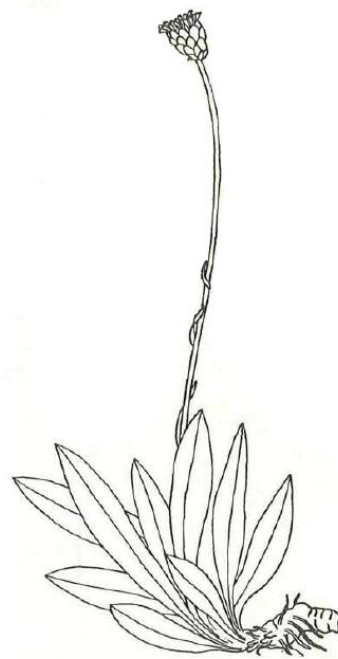
## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Familija Asteraceae .....	2
1.2. Tribus Cardueae Cass. ....	4
1.3. Podtribus Carduinae (Cass.) Dumort .....	6
1.4. <i>Xeranthemum</i> grupa .....	7
1.4.1. <i>Amphoricarpos</i> Vis. ....	9
1.4.2. <i>Shangwua</i> Yu J. Wang, Raab-Straube, Susanna & J. Quan Liu ....	11
1.4.3. <i>Xeranthemum</i> L. ....	12
1.4.4. <i>Chardinia</i> Desf. ....	14
1.4.5. <i>Siebera</i> J. Gay .....	15
1.5. Dosadašnja morfološka i mikromorfološka istraživanja predstavnika <i>Xeranthemum</i> grupe .....	16
1.6. Dosadašnja anatomska istraživanja predstavnika <i>Xeranthemum</i> grupe .....	20
1.7. Dosadašnja fitohemijska istraživanja predstavnika <i>Xeranthemum</i> grupe .....	22
1.8. Dosadašnja taksonomska i filogenetska istraživanja predstavnika <i>Xeranthemum</i> grupe .....	26
1.9. Dosadašnja istraživanja biološke aktivnosti predstavnika <i>Xeranthemum</i> grupe .....	34
2. CILJEVI RADA .....	38
3. MATERIJAL I METODE .....	40
3.1. Biljni materijal .....	41
3.2. Morfološke metode .....	45
3.2.1. Analize morfoloških karaktera .....	47
3.2.2. Statistička obrada morfometrijskih podataka .....	49
3.3. Mikromorfološke metode .....	51
3.3.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija sa energetske-disperzivnom spektrometrijom - SEM - EDS .....	51
3.3.2. Rendgenska difraktometrija praha - XRPD .....	52
3.3.3. Mikro - ramanska spektroskopija .....	52
3.4. Anatomske metode .....	53
3.5. Fitohemijske metode .....	54
3.5.1. Masne kiseline iz cipsela .....	54
3.5.1.1. Ekstrakcija ulja .....	54
3.5.1.2. Transesterifikacija ulja .....	54
3.5.1.3. GC-FID analiza masnih kiselina .....	54
3.5.2. Ekstrakcija i izolacija seskviterpenskih laktona za HPLC i NMR analizu .....	55
3.5.2.1. Ekstrakcija i izolacija seskviterpenskih laktona (SLs) ....	55
3.5.2.2. HPLC i NMR analiza .....	55
3.5.3. UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS analiza .....	56
3.5.3.1. Ekstrakcija .....	56

3.5.3.2.	Analiza fenolnih jedinjenja .....	56
3.6.	Molekularne metode .....	57
3.6.1.	Biljni materijal .....	57
3.6.2.	Ekstrakcija, amplifikacija i sekvenciranje DNK .....	58
3.6.3.	Filogenetske analize .....	59
3.7.	Utvrđivanje biološke aktivnosti ekstrakata .....	60
3.7.1.	Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti .....	60
3.7.1.1.	Ekstrakcija .....	60
3.7.1.2.	Određivanje antibakterijske aktivnosti .....	61
3.7.1.3.	Određivanje antifungalne aktivnosti .....	62
3.7.2.	Određivanje antioksidativne aktivnosti .....	63
3.7.2.1.	Ekstrakcija .....	63
3.7.2.2.	Određivanje ukupnih fenola .....	63
3.7.2.3.	Određivanje ukupnih flavonoida .....	64
3.7.2.4.	Utvrđivanje antioksidativne aktivnosti .....	65
3.7.3.	Statistička analiza podataka .....	66
4.	REZULTATI .....	67
4.1.	Morfometrijske analize <i>Xeranthemum</i> grupe.....	68
4.1.1.	Deskriptivna statistika karaktera balkanskih taksona roda <i>Amphoricarpos</i> .....	68
4.1.2.	Morfološka diferencijacija balkanskih taksona roda <i>Amphoricarpos</i> - kanonijska diskriminantna analiza (CDA) .....	76
4.2.	Mikromorfoloģija <i>Xeranthemum</i> grupe .....	82
4.2.1.	Mikromorfoloģka analiza stabla .....	82
4.2.2.	Mikromorfoloģka analiza listova .....	85
4.2.3.	Mikromorfoloģka analiza involukralnih brakteja .....	94
4.2.4.	Mikromorfoloģka analiza cvetnog regiona .....	112
4.2.5.	Mikromorfoloģka analiza cipsela .....	114
4.3.	Anatomija <i>Xeranthemum</i> grupe.....	136
4.3.1.	Anatomska analiza balkanskih taksona roda <i>Amphoricarpos</i> .....	136
4.3.1.1.	Anatomske karakteristike korena .....	136
4.3.1.2.	Anatomske karakteristike rizoma .....	138
4.3.1.3.	Anatomske karakteristike lista .....	140
4.3.1.4.	Anatomske karakteristike drške cvasti .....	145
4.3.1.5.	Anatomske karakteristike cvasti .....	147
4.3.2.	Anatomska analiza vrsta roda <i>Xeranthemum</i> .....	149
4.3.2.1.	Anatomske karakteristike korena .....	149
4.3.2.2.	Anatomske karakteristike stabla .....	152
4.3.2.3.	Anatomske karakteristike drške cvasti .....	155
4.3.2.4.	Anatomske karakteristike lista .....	157
4.3.2.5.	Anatomske karakteristike cvasti .....	162
4.4.	Fitohemija <i>Xeranthemum</i> grupe .....	165

4.4.1.	Masne kiseline iz cipsela balkanskih taksona roda <i>Amphoricarpos</i>	165
4.4.2.	Masne kiseline iz cipsela vrste <i>Xeranthemum cylindraceum</i>	169
4.4.3.	Identifikacija i karakterizacija 3-deoksiamforikarpolida vrste <i>Amphoricarpos elegans</i>	171
4.4.4.	Fenolni profili taksona roda <i>Amphoricarpos</i>	173
4.5.	Molekularne i filogenetske analize <i>Xeranthemum</i> grupe	178
4.6.	Biološka aktivnost <i>Xeranthemum</i> grupe	181
4.6.1.	Antimikrobna aktivnost ekstrakata listova balkanskih taksona roda <i>Amphoricarpos</i>	181
4.6.2.	Antioksidativna aktivnost i ukupan sadržaj fenola i flavonoida ekstrakata listova balkanskih taksona roda <i>Amphoricarpos</i>	185
4.6.4.	Antioksidativna aktivnost i ukupan sadržaj fenola i flavonoida ekstrakata listova vrste <i>Amphoricarpos elegans</i>	188
5.	DISKUSIJA	190
5.1.	Morfologija (morfometrijska analiza)	191
5.2.	Mikromorfologija	194
5.3.	Anatomija	207
5.4.	Fitohemija	217
5.5.	Molekularne analize	229
5.6.	Biološka aktivnost	232
5.7.	Opšta diskusija	235
6.	ZAKLJUČCI	242
7.	LITERATURA	254
8.	PRILOZI	291

Ilustracija *Amphoricarpos autariatus* Blečić et Mayer: Habitus, Blečić i Mayer (1967). Die europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos* VISIANI. Phytion, 12, 150-158



**1 UVOD**



## 1. UVOD

### 1.1. Familija Asteraceae

Familija Asteraceae Dumortier (Compositae Giseke) je jedna od najizvedenijih familija cvetnica. Smatra se da je familija Asteraceae evoluirala „nedavno“, jer je polen predstavnika ove familije široko rasprostranjen u slojevima oligocena.

U familiju Asteraceae svrstano je 24.000 – 30.000 vrsta i 1.600 – 2.000 rodova (Funk i sar. 2005; Funk i Robinson 2005; Anderberg i sar. 2007; Hind 2007). Predstavnici familije su kosmopoliti, nema ih samo na Antarktiku. Najviše su rasprostranjeni u planinskim predelima u subtropskom i tropskom pojasu.

Predstavnici familije su pretežno jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke (Anderberg i sar. 2007), ređe, drveće, žbunje i lijane. Pojedine vrste se odlikuju prisustvom člankovitih mlečnih cevi povezanih anastomozama u mrežasti sistem (sadrže mlečni sok - lateks), kao i produkcijom etarskih ulja i smole. Koren je osovinski, primarnog porekla, a neke vrste mogu imati korenske krtole (*Dahlia* Cav.). Listovi su dobro razvijeni, sa peteljkom ili bez nje, sa rukavcem ili bez njega, uglavnom spiralno raspoređeni, ponekad u rozeti. Ako je rukavac prisutan onda je sa slobodnim nervnim završecima. Na površini listova se nalaze trihome različite građe i oblika i funkcije (zvezdaste, jednoćelijske, višecelijske, razgranate, nežlezdane i žlezdane, itd.). Liska može biti urezana, celog oboda ili trnovita. Zalisci odsustvuju. Predstavnici su uglavnom mezofite i kserofite, ponekad halofite (neke vrste roda *Inula* L., *Artemisia* L.), vrlo retko hidrofite (neke vrste rodova *Bidens* L., *Cotula* L.). Sekundarno debljanje je uglavnom odustno, osim kod retkih drvenastih predstavnika kada dolazi do obrazovanja kambijalnog prstena (Nikolić 2013).

Vrste imaju jednopolne i dvopolne cvetove, grupisane u glavičaste cvasti (narodni naziv familije - glavočike). Morfološka pojava karakteristična za familiju Asteraceae, je pseudantija (grč. *pseudos* - lažan, *anthos* - cvet). Cvast izgledom podseća na cvet i čini jednu oprašivačku jedinicu (Nikolić 2013). Cvast može sadržati od nekoliko do više hiljada cvetova. Ponekad dolazi do formiranja sekundarnih glavica kada su primarne glavice redukovane do pojedinačnih cvetova (*Echinops* L.). Ispod cvasti nalazi se involukrum,





nastao skraćivanjem internodija između brakteja (Petković i sar. 2005). Listići involukruma mogu biti taksonomski karakteri kod pojedinih vrsta (npr. *Centaurea* L.) (Vanderhoeven i sar. 2002).

U okviru cvasti se javlja dimorfizam cvetova: aktinomorfni, cevasti cvetovi i zigomorfni, jezičasti cvetovi. Prisustvo jednih ili drugih tipova cvetova tradicionalno se koristilo za svrstavanje vrsta u dve potfamilije: *Compositae liguliflorae* i *Compositae tubuliflorae* (Bremer 1994). Kod *Compositae tubuliflorae* centralni deo cvasti čine cevasti fertilni cvetovi, dok su obodom raspoređeni jezičasti, jednopolni, često sterilni cvetovi, sa staminodijama i pistilodijama. Generalno su cvetovi pentamerni, tetraciklični. Čašica može da izostaje (npr. *Ambrosia* L.), ali je često metamorfozirana u ljuspe, bodlje, paperjaste dlake ili čekinje (papus) koje se zadržavaju na plodu i učestvuju u njegovom rasprostiranju. Pojedinačni cvetovi se sastoje od krunice, koja je pravilna, cevasta, po obodu sa 4 – 5 zubaca, ili zigomorfna sa kratkom cevi i obodom produženim u linearni jezičak, koji na vrhu ima 5 zubaca (od 5 ili samo od 3 spojena krunična listića), retko sa 5 ili 2 režnja.

Haplostemon je izgrađen od 3 do 5 prašnika, sraslih za krunicu. Antere su uvek srasle formirajući cev, dok su filamenti slobodni. Antere su obično tetrasporangijatne, otvaraju se longitudinalnim pukotinama. Polenova zrna su aperturatna ili ponekad aporatna. Gineceum je građen od dve karpole. Plodnik je unilokularan, duboko potcvetan, parakarpan. Placentacija je bazalna. Na stubiću se mogu nalaziti trihome ili čekinje koje pomažu sakupljanju polena (kolektori polena). Stubić je dvorežnjeviti, bradavičast. U plodniku se nalazi jedan semeni zametak, bez arilusa, anatropni, tenuinucelatni. Oprašivanje je u većini slučajeva entomofilno. Nektar se luči sa diska na bazi stubića (*Taraxacum* F. H. Wigg.) ili sa baze krunice (*Centaurea*). Plod je suv, nepucajući, cipsela (poseban tip ahenije gde je plodnik duboko potcvetan i čašica zaostaje na plodu) (Marzinek i sar. 2008) ili samo ponekad koštunica. Testa srasta sa perikarpom formirajući jedinstveni omotač. Rasejavanje je obično anemohorno, mada se javlja i epizoohorija kada je čašica sa kukicama i čekinjama, a cipsela lepljiva. Kod nekih rodova (*Arctium* L., *Xanthium* L.), čitava cvast se rasprostire kao zbirni plod, pomoću kukičastih brakteja. Heterokarpija, dimorfizam plodova u okviru jedne cvasti je karakteristična za predstavnike ove familije. Semena su bez endosperma.



Fitohemijski gledano predstavnici ove familije retko su cijanogene biljke. Kod nekih vrsta su zabeleženi poliacetileni. Alkaloidi su prisutni ili izostaju. Iridoidi nisu utvrđeni. Flavonoli su uglavnom prisutni u obliku kampferola i kvercetina. Polisaharid inulin je široko prisutan i zamenjuje škrob u podzemnim organima i semenima. Posebna grupa specijalizovanih metabolita karakteristična za predstavnike ove familije su seskviterpenski laktoni. Do sada 90 % identifikovanih seskviterpenskih laktona izolovano je iz predstavnika familije Asteraceae (Janačković i sar. 2003).

Mnogi morfološki, anatomski i molekularni karakteri pokazali su monofiletsko poreklo familije. Prema najnovijoj klasifikaciji (Funk i sar. 2009) familija Asteraceae je podeljena na 12 potfamilija i 43 tribusa. Podfamilija Carduoideae sadrži najmanje 93 rodova i 2.600 vrsta, pretežno rasprostranjenih u Evropi i Aziji. Ova podfamilija uključuje četiri tribusa: Cardueae, Dicoemeae, Oldenburgieae i Tarchonantheae (Funk i sar. 2009).

## 1.2. Tribus Cardueae Cass.

Tribus Cardueae (ranije Cynareae) je jedan od najbrojnijih u okviru familije Asteraceae. Sadrži oko 2.400 vrsta i 73 roda (Susanna i Garcia-Jacas 2007). Cardueae je bio jedan od prvih prepoznatih tribusa u okviru Asteraceae (Cassini 1819). Takođe ovaj tribus je jedan od taksonomski najkomplikovanijih tribusa zbog velike morfološke raznolikosti i pripadnosti nekih od najbrojnijih rodova familije. Tradicionalno, tribus Cardueae je podeljen na 4 taksonomska entiteta, ipak ta podela je bila komplikovana. Najranija klasifikacija tribusa prema Cassini (1819) prepoznavala je tri nezavisna tribusa: Echinopseae Cass., Carlineae Cass. i Cardueae Cass., kasnije dva podtribusa: Carduinae (Cass.) Dumort. i Centaureinae (Cass.) Dumort. Prema Bentham (1873) i Hoffmann (1893), tribus je podeljen na 4 podtribusa: Echinopsinae (Cass.) Dumort., Carlininae (Cass.) Dumort., Carduinae i Centaureinae. Wagenitz (1976) odvajaju Echinopseae u poseban tribus. Dittrich (1977) ponovo deli tribus na Echinopseae i Carlineae, dok Bremer (1994) razlikuje samo jedan tribus (Cardueae).

Na osnovu molekularnih (Susanna i sar. 2006) kao i morfoloških karaktera (Susanna i Garcia-Jacas 2007) usvojen je koncept jednog tribusa, sa 4 podtribusa (Bentham



1873 i Hoffman 1893) i jednog novog podtribusa Cardopatiinae Less. Uprkos raznolikosti u habitusu, morfologiji cvetova, anatomiji cipsele, svi predstavnici tribusa dele neke zajedničke karakteristike koje nisu pronađene nigde više u okviru porodice Asteraceae. To se pre svega odnosi na morfologiju stubića, koji je sa gusto dlakavim člankom. Svi molekularni podaci ukazuju da je tribus Cardueae monofiletski.

Unutar tribusa su svrstane višegodišnje, dvogodišnje ili monokarpne zeljaste biljke ili žbunovi, retko jednogodišnje biljke, veoma retko malo drveće, obično sa trnovima. Predstavnici Cardueae su česti i osnovni elementi flore Mediterana (Quézel 1978; Takhtajan 1986), ali se mogu naći i na drugim kontinentima i ekosistemima, kao što su steppe i druga polusušna staništa. Rasprostranjeniji su u Evropi (najviše u Mediteranu), Jugoistočnoj Aziji, Americi, Africi i Australiji.

Listovi su spiralno raspoređeni, često su u rozeti. Smoni kanali su uvek prisutni u korenu, ređe u nadzemnim delovima; mlečne cevi su često prisutne samo u nadzemnim delovima. Glavice su pojedinačne ili u gronji, obično su grupisane, mnogocvetne. Ređe su glavice grupisane u sekundarnu glavicu i tada su jednocvetne. Glavica je homogamna sa potpunim cvetovima ili heterogamna sa zrakastim cvetovima (Centaureinae). Brakteje involukruma su preklopljene, u nekoliko redova, uglavnom se završavaju bodljom. Mukro (šiljak) je čekinjast ili membranozan, retko su brakteje bez njega (Janačković 1997). Receptakulum je uglavnom gladak ili dlakav, ponekad potpuno go.

Cvetovi su najčešće cevasti, vrlo retko obodni jezičasti (*Atractylis* L. i *Carlina* Cass.). Svi cvetovi su fertilni, ili su periferni cvetovi sterilni. Često su zrakasti periferni cvetovi odsutni (Carduinae). Krunica je skoro uvek aktinomorfna, veoma retko zigomorfna, podeljena na cev i „kampanulatni“ (zvonasti) krak, ravna ili u obliku slova s. Antere su sagitane, na vrhu proširene u lignifikovani, lanceolatni apendiks, bazalni produžeci su izduženi u vidu repa, celi, dentikulatni; filamenti su papilozni do dlakavi, retko glatki. Polen je trikolporatan, spljošten, sferičan ili izdužen, segzina je formirana od dva sloja kolumele, trnovita ili skoro glatka. Stubić je sa papiloznim zadebljanjem („polenske četkice“), ispod grana; površina stigme obuhvata samo unutrašnje strane grana; nektarije su prisutne pri bazi stubića.



Cipsele su vrlo raznolike. Mogu imati parenhimski perikarp (Carlininae, Cardopatiinae, Echinopsinae, retko Carduinae) ili zračno lignifikovani perikarp (Carduinae i sve Centaureinae), obično su sa trihomama (Carlininae, Cardopatiinae i Echinopsinae), glatke kod mnogih Carduinae i Centaureinae. Papus je izgrađen od čekinja direktno vezan za zid perikarpa (Cardopatiinae, Carlininae i Echinopsinae, rodovi *Berardia* Vill., *Staelina* L. i *Xeranthemum* grupa u okviru Carduinae) ili fiksiran pomoću parenhimskog prstena za vršni deo cipsele (ostale Carduinae i sve Centaureinae) (Funk i sar. 2009). Dupli papus je prisutan kod predstavnika podtribusa Centaureinae. Apikalni karunkulus je prisutan kod mnogih rodova Carduinae, a bazalni elajozom kod Centaureinae povezan je sa mirmekohorijom. Semena su uglavnom sa bazalnim, ređe sa lateralnim hilumom. Testa je tamno braon i čvrsta, lignifikovana (epidermis palisadnog oblika) (Janačković 1997).

Najbitniji karakteri predstavnika Cardueae su: listovi sa trnolikim vrhovima, ljuspaste filarije, trnolik mukro (šiljak), cipsele obkonične ili široko cilindrične, perikarp sa pretežno uzdužnim sklerenhimskim elementima, i apikalni žleb ispod mesta insercije papusa (Ortiz i sar. 2009).

Na osnovu molekularno - filogenetskih studija (npr., Susanna i sar. 2006), tribus Cardueae je monofiletski i sadrži pet podtribusa: Cardopatiinae, Carduinae, Carlininae, Centaureinae i Echinopsinae.

### **1.3. Podtribus Carduinae (Cass.) Dumort.**

Podtribus Carduinae obuhvata višegodišnje, dvogodišnje ili jednogodišnje (trnovite) zeljaste biljke, koje su retko bez trnova. Glavica je homogamna, retko su periferni cvetovi zrakasti i sterilni. Brakteje su obično trnovite. Cipsele su sa radijalnim zadebljalim perikarpom, obično sa vršnim karunkulusom. Papus je vezan pomoću apikalnog prstena, prost ili u nekoliko redova. Carduinae su parafiletska grupa ukoliko se Centaureinae prepoznaje kao poseban podtribus. Predstavnici su uglavnom rasprostranjeni u Mediteranu. Mnoge ruderalne vrste pripadaju ovom podtribusu (*Carduus* L., *Cirsium* Mill., *Onopordum* Vaill. ex L., *Silybum* Vaill. i *Notobasis* Cass.). Geografski gledano, planine Centralne Azije



predstavljaju istočnu granicu u rasprostranjenju predstavnika podtribusa (*Cirsium*, *Saussurea* DC.), dok samo vrste rodova *Cirsium* i *Saussurea* naseljavaju Severnu Ameriku.

Podtribus Carduinae predstavlja parafiletsku grupu. U okviru podtribusa formirano je nekoliko neformalnih grupa, koje su relativno dobro okarakterisane na osnovu morfoloških i molekularnih karaktera (Susanna i Garcia-Jacas 2007), ali ipak sa još uvek nedovoljno razjašnjenom taksonomijom i filogenijom. Najznačajnije grupe su *Arctium* - *Cousinia* grupa, *Carduus* - *Cirsium* grupa, *Cynara* grupa, *Jurinea* - *Saussurea* grupa, *Onopordum* grupa i *Xeranthemum* grupa, i još dva izolovana roda, *Berardia* i *Staehelina*.

#### 1.4. *Xeranthemum* grupa

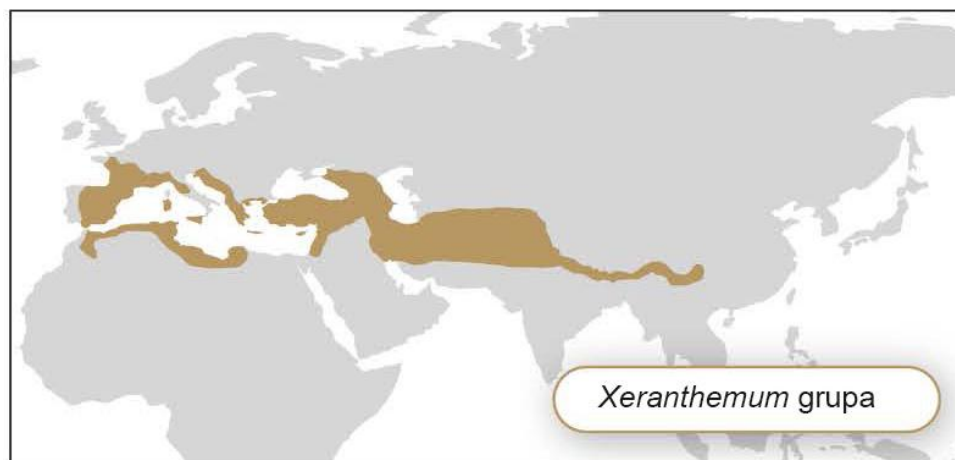
*Xeranthemum* grupa je prvobitno bila svrstana u podtribus Echinopinae. Na osnovu te klasifikacije Susanna i sar. (2006) su predložili hipotezu da veoma male i neobične glavice, koje imaju predstavnici ove grupe, sa veoma velikim receptakularnim paljama, mogu predstavljati sincefaliju (Garcia-Jacas i sar. 2002). Međutim, na osnovu novih analiza isti autori su pokazali da takvo mišljenje nije ispravno. Treba napomenuti da je Harris (1995) još ranije tvrdio da cvast vrsta roda *Xeranthemum* L. nije sincefalija. *Xeranthemum* grupa se u kombinovanim analizama, pojavljuje u izolovanom položaju u okviru pottribusa Carduinae kao sestrinska sa ostatkom podtribusa. Monofilija ove grupe je takođe sa veoma visokom podrškom. Tradicionalna klasifikacija (Dittrich 1977; Bremer 1994) je grupu svrstala u Carlininae, a Petit (1997) je prvi predložilo svrstavanje u podtribus Carduinae. Cassini (1819) je ovoj grupi čak dao status tribusa („*Xeranthemées*”).

Grupa *Xeranthemum* obuhvata jednogodišnje zeljaste biljke, bez trnova; retko su to patuljasti žbunovi. Listovi su uvek celi, abaksijalno somotasti. Glavica je heterogamna. Filamenti antera su glatki, sa malim, usečenim apendiksom. Cev krunice je veoma kratka. Cipsele su često dimorfne i imaju papus sa dugim čekinjama ili šiljatim ljuspama, retko je papus redukovana, u obliku venca (krune) kod *Chardinia* Desf. *Xeranthemum* grupa se karakteriše predstavnicima koji su lako prepoznatljivi po veoma karakterističnom papusu sa papirasto srebrno-belim filarijama. Rodovi *Chardinia*, *Siebera* J. Gay, *Xeranthemum* sadrže vrste čiji su predstavnici jednogodišnje biljke, najčešće kolonizatori aridnih staništa i



pustinja Mediterana i Irano-turskog regiona, dok su predstavnici rodova *Amphoricarpos* Vis. i *Shangwua* Yu J. Wang, Raab-Straube, Susanna & J. Quan Liu, koji su višegodišnje biljke, rasprostranjeni u istočnom Mediteranu, odnosno u Aziji (Tibet) (Slika 1).

*Xeranthemum* grupa sadrži pet rodova i 15 vrsta: rod *Amphoricarpos* [*A. autariatus* Blečić & E. Mayer, *A. elegans* Albov, *A. exsul* O. Schwarz, *A. neumayerianus* (Vis.) Greuter i *A. praedictus* Ayasligil & Grierson]; monotipske rodove *Chardinia* [*Ch. orientalis* (L.) Kuntze] i *Siebera* [*S. pungens* (Lam.) J. Gay] (Shishkin i Bobrov 1997; Susanna i Garcia-Jacas 2009); novoopisani rod *Shangwua* [*Sh. denticulata* (DC.) Raab-Straube & Yu J. Wang, *Sh. jacea* (Klotzsch) Yu J. Wang & Raab-Straube i *Sh. masarica* (Lipsky) Yu J. Wang & Raab-Straube] (Wang i sar. 2013) i rod *Xeranthemum* [*X. annuum* L., *X. cylindraceum* Sm., *X. inapertum* (L.) Mill, *X. longepapposum* Fisch. & C. A. Mey. i *X. squarrosum* Boiss.] (Susanna i Garcia-Jacas 2009). Novoopisani rod *Shangwua* koji uključuje sve vrste koje su ranije pripadale rodu *Saussurea* iz sekcije *Jacea*, razlikuje se od ostalih rodova tribusa Cardueae po jedinstvenoj kombinaciji stanja karaktera involukralnih brakteja, receptakuluma, palja, stubića, cipsele i papusa. Takođe, filogenetske analize zasnovane na molekularnim markerima sugerišu klasifikovanje ovog roda u *Xeranthemum* grupu (Wang i sar. 2013). Filogenije bazirane na molekularnim markerima potvrdile su je *Xeranthemum* grupa monofiletska (Susanna i sar. 2006; Barres i sar. 2013; Wang i sar. 2013),



Slika 1. Rasprostranje predstavnika *Xeranthemum* grupe (preuzeto iz rada Herrando-Moraira i sar. 2019)



### 1.4.1. *Amphoricarpus* Vis.

Etimologija naziva roda *Amphoricarpus* (krčagovina) potiče od grčkog ἀμφορέας = krčag i καρπός = plod, zbog specifičnog, amforastog oblika plodova nastalih od obodnih cvetova (Šilić 1990, 2006).

Vrste ovog roda su višegodišnje, nebodljikave, beličasto dlakave, zeljaste biljke, sa celim lancetastim ili linearno-lancetastim listovima koji su spiralno raspoređeni. Glavica je mala (15 – 20 mm širine), u početku duguljasta, kasnije zvonasta ili hemisferična, pojedinačna i terminalna, sadrži puno cvetova. Involukrum u više redova, crepast; involukralne brakteje spljoštene, kruto-zeljaste, sa uskim membranoznom marginom; spoljašnje brakteje se postepeno smanjuju prema spolja; unutrašnje su blago duže, uspravne. Receptakulum je ravan, gusto prekriven krutim i uskim, nedeljenim ili više ili manje duboko deljenim paljama. Cvetovi su varijabilni; spoljašnji su ženski, po nekoliko (u jednom redu), fertilni; centralni su dvopolni, fertilni. Krunica je cevasta, pravilna, sa više ili manje dugačkih pet zubaca dugačkih kao polovina dužine krunice. Antere su sagitane u osnovi, repno-resaste; filamenti su slobodni, glatki. Grane stubića su kod dvopolnih cvetova veoma kratke. Cipsele ženskih cvetova su duguljasto - objajaste, veoma spljoštene, ravne sa spoljašnje strane i konveksno-čunaste sa unutrašnje strane, sa brojnim rebrima i sa dva cela, uska, bočna krila, koja su okrugla ili rogolika na vrhu. Cipsele dvopolnih cvetova su obkonične, cilindrično - uglaste, blago spljoštene i zakrivljene. Papus kod obe cipsele je u jednom redu, obično izgrađen od brojnih, uskih, skoro čekinjastih ili usko-linearnih i veoma postepeno skoro čekinjasto - zašiljenih, fino sitno testerasto - trepljastih ili bodljikavih ljuspi, sraslih u osnovi. Različite su informacije o osnovnom broju hromozoma  $x = 6, 12, 14$  (Garnatje i sar. 2004a).

Predstavnici su tipične hazmofitske vrste koje naseljavaju krečnjačke stene planinskog i visokoplaninskog pojasa (Slika 2). Opšte rasprostranjenje: Crna Gora, Albanija, Bosna i Hercegovina, Hrvatska, Srbija, Grčka, Turska i Gruzija (Webb 1972; Gajić 1975). Taksonomija roda je veoma kompleksna.



Slika 2. *Amphoricarpos autariatus* subsp. *autariatus*. 1. Glavica. 2. Cipsele. 3. Cela biljka (foto P. Janačković)





#### 1.4.2. *Shangwua* Yu J. Wang, Raab-Straube, Susanna & J. Quan Liu

Naziv roda *Shangwua* je predloženo u čast profesora Shangwu Liu, taksonoma, koji je dao veliki doprinos razumevanju familije Asteraceae u Činghaj (kin. 青海, Qīnghǎi - plavo more) prostranoj i slabo naseljenoj provinciji na području Tibetanske visoravni.

Vrste ovog roda su višegodišnje zeljaste biljke sa odrvenelim rizomom. Izdanci su pojedinačni, uspravni, obično mnogo granati, gusto obrasli listovima. Listovi su naizmenični, sa kratkom drškom ili sedeći, nedeljeni, najveći u sredini izdanka, donji i gornji manji, glatki ili abaksijalno gusto pustenasti i sa sedećim žlezdanim trihomama. Glavica mnogo ili malo, obično su pojedinačne i terminalne na izdanku i granama, homogamne, diskoidalne. Listići involukruma su u nekoliko redova, crepasti, kožasti, slamnožuti sa braon ili crnom membranoznom marginom. Cvetna loža je ravna, jamičava, bez mnogo jamičavih čekinja, ali sa paljama, odnosno prisutna je jedna palja po cvetu. Palje su 1.2 – 2 cm, obično duže nego unutrašnje filarije. Svi cvetovi su fertilni, dvopolni. Krunica je cevasta, glatka, aktinomorfna, obod dugačak koliko i cev krunice, ždrelo 2 – 3 puta duže od režnja. Filamenti su glatki. Cev antere je sa kratkim, nepodeljenim, bazalnim apendiksom. Stubić je sa zadebljalim 1.5 – 2 mm dugačkim dlakavim čvorom ispod grana; grane stubića su ravne, šiljate ili blago šiljate, vrlo kratke (manje od 1 mm), razilazeće. Cipsele su glatke, cilindrične, uzdužno rebraste, sa bazalnim ožiljkom; vrh je ravan, bez upadljive ivice. Papus je homomorfan, čekinje slamnožute do braonkaste, raspoređene u jednom redu, peraste, nejednakih dužina, srasle u osnovi i fuzionisane sa cipselom, trajne

Nakon kompletne revizije, prepoznate su tri vrste u okviru roda *Shangwua*, *Sh. masarica*, *Sh. jacea* i *Sh. denticulata*. Svi predstavnici su rasprostranjeni na visokim planinama Azije. Dva predstavnika se pojavljuju u Pamiru, Hindukushu i Karakorumu, dok treća vrsta ima širu distribuciju na južnoj ivici Činghaj - Tibetanske visoravni od zapadnih Himalaja u Indiji do planine Hengduan u Junanu i Sičuanu.

Kod vrste *Shangwua denticulata* (Slika 3) središnji listovi su lanceolatni, više od 6 cm dugački, sa sitno testerastim ili sitno nazubljenom marginom. Kod vrste *Shangwua jacea* središnji listovi su jajasti do eliptični, manje od 2 cm široki, abaksijalno obično zeleni, glatki, ali gusto žlezdani, sa marginom celog oboda. Kod vrste *Shangwua masarica*



središnji listovi su jajasti, manje od 2 cm široki, abaksijalno obično beličasti, gusto paučinasto - pustenasti, sa marginom koja ima vrlo sitno nazubljeni obod.



Slika 3. *Shangwua denticulata* (preuzeto iz rada Wang i sar. 2013)

#### 1.4.3. *Xeranthemum* L.

Etimologija naziva roda *Xeranthemum* (besmrtnik) potiče od grčkog xeros = suv i anthemon = cvet, zbog sušnih i trajnih cvetova (Gajić 1975) - cvetovi u glavici zajedno sa obojenim gornjim involukralnim listićima ostaju celi i obojeni i kada je biljka suva.

Vrste ovog roda su jednogodišnje nebodljikave, zeljaste biljke. Listovi su celi, eliptično-linearni, naizmjenični, više manje pustenasto sivo dlakavi. Glavice su pojedinačne, na drškama. Glavice sadrže mnogo cvetova, heterogamne su i terminalne, bez spoljašnjeg involukruma. Involukrum je zvonast do valjkast. Listići involukruma su kožasto-opnasti, jajasto - lanceolatni do objajasti, poređani u više redova, kao crepovi na krovu, kratko ušiljeni ili tupi, sa suvokožičastim obodom, za vreme cvetanja zračno rašireni, poslednji unutrašnji mnogo duži od ostalih, sjajno beli ili ružičastocrveni. Spoljašnji cvetovi su sterilni, sa veoma dugačkim ružičastim stilodijumom i laticama koje su duboko usečene, dvousnati. Središnji cvetovi su dvopolni, fertilni, sa cevastom 5-zupčastom krunicom. Stubić je u gornjem delu zadebljao, sa kratkim žigovima. Cvetna loža je sa linearno-lanceolatnim, kožasto-opnastim paljama koje su gusto žlezdano istačkane. Cipsele su usko obkonične (pri osnovi sužene) do objajaste, svilaste (sa priljubljenim trihomama). Papus je



izgrađen od 5 – 10 širokih, kožasto-opnastih, šilastih, apikalno perastih ljuspi (Slika 4).  $x = 6, 7, 10$ .

Rod *Xeranthemum* obuhvata pet jednogodišnjih vrsta koje su rasprostranjene u južnoj Evropi, severnoj Africi i severo-zapadnoj Aziji (Garnatje i Martín 2007). U Srbiji rastu dve vrste, *X. annuum* i *X. cylindraceum*.



Slika 4. *Xeranthemum annuum* (foto P. Janačković).



#### 1.4.4. *Chardinia* Desf.

Vrsta ovog roda obuhvata jednogodišnje nebodljikave kleistogamne zeljaste biljke. Glavica je pojedinačna, sa drškom. Listići involukruma su jajasto - lancetasti do objajasti, kožasto - opnasti. Cvetna loža je sa lancetastim, šilastim ljustama. Obodni cvetovi su ženski. Centralni cvetovi su dvopolni. Krunica je kraća od ljusti papusa. Cipsele su dimorfne. Obodne cipsele su dorziventralno spljoštene sa adaksijalnim čunićem, objajaste, sa širokim, nejednako duboko deljenim (resastim) krilcima, apikalno izduženim u dva roga, koji su glatki. Centralne cipsele su obkonične, apikalno izbrazdane i sitno kosmate (vlasaste), bazalno svilaste. Papus obodnih cipsela izgrađen je od produžetaka krila; kod centralnih cipsela prisutna je sitno nazubljena kruna (Slika 5). Osnovni broj hromozoma  $x = 11$ . Rod sadrži jednu vrstu, *Ch. orientalis* rasprostranjenu u Turskoj, srednjem Istoku, Iranu, Avganistanu i Pakistanu.



Slika 5. *Chardinia orientalis* (<http://flora.org.il/en/plants/CHAORI/>)



#### 1.4.5. *Siebera* J. Gay

Ime rodu dato je u čast češkog prirodnjaka Franz-a Wilhelm-a Sieber-a (1789 – 1844).

Vrsta ovog roda obuhvata jednogodišnje zeljaste biljke. Glavica je pojedinačna ili u agregatu, sa dva naspramna lista. Listići involukruma su kožasto - opnasti, unutrašnji sa dugim lanceolatnim, šilastim apendiksom, obično ružičasti do ljubičasti; središnji listići sa tankim trnom; spoljašnji listići sa jedva vidljivim trnom, fino pustenasto dlakavi. Obodni cvetovi su sterilni, dvorežnjeviti; centralni cvetovi su dvopolni. Cipsele su usko duguljasto - obkonične, svilaste. Papus je izgrađen od kožasto - opnastih ljuspi, koje se završavaju sa bradatom ili perastom čekinjom (Slika 6).  $\times = 10$ . Rod sadrži jednu vrstu, *S. pungens*, rasprostranjenu u Turskoj, na srednjem Istoku, u Iranu, Avganistanu i Pakistanu.



Slika 6. *Siebera pungens* (foto A. Susanna)



## 1.5. Dosadašnja morfološka i mikromorfološka istraživanja predstavnika *Xeranthemum* grupe

Predstavnici *Xeranthemum* grupe su bili predmet morfoloških istraživanja tribusa i podtribusa familije Asteraceae (Dittrich 1977, 1996; Pettit 1997). U radovima novijeg datuma, rodovi su bili predmet kako filogenetskih (Wang i sar. 2013), tako i taksonomskih istraživanja (Garnatje i Martín 2007; Ozcan i Akinci 2019). Morfometrijska istraživanja u cilju rešavanja taksonomskih odnosa su rađena jedino kod balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*.

Dittrich (1977) kao jednu od bitnih odlika pri opisivanju tribusa Cynareae Lam. & DC. navodi odsustvo marginalnih (obodnih) cvetova, međutim, ženski marginalni cvetovi se ipak mogu naći kod rodova *Chardinia* i *Amphoricarpos*. Sterilni jezičasti obodni cvetovi se mogu naći kod rodova *Xeranthemum*, *Siebera* i *Atractylis*. Dittrich (1977) svrstava rod *Amphoricarpos* u podtribus Carlininae. Takođe, tri karaktera ploda (orijentacija tipa umetanja - insercije cipsele, tip dlakavosti i raspored elemenata papusa), koji su se tradicionalno koristili za razlikovanje podtribusa, Dittrich opisuje kao veoma složene karaktere. Lateralna insercija poznata kod Centaureinae, javlja se i kod rodova *Amphoricarpos*, *Cardopatum* Juss., *Siebera* i *Xeranthemum*. Plod pokriven svilenkastim, ili mekim kovrdžavim trihomama karakterističan je za sve rodove podtribusa Carlininae.

U okviru Carlininae, na osnovu odnosa krunične cevi i oboda kod dvopolnih cvetova, razlikuju se tri tipa krunice. Kod roda *Amphoricarpos* sreće se treći tip gde je krunica više - manje ravna, široko cevasta, režanj krunice je triangularan - trouglast do linearan, ali nikada duži od 1 – 3 mm. Takođe, u okviru Carlininae ustanovljena su tri tipa stubića, gde se rod *Amphoricarpos* karakteriše cilindričnim stubićem skoro celom dužinom (semicilindričan na poprečnom preseku), bez zadebljale artikulacije, gladak ili razređeno pokriven kratkim trihomama koje mogu da se nađu sa spoljašnje strane kratkih zašiljenih grana (0.5 – 1 mm). Glatki filament prašnika je takođe karakterističan za sve rodove podtribusa Carlininae.

Dadpour i sar. (2012) su analizirali morfologiju cvasti *X. squarossum* i pronašli značajne razlike u razvoju (ontogeniji) između ženskih i dvopolnih cvetova. Takođe, Harris



(1995) je u svom sveobuhvatnom mikromorfološkom radu vezanom za razvoj cvetova i cvasti 39 taksona iz familije Asteraceae, uključio i *X. annuum*.

Papus, karakterističan za podtribus Carlininae, se sastoji od jednog reda čekinja skoro jednakih dužina. Za rod *Amphoricarpos* je karakterističan papus koji polazi sa odvojenog gornjeg dela perikarpa sa čekinjama koje su u donjem delu srasle. Za rodove *Xeranthemum*, *Siebera* i *Chardinia* karakterističan je papus sastavljen od opnastih ljuspi. U okviru Carlininae, kod roda *Amphoricarpos* apikalni region perikarpa se razlikuje u odnosu na ostale predstavnike tribusa Cardueae. Na gornjem delu, perikarp se sjedinjuje direktno sa papusom, bez specijalnog nezavisnog tkiva za odvajanje; papus je organizovan u jedan red, kruna u osnovi papusa odsustvuje (Dittrich 1977). Kod svih predstavnika Carlininae cipsela je gusto pokrivena dvojnimi trihomama koje se viljuškasto završavaju. Testa je parenhimatična i više - manje usko duguljaste ćelije epidermisa nisu ni sa zadebljalim ni sa lignifikovanim radijalnim zidovima. Hilum je lateralan, a seme ima snažno razvijen funikulus, štaviše, integument iznad mikropile ima veoma izražen kljunasti produžetak.

Kladistička analiza tribusa Cardueae, urađena na osnovu 75 karaktera, uzimajući u obzir karaktere brakteja, krunice, prašnika, stubića i cipsele (Pettit 1997), pokazala je da postoje dve glavne klade: prva klada - *Echinops*, koja je povezana sa rodovima *Cousiniopsis* Nevski, *Cardopatum* i *Acantholepis* (Petit 1988a) i druga klada: gde pripadaju ostali rodovi koji su svrstani u dve podklade: podklada 2a - grupa *Carlina* (CG) koja je ograničena na 4 roda koji su bliski rodu *Carlina*, npr. *Atractylis*, *Atractylodes* DC., *Chameleon* Cass. i *Thevenotia* DC. i podklada 2b: koja se sastoji iz tri veoma nejednake klade: prva je ograničena na grupu *Staelina*, a druga na grupu *Xeranthemum*, dok poslednja povezuje preostale rodove. Na primer, dva podtribusa Carduinae i Centaurinae formiraju centralnu (glavnu) Cynareae grupu („Cynarean core group“, CCG). Petit (1997) je takođe ustanovio da postoje dva tipa insercije (umetanja) papusa na vrhu cipsele: insercija na ivici vertikalnog zida cipsele (*Xeranthemum*, *Chardinia*, *Siebera*, *Amphoricarpos*, *Staelina*, *Carlina* i dr.) i insercija unutar periferne krune kod *Jurinea* Cass., *Saussurea albescens* (DC.) Sch.Bip. i kod mnogih vrsta podtribusa Centaureinae.

Nakon proučavanja mikromorfologije i anatomije cipsele vrsta *Amphoricarpos autariatus*, *A. elegans*, *A. neumayerianus*, *Chardinia orientalis*, *Siebera pungens* i vrsta



roda *Xeranthemum* Dittrich (1996) je, na osnovu oblika i površine cipsela, morfologije papusa, anatomije perikarpa i rasporeda provodnih snopića, zaključio da su rodovi unutar grupe srodni.

Garnatje i Martín (2007) su istraživali morfologiju i ultrastrukturu polena predstavnika *Xeranthemum* grupe upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa odnosno upotrebom transmisionog elektronskog mikroskopa. Ustanovili su četiri tipa polena. Autori su zaključili da predstavnici rodova *Amphoricarpos* i *Siebera* imaju istu spoljašnju građu polena - polen je ehinatan, produženo - sferoidan, i, prema unutrašnjoj građi antemoidan. Kod *Xeranthemum* i *Chardinia* sreće se ista spoljašnja građa polenovog zrna - polen je verukoidan i izduženo - sferoidan. *Xeranthemum* ima istu unutrašnju građu polena kao i *Amphoricarpos/Siebera* kompleks, tj. antemoidan, kao i rod *Echinops*.

Wang i sar. (2013) su prilikom opisivanja novog roda *Shangwua* pokazali da sve vrste roda *Saussurea* sect. *Jacea*, koje su svrstane u novoopisani rod, dele brojne osobene morfološke karakteristike involukralnih brakteja, palja receptakuluma, zatim oblik nastavaka antera, grane stubića, cipsele i struktura i insercija papusa. Ove kombinacije karaktera jasno odvajaju novi rod od roda *Saussurea* i drugih rodova tribusa Cardueae. Ipak, autori naglašavaju da ovi karakteri nisu pružili potpuno jasne indikacije o odnosu novog roda sa bazalnim rodovima podtribusa Carduinae, npr. *Xeranthemum*, *Staelina* i *Berardia*. Prema nekim razmatranjima, rod se nalazi prema morfologiji između *Xeranthemum* grupe i pottribusa Carlininae, posebno ako se posmatraju karakteri papusa (Dittrich 1996). Dosadašnji dijagnostički morfološki karakteri rodova *Xeranthemum* grupe prikazani su u Tabeli 1.

Ozcan i Akinci (2019) su istraživali mikromorfologiju i anatomiju cipsela 21 vrste iz 12 rodova tribusa Cardueae, gde su uključili i vrstu *X. annuum*. Autori su zaključili da su karakteri cipsele različiti između istraživanih rodova kao i da imaju značaja pri razlikovanju vrsta i definisanja taksonomskih odnosa. Ustanovljeno je da su cipsele vrste *X. annuum* usko duguljaste, sa dvojnim trihomama na površini, sa bazalnim hilumom, asimetričnim karpodijumom i trajnim papusom izgrađenim od osasto - zašiljenih i suženih ljuspi. Takođe, zaključili su da je oblik ćelija epidermisa cipsele nejasan, da su antiklinalni zidovi uvučeni, da je površina cipsele fino naborana, a da je obrazac rasporeda ćelija lestvičast.





Tabela 1. Dijagnostične morfološke osobine rodova *Xeranthemum* grupe (Wang i sar. 2013)

Karakter	<i>Shangwua</i>	<i>Amphoricarpos</i>	<i>Xeranthemum</i>	<i>Siebera</i>	<i>Chardinia</i>
Životna forma	višegodišnje zeljaste biljke	višegodišnje zeljaste biljke	jednogodišnje biljke	jednogodišnje biljke	jednogodišnje biljke
Glavica	homogamna	heterogamna (spoljašni cvetovi ženski)	heterogamna (spoljašnji cvetovi sterilni)	heterogamna (spoljašnji cvetovi sterilni)	heterogamna (spoljašni cvetovi ženski)
Listići involukruma	jajasti, sa kožasto- opnastom resastom crnom ivicom	kožasto - opnasti, jajasto - lanceolatni do objajasti i ušiljeni	kožasto - opnasti, unutrašnji izduženi i obojeni	kožasto - opnasti, unutrašnji izduženi i šiljati	kožasto - opnasti, objajasti do lanceolatni
Receptakulum	sa 1.3 – 1.5 cm dugačkim, šilastim, apikalno kukastim paljama, dužim od cvetova	sa kožasto - opnastim, apikalno resastim, srebrnastim ljuspama, kraćim od cvetova	sa kožasto - opnastim, linalno - lancetastim ljuspama dužim od cvetova	sa kožasto-opnastim ljuspama	sa kožasto - opnastim, lanceolatnim do šilastim ljuspama
Nastavci antera	kratki, nedeljani	kratki, usečeni do celi	kratki, usečeni do celi	kratki, usečeni do celi	kratki, usečeni do celi
Grane stubića	kratke, razilaziće, vrh šiljat	kratke, razilaziće, vrh šiljat	vrlo kratke, razilaziće, vrh tup	vrlo kratke, povezane vrh tup	vrlo kratke, razilaziće, vrh tup
Cipsela	glatka, bez krune	svilasta	svilasta	svilasta, izbrazdana	dimorfna, glatka ili delimično svilasta
Struktura papusa	homomorfan, jednoredan, peraste čekinje	homomorfan, jednoredne čekinje, bazalno glatke, apikalno hrapave	homomorfan, jednoredne, kožasto-opnaste ljuspe, bazalno glatke, apikalno hrapave	homomorfan, jednoredne, kožasto - opnaste ljuspe, bazalno glatke, apikalno hrapave	homomorfan, jednoredne, kožasto - opnaste ljuspe, bazalno glatke, apikalno hrapave
Insercija papusa	direktno vezan na gornjoj ivici cipsele	direktno vezan na gornjoj ivici cipsele	direktno vezan na gornjoj ivici cipsele	direktno vezan na gornjoj ivici cipsele	direktno vezan na gornjoj ivici cipsele



## 1.6. Dosadašnja anatomska istraživanja predstavnika *Xeranthemum* grupe

U okviru *Xeranthemum* grupe anatomska istraživanja su ograničena na analizu cipsela (Petit 1996; Dittrich 1996; Häffner 2000; Jana i Mukherjee 2014; Ozcan i Akinci 2019). Anatomska istraživanja vegetativnih struktura, involukruma i cvasti nisu rađena.

Petit (1996) je uradio kladističku analizu na osnovu morfoloških karaktera za 45 rodova u okviru tribusa Cardueae kako bi utvrdio odnose između istraživanih rodova. Ukupno je obrađeno 75 karaktera brakteja, krunice, prašnika, stubića i cipsele. Ustanovio je da je tribus Carlininae parafiletski i predložio novu klasifikaciju unutar tribusa Cardueae. Koristio je sledeće karaktere cipsele: zid perikarpa (prisustvo/odsustvo hipodermisa; prisustvo/odsustvo ekskrecionog sloja; prisustvo/odsustvo sklerenhimskih snopića), epidermis teste (izduženost ćelija; sklerifikovanost zidova ćelija, oblik ćelija, prisustvo/odsustvo anastomoziranih zadebljanja, izgled gornje površine), elajozom (razvijen/nerazvijen u zoni odvajanja cipsele; tkivo elajozoma diferencirano/nediferencirano), hilum (hilum lateralan/bazalni; hilum lateralni/kaudatni).

Petit (1996) je ustanovio da je zid cipsele izgrađen od dva sloja: spoljašnji, predstavlja epidermis perikarpa i unutrašnji integument (testa). Između epidermisa perikarpa i teste, prisustvo nekoliko sklerenhimskih snopića karakteriše rodove *Xeranthemum*, *Chardinia* (Lavialle 1912), *Siebera* i *Amphoricarpos*. Prisustvo ovih sklerenhimskih snopića se smatra izvedenim stanjem. Ova istraživanja pokazala su da su kod *Xeranthemum* grupe, ćelije epidermisa radijalno izdužene sa sklerifikovanim zidovima. Kod *Saussurea albescens* i *Staelina dubia* L. ćelije epidermisa su potkovičastog oblika.

Pokazano je da u mnogim slučajevima zidovi ćelija parenhimskog tkiva zadebljavaju ili se lignifikuju, dok u suprotnom, parenhim nestaje pri sazrevanju ploda. Unutrašnji region parenhima u plodu *Helianthus annuus* L. predstavlja rastresito tkivo sačinjeno od okruglih ćelija sa međućelijskim prostorima; rastresit lakunarni parenhim je, takođe, uočljiv kod plodova *Echinops* i *Xeranthemum* (Häffner 2000).

Anatomska istraživanja cipsele vrste *X. annuum* (Ozcan i Akinci 2019) pokazala su sledeće karakteristike: mezokarp je izgrađen od sklerenhimskog i parenhimskog tkiva, kristali i sekretorna tkiva su odsutni, epidermske ćelije teste imaju nepravilan oblik kvadra,



endosperm je jednoslojan, a fitomelaninski sloj odsustvuje. Takođe, Jana i Mukherjee (2014) su pokazali da mezokarp cipsele vrste *X. annuum* sadrži 16 – 18 rebara sa sklerenhimskim ćelijama. Međutim, isti autori su pokazali da je endosperm kod ove vrste dvoslojan.

Kod *Carduinae* endosperm ne varira mnogo u svom izgledu. U zreloom stanju, endosperm formira jednoslojno tkivo izgrađeno od posebnih postojanih ćelija koje okružuju embrion. Samo pri bazi semena endosperm je izgrađen od nekoliko slojeva ćelija. Kod *Berardia* endosperm je dvoslojan (Häffner 2000). Dittrich (1996) je zapazio jednoslojan endosperm za većinu *Carlininae*, osim kod rodova *Cardopatium*, *Amphoricarpos* i *Tugarinovia* Iljin, kod kojih je endosperm dvo- ili troslojan.



### 1.7. Dosadašnja fitohemijska istraživanja predstavnika *Xeranthemum* grupe

U okviru *Xeranthemum* grupe fitohemijski su istraživane pojedine vrste iz rodova *Amphoricarpos* (Djordjević i sar. 2004, 2006; Jadranin i sar. 2013; Cvetković i sar. 2014, 2018) i *Xeranthemum* (Powel i sar. 1967; Samek i sar. 1977; Serkerov i Tairov 1978; Zemtsova i Molchanova 1979; Fikenscher i sar. 1980; Hubel i sar. 1982; Schwind 1990; Nahrstedt i Schwind 1992; Skaltsa i Lazari 2000; Dekić i sar. 2015). Vrste ostalih rodova su fitohemijski neistražene.

Djordjević i sar. (2004) su analizirali specijalizovane metabolite iz nadzemnih delova vrsta *A. neumayeri* ssp. *neumayeri* i *A. neumayeri* ssp. *murbeckii* (taksonomija prema Webb 1972) prikupljenih sa lokaliteta Orjen, odnosno Visitor iz Crne Gore.  $^1\text{H}$  NMR analiza je pokazalo da su  $\Delta^{11(13)}$  seskviterpenski  $\gamma$ -laktoni glavne komponente ( $\geq 1\%$  po suvoj masi biljnog ekstrakta) u sirovim ekstraktima nadzemnih delova istraživanih vrsta. Preparativnom hromatografijom na silika gelu je razdvojeno 13 jedinjenja (gva-11(13)-en-12,6a-olid), nazvanih amforikaprolidi sa istom relativnom konfiguracijom osnovnog skeleta ( $1\alpha\text{H}, 4\beta\text{H}, 5\alpha\text{H}, 7\beta\text{H}$ ). Zajednička osobina svih izolovanih gvajanolida je slobodna ili esterifikovana (acetat ili izovalerat) hidroksilna grupa na  $\alpha$ -poziciji C(15) $\text{H}_2$ . Uobičajena strukturalna osobina laktona 2 – 13 je  $3\beta, 15$ -dioksigenacioni obrazac. Jedini izuzetak je bio seskviterpenski lakton 1 (3-deoksiamforikarpolid), koji sadrži jedan konstituent sa kiseonikom (15-OH). Osam od 13 laktona je imalo dodatni oksigenisani konstituent  $9\beta\text{-OH}$  (5 i 6),  $2\alpha\text{-OH}$  (8-12), ili  $2\alpha\text{-OAc}$  (13). Jedinjeje 7 je epoksidovalo na  $10\alpha(14)$  - poziciji, dok ostali laktoni imaju  $10(14)$  dvostruku vezu.

U drugoj studiji, Djordjević i sar. (2006) su uradili fitohemijska istraživanja vrste *A. neumayeri* ssp. *murbeckii* (taksonomija prema Webb 1972), sakupljene sa planine Maja Karanfili koja pripada planinskom lancu Prokletije. Iz nadzemnih delova ove vrste autori su identifikovali 11 gvajanolida sa istom relativnom ( $1\alpha\text{H}, 4\beta\text{H}, 5\alpha\text{H}, 7\alpha\text{H}$ ) konfiguracijom osnovnog skeleta. Svi su sadržali  $\text{CH}_2\text{OX}$  (X = H, acetyl ili izovaleroil) grupu na  $4\alpha$ -poziciji, tipično sa amforikaprolide. Četiri jedinjenja (1 - 4) su izolovana ranije od iste vrste, ali sa različitih lokaliteta. Gvajanolidi 5 – 11 su nova jedinjenja. Seskviterpenski laktoni 7 i 8 su epoksidovali na  $10\alpha(14)$ -poziciji. Umesto  $\Delta^{11(13)}$ -dvostruke veze, koja je



uočena u svim prethodno izolovanim gvajanolidima iz iste vrste, četiri laktone su sadržala 11 $\alpha$ ,13- diol (8 - 10) ili 11 $\alpha$ -OH,13-hloro (11) delove.

Jadranin i sar. (2013) su analizirali sastav neutralnih lipida kutikule listova vrste *A. autariatus* ssp. *autariatus* sakupljene u kanjonu Tare (Crna Gora) primenom gasne hromatografije/masene spektrometrije (GC/MS) (nepolarna frakcija), LC- ESI TOF MS i <sup>1</sup>H NMR spektroskopije (polarnija frakcija). Nepolarna frakcija (oko 15% od ukupnog ekstrakta) sadržala je C27 – 33 *n*-alkane, dominantne sa neparnim brojem ugljenikovih atoma. LC- ESI MS and <sup>1</sup>H NMR analize polarnije frakcije su detektovale 13 seskviterpenskih laktone, koji su bili sa udelom od oko 97.5% u smeši laktone. Ova jedinjenja su identifikovana kao gvajanolidi, tzv. amforikarpolidi, pronađeni prethodno kod ovog vrsta roda.

Cvetković i sar. (2014) su analizirali sastav frakcije seskviterpenskih laktone iz neutralnih lipida kutikule listova dve vrste iz severnog dela Crne Gore, kanjon Tara (*A. autariatus* ssp. *autariatus*) i planine Zeletin (*A. autariatus* ssp. *bertisceus*). Utvrdili su 17 seskviterpenskih laktone gvajanolidnog skeleta, nazvanih amforikarpolidi, tipične za ovaj rod. Devet od 17 su bile nove komponente, i njihova struktura je okarakterisana detaljnim analizama upotrebom infracrvene spektroskopije, nuklerano-magnetne rezonantne spektroskopije i masene spektrometrije.

Cvetković i sar. (2018) su uradili metabolomičku studiju 58 uzoraka vrsta roda *Amphoricarpos* sakupljenih sa sedam lokaliteta u Crnoj Gori upotrebom <sup>1</sup>H NMR spektroskopije kombinovane sa multivarijatom analizom podataka. Od osnovnih metabolita identifikovani su holin, malična kiselina, amino kiseline alanin i valin i sukroza. Od specijalizovanih metabolita su detektovana tri seskviterpenska  $\gamma$ - laktone gvajanolidnog tipa.

Powel i sar. (1967) su izolovali neuobičajene masne kiseline iz semena vrste *X. annuum*. Pored uobičajenih masnih kiselina palmitinske, stearinske, oleinske, linoleinske i linolenske, pokazano je da ulje iz semena sadrži veći broj neuobičajenih masnih kiselina. Ove kiseline su: cis- 5,cis-9,cis-12-oktadekatrienoinska, 5%; cis-9-L,10-epoksioktadekanoinska, 3%; cis-9-L,10-lepoksi-cis-12-oktadekanoinska (koronarinska)



8%; i cis-12-D, 13-D-epoksi-cis-9-oktadekanoinska (vernolinska), 2%; kao i smešu dve hidroski kiseline, 11%.

Samek i sar. (1977) su iz nadzemnih delova vrste *X. cylindraceum* po prvi put izolovali seskviterpensi lakton. Na osnovu fizičkih metoda, pre svega  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopije, ustanovljena je njegova parcijalna stereoformula i dato je ime kserantolid.

Serkerov i Tairov (1978) su iz acetonskog ekstrakta nadzemnog dela vrste *X. cylindraceum*, sakupljenih u vreme cvetanja, nakon hromatografije na koloni od aluminijum oksida i frakcija eluiranih pomoću smeše rastvarača heksana i etra (1: 4), izolovali kristalnu supstancu sastava  $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}$ , tt 195-196 °C (acetone - metanol). Poređenjem tačke topljenja, sastava i IR i NMR spektara izolovane supstance sa triterpenskim alkoholom ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ) izolovanog iz vrste *Centaurea squarrosa* Roth potvrđeno je da je u pitanju isto jedinjenje.

Zemtsova i Molchanova (1979) su analizirali flavonoide i triterpenoide vrste *X. annuum* sa Krima. Analiza pomoću dvodimenzionalne hromatografije i rezultati kvalitativnih reakcija su pokazali da je u ekstraktu dobijeno 6 supstanci polifenolne prirode. U reakciji kisele hidrolize, kao produkti, detektovane su dve supstance: luteolin i kvercetin. Metanolni ekstrakt nadzemnog dela je analiziran na prisustvo triterpena. Tankoslojna hromatografija u raznim sistemima rastvarača je pokazala prisustvo četiri jedinjenja koja su, na osnovu rezultata bojenih reakcija, označena kao triterpenoidi. Triterpenoidi su izolovani pomoću Soksletovog ekstraktora i kolonske hromatografije. Frakcije su analizirane pomoću IR i UV spektroskopije. Izolovano jedinjenje je okarakterisano kao urzolinska kiselina.

Unutar reda Asterales nekoliko rodova sadrži cijanogene vrste, među kojima je i *X. cylindraceum*. Ova vrsta proizvodi cijanogene plodove koji su prvo ispitivani od strane Fikenscher i sar. (1980). Autori su izolovali zierin i druge tentativno identifikovane ili neidentifikovane cijanoglikozide. Zatim su Hubel i sar. (1982) iz iste vrste izolovali disaharid zierinksilozid. Ponovna istraživanja cipsela su dovela do jednog novog i dva poznata cijanogena jedinjenja prisutna u malim količinama. Poslednja dva su identifikovana (TLC, GLC,  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR) kao sambunigrin i epilukumin. Nepoznato jedinjenje je okarakterisano, svojim produktima razgradnje dobijenim pomoću enzimatske i



kisele hidrolize (apioza, glukoza, ksiloza, kafeinska kiselina, zierin, zierinksilozid) i pomoću  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ - NMR spektroskopskih tehnika, kao kserantin. Kserantin je prvi trisaharid i prvo jedinjenje koje sadrži apiozu unutar serije cijanogenih glikozida (Schwind 1990). Nahrstedt i Schwind (1992) su pokazali da pri uvođenju aminokiselina L-fenilalanin, L-tirozin i DL-meta-tirozin u nezrele plodove *X. cylindraceum*, jedino aminokiselina fenilalanin uzrokuje povećanje akumulacije cijanogenog glikozida zierina. Njihova istraživanja su dokazala da je L-fenilalanin biogenetski prekursor m-hidroksilovanog zierina u ahenijama ove vrste.

Skaltsa i Lazari (2000) su analizirali sastav etarskog ulja vrste *X. annum* iz Grčke. Etarsko ulje dobijeno parnom destilacijom nadzemnih delova je analizirano pomoću GC-MC. Ukupno je identifikovano 97 jedinjenja (93.8% od ukupnih isparljivih jedinjenja). Etarsko ulje je okarakterisano velikom količinom monoterpena (25%) i seskviterpenskih ugljovodonika (24.6%) od kojih su  $\beta$ -pinen (15.2 %) i  $\beta$ -kariofilen (8.6%) bile dominantne komponente.

Dekić i sar. (2015) su analizirali sastav, biološku aktivnost i hemotaksonomski značaj etarskog ulja i etarskih ekstrakata vrsta *X. annuum* i *X. cylindraceum*. Identifikovano je ukupno 254 komponenti. Terpenoidi su činili najveći deo i u etarskim uljima, kao i u etarskim ekstraktima (51.8 – 65,7%, i 50.7%). Među seskviterpenoidima, ekstrakti oba ispitivana taksona sadržali su gvajanolid kserantolid, njegove 11,13-dihidro derivate, i dva dodatna seskviterpenska laktone: eudezmanolid, 11,13-dihidroizoalantolakton i pseudogvajanolid, konfertin.



## 1.8. Dosadašnja taksonomska i filogenetska istraživanja predstavnika *Xeranthemum* grupe

Taksonomska istraživanja *Xeranthemum* grupe rađena su u svrhu razjašnjenja taksonomskih odnosa kao i filogenije grupe (Garnatje i sar. 2004a, 2004b; Barres i sar. 2013; Herrando-Moraira 2019). Kako je taksonomija balkanskih taksona roda *Amphoricarpus* Vis. 1847. (*Amphoricarpus* Vis. prema I. A. Linczevsky; *Amphorocarpus* Post and Ktze.) veoma kompleksna, otuda postoje i radovi vezani za tu temu.

Važan segment u sistematici i filogeniji Asteraceae je postojanje sistematske implikacije u varijaciji količine DNK unutar same familije (Godelle i sar. 1993; Zoldos i sar. 1998; Cerbah i sar. 1999; Torrell i Vallès 2001). U okviru *Xeranthemum* grupe variranje količine DNK je prilično konzistentno sa molekularnom filogenijom. U okviru ove klade, prema dosadašnjim istraživanjima, rod *Amphoricarpus* zauzima bazalno mesto u odnosu na ostale rodove, dok je položaj roda *Chardinia* bazalan u odnosu na rod *Xeranthemum*, koji uključuje *sensu lato* i rod *Siebera*. Ranije opisan kompleks (*Xeranthemum* - *Siebera*) je monofiletski, ali sa nerazjašnjenom sistematikom na nivou vrsta. Pokazano je da u okviru Cardueae postoji zavisnost između količine nuklearne DNK i nekoliko karioloških, ekoloških i filogenetskih karaktera. Ovaj podatak je posebno značajan za *Xeranthemum* grupu, jer ovaj kompleks uključuje taksone sa različitim brojem hromozoma gde razumevanje organizacije genoma, zajedno sa podacima molekularne filogenije, može osvetliti odnose između vrsta, kao i njihovu evoluciju. Ovi podaci potvrđuju neophodnost taksonomske revizije kompleksa (Garnatje i sar. 2004a).

Garnatje i sar. (2004b) su ustanovili različite brojeve hromozoma ( $x = 5, 6$  i  $7$ ) koji se pojavljuju u ovom kompleksu, a koji pokazuje veliki nivo kariotipske raznolikosti. Sedam istraživanih taksona pokazuju različit broj hromozoma (*A. neumayeri*  $2n = 24$ ; *Ch. orientalis*  $2n = 22$ ; *S. pungens*  $2n = 20$ ; *X. annuum*  $2n = 12$ ; *X. cylindraceum*  $2n = 20$ ; *X. inapertum*  $2n = 28$ ; *X. longipapposum*  $2n = 14$ ). Samo dva taksona imaju isti broj hromozoma, a u rodu *Xeranthemum* postoje četiri različita broja hromozoma. Sve vrste su okarakterisane kao diploidne, ali je teško utvrditi njihov osnovni broj hromozoma, imajući u vidu da se, generalno, brojevi preko  $2n = 20$  hromozoma ( $x = 10$ ) smatraju predačkim





poliploidima (Stebbins 1971). Aneuploidija je odigrala ulogu u redukciji ovih ranih poliploidnih osnovnih brojeva (Levis 1980). Većina autora se slaže da su taksoni sa osnovnim brojevima hromozoma većim od 9, 10 ili 11 često diploidisani paleopoliploidi (Grant 1982 a, b; Otto i Whitton 2000; Wendel 2000).

Rod *Amphoricarpus* (*Amphoricarpus* VISIANI 1847: 27. — *Amphoricarpus* BENTHAM & HOOKER 1873: 465 et aut. plur. — *Barbeya* ALBOW 1893: 143, non SCHWEINFURTH 1891. — *Kusnetzowia* WINKLER ex LIPSKY 1898: 284 in synonym. — *Amphorocarpus* POST & KUNTZE 1903: 26. — *Albowiodoxa* WORONOW ex KOLAKOWSKI 1949: 259, nom. illegit. (diagn. lat. defic) je, u zavisnosti od stava autora, svrstavan u različite tribuse i podtribuse familije Asteraceae. Bremer (1994) ga svrstava u podtribus Carlininae, tribusa Cardueae. Prema Visiani (1842, 1847, 1852) pripada tribusu Xeranthemeae Less., a prema Dittrich (1977) tribusu Carlineae Cass. Takođe, neki autori su ga svrstali i u subtribus Carduinae Dumort, tribusa Cardueae sensu lato, u grupu *Xeranthemum* (serija 1) (Petit i sar. 1996). Iako sadrži mali broj vrsta, rod *Amphoricarpus* predstavlja jedan od izuzetno interesantnih i kompleksnih rodova kako sa taksonomskog tako i sa filogenetskog aspekta.

Tipsku vrstu, *A. neumayeri*, je opisao Visiani (1844) na osnovu primerka sakupljenog od strane F. Neumayer u Dinarskim planinama, na Orjenu, na granici Crne Gore i Bosne i Hercegovine. Inicijalno uključen u rod *Jurinea*, Visiani (1847) ga je kasnije opisao kao odvojen rod *Amphoricarpus*, na osnovu amforastog oblika obodnih cipsela. Dijagnostičke karakteristike ovog roda po Visiani (1847) su sledeće: bazalni i donji listovi stabljike su zašiljeni, uvijeni po margini, obično se protežu do sredine stabljike cvasti koja nosi jednu glavicu. Spoljašnji listići involukruma su duguljasto - jajastog oblika, u 2 – 3 reda, i imaju izduženi šiljak (mukro) koji jasno prelazi gornju ivicu (Slika 7 - 3). Obodne ahenije su spljoštene, dlakave, široko okriljene i sa istaknutim ušima, zbog čega podsećaju na amfore (Slika 7 - 2).

Dalja istraživanja ovih taksona na Balkanskom poluostrvu su pokazala značajna variranja u habitusu, obliku listova i karaktera cveta u populacijama. Murbeck (1891) je varijetet biljku iz Hercegovine (Bosna i Hercegovina) (primerci sa planine Velež blizu Mostara) sa širokim listovima opisao kao *A. neumayeri* Vis. var. *velezensis* Murbeck, a koji



se prema njemu može naći na širem delu areala roda na Balkanu (cf. Rohlena 1907; Maly 1928). Ipak, Beck (1894) je smatrao da je oblik lista varijabilan i da nije u korelaciji sa drugim karakterima. Zato je biljke sa širokim listovima označio kao *A. neumayeri* Vis. f. *latifolia* G. Beck. Baldacci (1894) i Rohlena (1907) su sumnjali u taksonomsku značajnost varijabilnosti oblika lista. Međutim, Bošnjak (1936) je opisao ove širokolisne biljke iz Bosne i Hercegovine (Čvrstica, između ostalog) kao podvrstu *A. neumayeri* Vis. subsp. *murbeckii* Bošnjak. Takođe, kao značajnu razliku od tipske vrste, Bošnjak navodi oblik spoljašnjih involukralnih listića koji su široki do okrugli, sa vrlo kratkim šiljkom (mukro) koji jedva prelazi ili ne prelazi gonju ivicu (Slika 7 – 6). Dodatno, obodne cipsele su kod ove podvrste usko okriljene, gole i bez ušiju (Slika 7 – 5).

Sa druge strane, Fukarek (1965), koji je intenzivno proučavao distribuciju i ekološke karakteristike roda *Amphoricarpos* na Balkanu, je uočio da je varijabilnost listova velika čak i u okviru populacija. Biljke sa dugačkim, uskim, zašiljenim listovima (var. *neumayeri*) su uobičajeno bliže Jadranskom moru (planinski venci Orjen, Bijela gora, Lovćen), dok u ostalim područjima dominiraju širokolisne biljke, var. *murbeckii* i forma između te dve (“var. *intermedia*”) (Fukarek 1965). Fukarek se ipak uzdržao od klasifikovanja populacija na ta tri entiteta.

Blečić i Mayer (1967) su na osnovu dotadašnjih radova kao i na osnovu njihovih istraživanja i zapažanja uradili opsežnu studiju roda *Amphoricarpos* na Balkanu. Opisali su širokolisne populacije kao *A. autariatus* Blečić et Mayer i zapazili da osim razlika u obliku listova ova dva taksona se mogu razlikovati na osnovu oblika cipsele, širine krilca cipsele kao i oblika involukralnih listića, pre svega kakav je oblik šiljka (mukro), odnosno da li prelazi gornju ivicu ili ne prelazi. U okviru vrste *A. autariatus* autori su prepoznali dve podvrste, subsp. *autariatus* i subsp. *bertisceus* Blečić et Mayer. Ono što povezuje ove dve podvrste je priroda spoljašnjih involukralnih listića, koji su u 2 – 3 reda, okruglo - jajastog oblika, sa vrlo kratkim, jedva приметnim šiljkom (mukro) (Slika 7 – 6 i 8). Takođe, obodne cipsele su slabo okriljene, gole i bez ušiju (Slika 7 – 5 i 7).

Glavne morfološke karakteristike koje prema Blečić i Mayer (1967) razlikuju ove dve podvrste date su u ključu istog rada (Blečić i Mayer 1967). *A. autariatus* subsp. *autariatus* ima široko lancetaste listove, izraženo tupe, sa neuvijenom marginom, (10-) 15 –



25 (-30) mm široki, kratki, kao trećina stabljike cvasti, koja ima 1 – 3 glavice. Cvetovi su beli. Obodne cipsele su skoro gole. *A. autariatus* subsp. *bertisceus* ima uže listove, više manje oštre, uvijene na margini, (6-) 8 – 10 (-12) mm široke, koji obično dosežu do sredine stabljike cvasti, koja pretežno ima jednu retko dve glavice. Cvetovi su svetlo roze. Obodne cipsele su više manje gole (Slika 7).

Prva podvrsta *A. autariatus* subsp. *autariatus* (koja zapravo obuhvata delom areal bosansko-hercegovačke podvrste *A. neumayeri* Vis. subsp. *murbeckii* Bošnjak) ima severozapadnu distribuciju, odnosno endemična je za Bosnu i Hercegovinu i Crnu Goru, dok je druga podvrsta *A. autariatus* subsp. *bertisceus* rasprostranjena na jugoistoku uključujući Crnu Goru, Makedoniju, Srbiju (Kosovo), Albaniju i severnu Grčku (Blečić i Mayer 1967) (Slika 8). Na planini Durmitor u Crnoj Gori obe podvrste koegzistiraju, prva u klisuri (600 – 900 mnv), a druga na višim nadmorskim visinama (preko 1.600 m; Blečić i Mayer 1967).

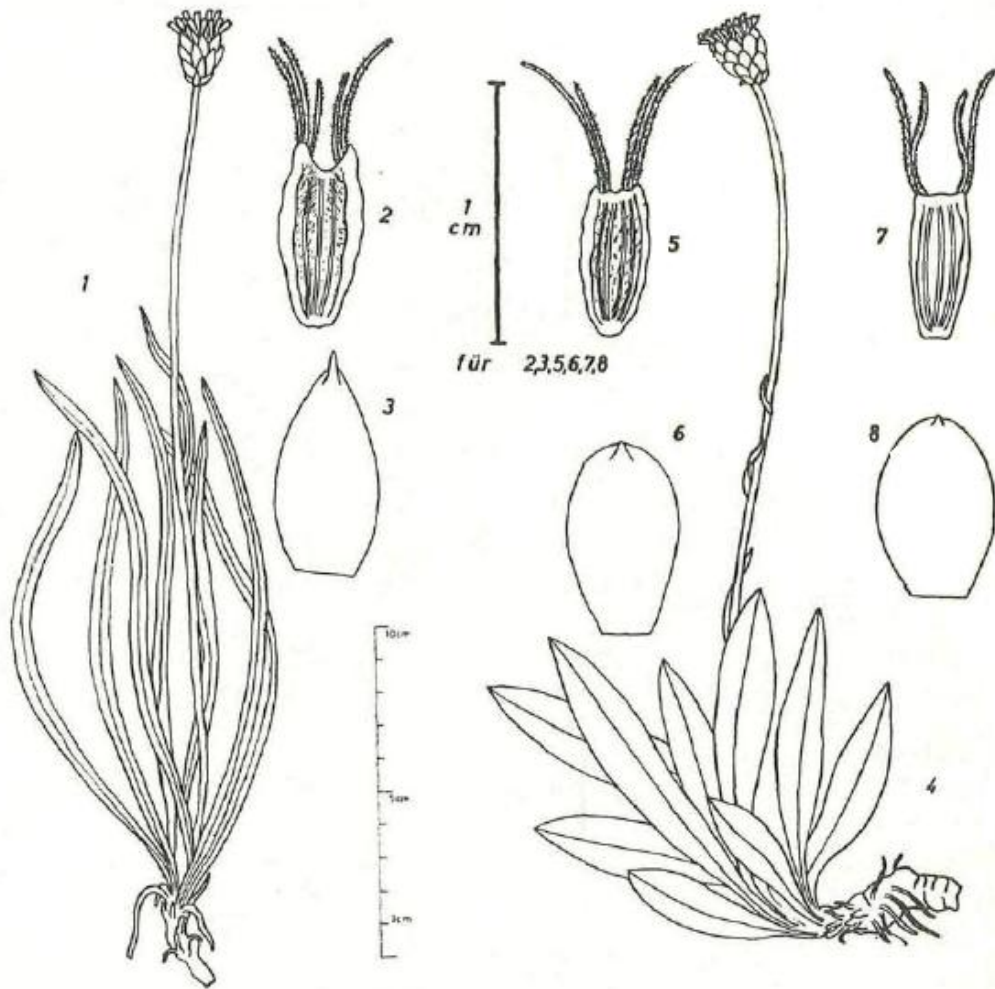
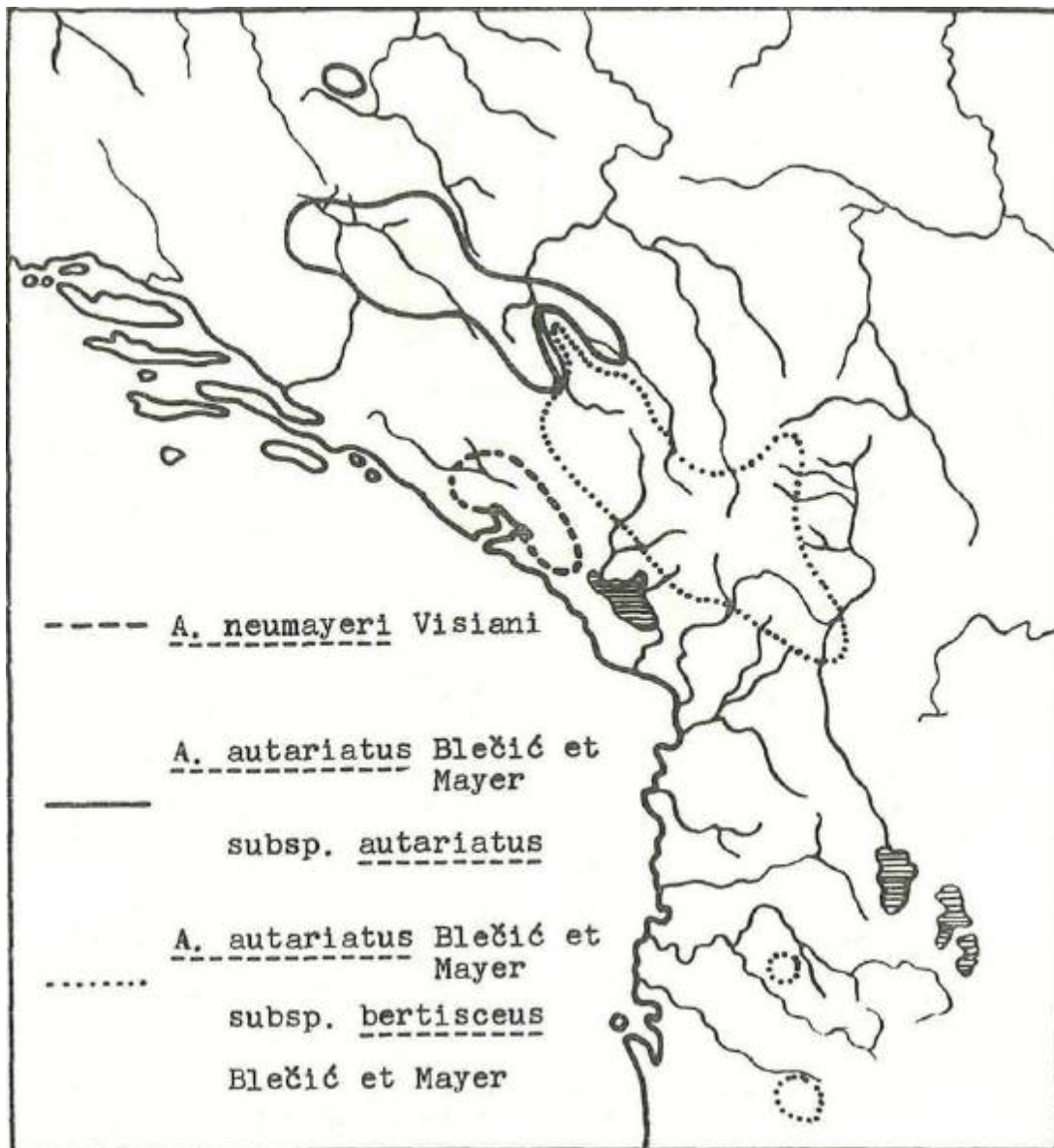


Abb. 1—8. Europäische *Amphoricarpos*-Sippen. — *A. neumayeri* VIS.: Habitus (Abb. 1), Randachäne (Abb. 2), äußeres Involukralblatt (Abb. 3). — *A. autariatus* BLEČIĆ et MAYER subsp. *autariatus*: Habitus (Abb. 4), Randachäne (Abb. 5), äußeres Involukralblatt (Abb. 6). — *A. autariatus* BLEČIĆ et MAYER subsp. *bertisceus* BLEČIĆ et MAYER: Randachäne (Abb. 7), äußeres Involukralblatt (Abb. 8).

Slika 7. Taksoni roda *Amphoricarpos* na Balkanu. Originalni potpis. (preuzeto iz rada Blečić i Mayer 1967).



Slika 8. Rasprostranjenje balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* (preuzeto iz rada Blečić i Mayer 1967).



Schwarz (1970) je prepoznao samo jednu vrstu *A. neumayeri* sa tri podvrste, subsp. *neumayeri*, subsp. *bertisceus* i subsp. *murbeckii*, tretirajući *A. autariatus* subsp. *autariatus* kao sinonim poslednje. Takođe Webb (1976) je u svom tretmanu roda *Amphoricarpos* u Flori Evrope prepoznao jednu vrstu *A. neumayeri* sa dve podvrste, subsp. *neumayeri* i subsp. *murbeckii*, tretirajući *A. autariatus* kao sinonim poslednje. Prva podvrsta ima rasprostranjenje na primorskim planinama (Orjen i Lovćen) i u okolnoj Hercegovini, dok se druga može naći u svim ostalim delovima distribucije vrste (Webb 1976). Ovaj pristup su podržali takođe i Strid i Tan (1991). Farr i sar. (1979) i Greuter i sar. (1993) su naglasili nepravilnost u imenu *A. neumayeri*, jer je naziv dobijen na osnovu *Jurinea neumayeriana* Vis.. Stoga je Greuter (2003) predložio novo - staro (*A. neumayerianus* (Vis.) Vis.) ime *A. neumayerianus* (Vis.) Greuter.

Dakle na balkanskom poluostrvu koegzistiraju tri ili četiri taksona koji formiraju balkanski kompleks roda *Amphoricarpos*. Raniji istraživači pri determinaciji taksona unutar roda *Amphoricarpos* bazirali su se na morfološkim karakteristikama listova, involukruma, a jedan od karaktera je bio i boja krunice (Blečić i Mayer 1967). Međutim, pokazalo se da je veoma teško, samo na osnovu ovih karaktera, sa sigurnošću dijagnostikovati vrste, a posebno niže taksone zbog značajnog preklapanja morfoloških karaktera. Takođe, ne postoji jasna granica u arealima između podvrsta vrste *A. autariatus*, kao i da areal vrste *A. neumayerianus*, nije jasno izdvojen, već se ova vrsta sporadično preklapa, ili je blizu areala *A. autariatus*.

Čaković i sar. (2015) su uradili morfometrijsku i molekularnu analizu populacija roda *Amphoricarpos* na Balkanu. Molekularna analiza se odnosila na korišćenje AFLP markera (polimorfizam dužine amplifikovanih markera) kao i jedarne i plastidne DNK sekvence (ITS i rps16-trnK). ITS markere su takođe korišćeni da bi rekonstruisali prostorno - vremensku evoluciju. AFLP i ITS analize su razdvojile geografski disjunktne populacije, najsevernije od najjužnijih. Divergencija unutar kontinuiranog područja distribucije u centru je površna, ali omogućava prepoznavanje tri uglavnom alopatrijska klastera. Morfometrijski podaci, međutim, nisu bili u saglasnosti ni sa ranijim taksonomskim tretmanima roda niti sa dobijenim genetičkim podacima. Autori su se stoga uzdržali od razlikovanja bilo koje genetičke grupe kao taksonomskog entiteta i sve populacije na



balkanskom poluostrvu tretirali kao jednu vrstu - *A. neumayerianus*, koja je genetički i morfološki varijabilna.

Cvetković i sar. (2014) su uradili metabolomičku studiju uzoraka vrste roda *Amphoricarpos* iz Crne Gore upotrebom  $^1\text{H}$  NMR spektroskopije kombinovane sa multivarijatom analizom podataka. Utvrđeno je da je razlika između *A. autariatus* i *A. neumayeri* u prisustvu odgovarajućih seskviterpenskih laktona amforikaprolida. Dok je glavni seskviterpenski lakton kod *A. neumayeri* oksidovan na poziciji 2, oni koji su prisutni kod obe podvrste *A. autariatus* su oksidovani na poziciji 9. Dve podvrste, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*, su pokazale razlike u količini hlorogenske i jabučne kiseline (osnovni metaboliti), jedinjenjima koja nemaju hemotaksonomski značaj, a takođe ni razlike u njihovoj količini ne mogu biti hemotaksonomski značajne.

Iz svega pomenutog proizilazi činjenica da je neophodno uraditi taksonomsku reviziju i unutar roda *Amphoricarpos* na Balkanu, kao i odrediti mesto taksona u okviru *Xeranthemum* grupe.



## 1.9. Dosadašnja istraživanja biološke aktivnosti predstavnika *Xeranthemum* grupe

U okviru *Xeranthemum* grupe istraživanja biološke aktivnosti su bila vezana za pojedine vrste iz rodova *Amphoricarpos* (Attrog i sar. 2008; Jadranin i sar. 2013) i *Xeranthemum* (Samek i sar. 1977; Orhan i sar. 2006; Zabka i sar. 2010; Stanković i sar. 2011; Nikolova 2011; Radojević i sar. 2011; Dekić i sar. 2015; Bahmani i Zagarán 2016). Vrste ostalih rodova su neistražene sa aspekta biološke aktivnosti.

U studiji Attrog i sar. (2008) seskviterpenski  $\gamma$ -laktoni gvajanolidnog tipa (amforikaprolidi), izolovani iz nadzemnih delova dve podvrste vrste *Amphoricarpos neumayeri* (ssp. *neumayeri* i ssp. *murbeckii*) su istraživani pomoću reverzno - fazne tankoslojne hromatografije. Binarne smeše metanol - voda i tetrahidrofuran - voda su korišćene kao mobilna faza za određivanje parametara lipofilnosti  $R_M^0$  i  $C_0$ . Odgovarajuća jedinjenja su bila testirana na citotoksičnu aktivnost protiv HeLa i B16 ćelija. Hromatografski dobijeni parametri lipofilnosti bili su u korelaciji sa izračunatim  $\log P$  vrednostima i  $IC_{50}$  vrednostima. Analiza glavnih komponenti identifikovala je dominantni obrazac u hromatografski dobijenim podacima. Zaključeno je da su se hromatografski podaci pokazali kao pouzdani parametri za opisivanje lipofilnih svojstva ispitivanih jedinjenja, jer sadrže vrednije informacije od izračunatih vrednosti lipofilnosti. Zaključeno je da ovi rezultati mogu biti korisni za buduće eksperimentalne i teorijske studije o medicinskim istraživanjima gvajanolida i jedinjenja slične strukture.

Jadranin i sar. (2013) su analizirali antifungalnu aktivnost površinskih ekstrakata listova vrste *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autariatus* sakupljene iz kanjona Tare (Crna Gora) upotrebom mikrodilucione metode. Ekstrakti su testirani na osam patogenih gljiva: *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*, *Trichoderma viride*, *Fusarium verticillioides* i *Fulvia fulvum*. Na osnovu rezultata zaključeno je da je spektar aktivnosti ekstrakata veoma širok, zavisno na koju vrste gljive su aplikovani, sa MIC vrednostima u opsegu od 0.01 – 0.25 mg/mL i MFC vrednostima u rasponu od 0.01 do 0.30 mg/mL. Ispitivani ekstrakti su pokazali veću aktivnost od bifonazola protiv *A. versicolor*, *F. verticillioides* i *F. fulvum*, kao i protiv *Penicillium* vrsta.





U slučaju drugih gljiva, uzorci su pokazali nešto manju ili sličnu aktivnost kao bifonazol. Autori su zaključili da amforikarpolidi mogu funkcionisati kao antifungalni agensi.

Podaci iz literature ukazuju da je vrsta *X. annuum* poznata u tradicionalnoj medicini kao izvor aktivnih supstanci (Vogl- Lukasser i Vogl 2004; Watson i Preedy 2008). Takođe, u turskoj narodnoj medicini pokazano je da ova vrsta leči bolove od opekotina i koristi se protiv zubobolje mešanjem sa duvanom (Ozaydin i sar. 2006; Tuzlaci i Dogan 2010; Altundag i Ozturk 2011).

Samek i sar. (1977) su iz nadzemnih delova vrste *X. cylindraceum* izolovali seskviterpenski lakton – kserantolid i pokazali da ova supstanca ima znatnu *in vitro* citotoksičnu aktivnost protiv HeLa- i KB- tipa tumorskih ćelija.

Orhan i sar. (2006) su ispitivali antiholinesterazni, antioksidativni, antiinflamatorni i analgetički efekat ekstrakata cveta i stabljike sa korenom vrste *X. annuum*. Većina ekstrakata je pokazala inhibiciju preko 85% butirilholinesteraze i nije pokazala inhibiciju acetilholinesteraze. Hloroformni ekstrakt cvetova kao i etil - acetatni ekstrakt stabljike sa korenom su bili najefikasniji ( $97.85 \pm 0.94\%$  i  $96.89 \pm 1.09\%$ , respektivno). Etanolni ekstrakt stabljike sa korenom je pokazao odličnu aktivnost u DPPH ( $77.33 \pm 1.99\%$ ), kao i u FRAP testu, dok je heksanski ekstrakt stabljike sa korenom pokazao najveći kapacitet helatiranja metala ( $72.79 \pm 0.33\%$ ). Hloroformski ekstrakt stabljike sa korenom je pokazao odličan analgetički efekat (24.4%). Nije primećen antiinflamatorni efekat. Takođe, izolovani zierin i zierin ksilozid, iz etanolnog ekstrakta stabljike sa korenom, su bili neaktivni u testovima sa antiholinesterazom. Autori su zaključili, da cijanogena jedinjenja izolovana iz *X. annuum* nisu odgovorna za antiholinesteraznu aktivnost, već verovatno zbog prisutva urzolinske kiseline, triterpena pronađenog kod ove vrste, kao i flavonoida luteolina i kvercetina. Rezultati ukazuju da vrsta *X. annuum* sadrži antioksidativna i butirilholinesterazna inhibirajuća jedinjenja (Orhan i sar. 2006).

Zabka i sar. (2010) su analizirali antifungalno dejstvo nekih evroazijskih biljnih vrsta protiv opasnih patogenih i toksikogenih gljiva. Metanolni ekstrakti 46 lekovitih biljaka je analizirano u antifungalnom testu. Testiran je efekat inhibicije rasta protiv šest značajno patogenih i toksikogenih vrsta gljiva: *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *Penicillium expansum*, *P. brevicompactum*, *Aspergillus flavus* i *A. fumigatus*. Pokazano je



da se 14 vrsta biljaka, među njima i *X. cylindraceum* (zona inhibicije metanolnih ekstrakata bila je veća od 50% u koncentraciji od 2 mg mL<sup>-1</sup>) potencijalno mogu koristiti kao prirodni fungicidi.

Stanković i sar. (2011) su ispitivali antioksidativni i antimikrobni efekat, kao i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida metanolnog, acetonskog i etil - acetatnog ekstrakta vrste *X. annuum*. Ukupni sadržaj fenola je bio određen upotrebom Folin - Čokalteuovog reagensa i kretao se između 101.33 do 159.48 mg GA/g. Koncentracija flavonoida u različitim ekstraktima je bila određena spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum hloridom i rezultati su varirali od 22.25 do 62.42 mg RU/g. Antioksidativna aktivnost je testirana spektrometrijski korišćenjem DPPH reagensa i izražena u IC<sub>50</sub> (mg/mL) se kretala od 59.25 do 956.81 mg/mL. Najveći sadržaj fenola i sposobnost neutralizacije DPPH radikala su utvrđeni u acetonskom ekstraktu. *In vitro* antimikrobna aktivnost je određena mikrodilucionom metodom i utvrđene su minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), kao i minimalna mikrobicidna koncentracija (MMC). Testirano je 24 mikroorganizama, uključujući 15 sojeva bakterija (standardni i klinički sojevi) i 9 vrsta gljiva. Uočena je statistički značajna razlika u između aktivnosti ekstrakata. Acetonski ekstrakt je bio najaktivniji. Aktivnost acetonskog ekstrakta je bila u korelaciji sa ukupnim sadržajem fenola i koncentracijom flavonoida u ovom ekstraktu. Testirani ekstrakti su pokazali značajnu antibakterijsku aktivnost protiv G<sup>+</sup> bakterija i slabu do umerenu aktivnost protiv drugih mikroorganizama. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da se vrsta *X. annuum* može smatrati prirodnim izvorom polifenolnih jedinjenja sa veoma dobrom antioksidativnom i antimikrobnom aktivnošću (Stanković i sar. 2011).

Nikolova (2011) je ispitivala antioksidativnu aktivnost i sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja određenih bugarskih vrsta biljaka. Prema dobijenim rezultatima, zaključeno je da 16 od 38 testiranih biljnih ekstrakata, među kojima je i ekstrakt vrste *X. annuum*, imaju snažnu antioksidativnu aktivnost, prema DPPH testu. Rezultati ukazuju na moguće korišćenje ispitivanih biljnih vrsta, koje nisu tradicionalno do tada korišćenje kao izvora antioksidativnih agenasa (Nikolova 2011).

Radojević i sar. (2011) su pomoću mikrodilucione metode ispitivali *in vitro* antifungalnu aktivnost metanolnog, acetonskog i etil - acetatnog ekstrakta nekoliko biljnih

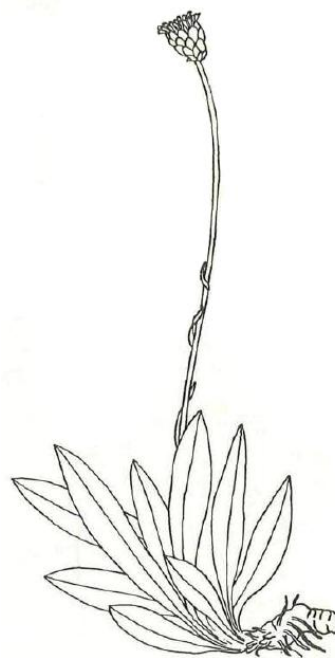


vrsta iz Srbije, među kojima je i *X. annuum*. Testiranje je izvršeno na četiri vrste roda *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* i *A. restrictus*. Testirani ekstrakti su pokazali značajnu antifungalnu aktivnost protiv *A. restrictus* i umerenu aktivnost u odnosu na druge vrste roda *Aspergillus*. Najbolje rezultate su pokazali etil - acetatni ekstrakti *Sideritis montana* L., *X. annuum* i *Sedum acre* L. Visoku antifungalnu aktivnost protiv *A. restrictus* pokazala su sva tri ekstrakta *X. annuum* (MICs 0.625 do 1.25 mg/mL). Acetonski ekstrakt ove vrste je pokazao značajnu aktivnost protiv *A. flavus* (MIC 1.25 mg/mL), dok je etil - acetatni ekstrakt pokazao najveću aktivnost protiv *A. niger* (MIC 1.25 mg/mL). Dobijeni rezultati su ukazali da se ekstrakti određenih biljaka mogu koristiti kao prirodni izvori supstanci koje mogu imati veliki značaj u prehrambenoj industriji (npr. kao konzervansi) (Radojević i sar. 2011).

Dekić i sar. (2015) su analizirali sastav i biološku aktivnost etarskih ulja i ekstrakata vrsta *X. annuum* i *X. cylindraceum*. Izolovani ekstrakti ovih vrsta su testirani na mikroorganizme mikrodilucionom metodom. Testirani ekstrakti su pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost, u rasponu od 30 do 260 mg/mL, najveću protiv *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus* (važan patogen na ljudima), sa vrednostima MIC bliskim vrednostima hloramfenikola.

Bahmani i Zagarani (2016) su u etnobotaničkoj studiji o upotrebi biljaka za lečenje kamena u urinarnom sistemu od strane tradicionalnih lekara Irana zabeležili 16 vrsta iz 13 familija, među kojima je i vrsta *X. longepapposum*. Pokazano je da dekokt napravljen od nadzemnih delova ove vrste ima dejstvo protiv kamena u bubregu. Takođe, preko 70% herbalista (28 od 35) spomenulo je biljku *X. longepapposum* za lečenje kamena u bubregu (Bahmani i Zagarani 2016). Rezultati ovakvih istraživanja upućuju na dalja fitohemijska i farmakološka istraživanja ove vrste.

Ilustracija *Amphoricarpos autariatus* Blečić et Mayer: Habitus, Blečić i Mayer (1967). Die europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos* VISIANI. Phytion, 12, 150-158



## 2 CILJEVI RADA



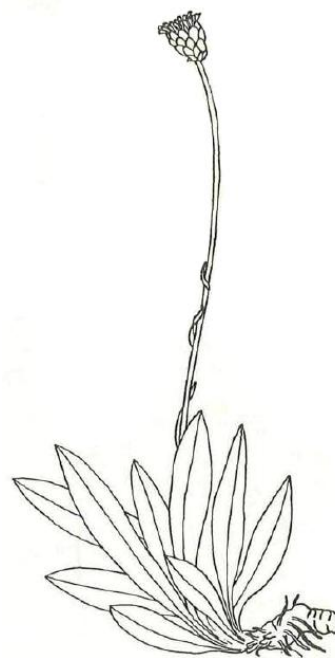
## 2. CILJEVI RADA

*Xeranthemum* grupa obuhvata pet rodova: *Shangwua*, *Amphoricarpos*, *Chardinia*, *Xeranthemum* i *Siebera*. Grupa je relativno dobro okarakterisana, ali ipak sa još uvek nedovoljno razjašnjenom taksonomijom i filogenijom. Pregledom literature ustanovljeno je da su predstavnici ove grupe sa anatomske, mikromorfološke i fitohemijske aspekta gotovo neistraženi, dok su sa morfološke i molekularne aspekta nedovoljno istraženi. Zato postoji potreba za detaljnim istraživanjima sa ovih aspekata kako bi se bolje sagledala filogenija grupe. Takođe, dodatno, taksonomija endemičnog i reliktnog roda *Amphoricarpos* je veoma kompleksna. Taksonomski status taksona, posebno unutar balkanskog kompleksa ovog roda je nejasno definisan i zahteva detaljnu reviziju.

Ciljevi ovog rada su:

- Morfološka (morfometrijska) analiza vegetativnih i reproduktivnih organa balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*;
- Anatomska analiza vegetativnih i reproduktivnih organa balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* i vrsta roda *Xeranthemum* iz Srbije;
- Molekularna analiza (plastidni i nuklearni genom) predstavnika *Xeranthemum* grupe;
- Utvrđivanje mikromorfoloških struktura i karaktera cipsela, cvetnog regiona i listova predstavnika *Xeranthemum* grupe;
- Fitohemija taksona *Xeranthemum* grupe (masne kiseline, alkani, laktonski i flavonoidni profili taksona);
- Rasprostranjenje, filogenija i centri diverziteta *Xeranthemum* grupe;
- Utvrđivanje sistematskog statusa *Xeranthemum* grupe;
- Utvrđivanje podudarnosti morfoloških, anatomske, fitohemijske i molekularne karaktera;
- Utvrđivanje taksonomskog statusa istraživanih taksona;
- Biološka aktivnost specijalizovanih metabolita odabranih taksona *Xeranthemum* grupe.

Ilustracija *Amphoricarpos autariatus* Blečić et Mayer: Habitus, Blečić i Mayer (1967). Die europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos* VISIANI. Phytion, 12, 150-158



### 3 MATERIJAL I METODE



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Biljni materijal

Biljni materijal sakupljen je sa prirodnih staništa u periodu od 2004. do 2018. godine (Tabela 2).

Vaučer uzorci analiziranih taksona deponovani su u Herbarijumu Instituta za botaniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (BEOU). Pored ovih uzoraka za istraživanje su korišćeni i primerci iz Herbarijuma Prirodnjačkog muzeja u Beogradu (BEO), Herbarijuma Botaničkog instituta u Barseloni (BC), Herbarijuma Zemaljskog muzeja u Sarajevu (SAR), Herbarijuma Departmana za biologiju i ekologiju PMF Novi Sad (BUNS), Herbarijuma Ivo Horvat (ZAHO) i Herbarijuma Botaničkog zavoda Prirodnoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (ZA) (Thiers 2019). U ovom istraživanju primenjivan je koncept četiri taksona roda *Amphoricarpos* na Balkanu (Bošnjak 1936; Blečić i Mayer 1967).



Tabela 2. Podaci analiziranih taksona *Xeranthemum* grupe

Takson	Država	Lokalitet	N	E	Vaučer brojevi	Morfo.	Mikromo.	Anatom.	Fitoh.	Molek.	Biol. akt.	
<i>Shangwua masarica</i>	Tadžikistan	Petra Pervogo	38°58'10''	70°39'53''	Pimenov 1222 et al. (MW)		+					
<i>Sh. denticulata</i>	Kina	Xizang, Nielamu	28°08'53''	85°58'55''	Liu 7150 (LZU)		+					
<i>Amphoricarpos excul</i>	Turska	Muğla	36°50'06''	29°24'46''	Susanna 2256 et al. (BC)		+					
<i>A. elegans</i>	Gruzija	Mt Migaria, Samegrelo	42°37'38.59''	42°39'13.48''	BEOU 17420		+		+	+	+	
<i>A. praedictus</i>	Turska	Antalya			15513					+		
<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>murbeckii</i>	Bosna i Hercegovina	Čvrsnica	43°40'31.80''	18°0'51.31''	BEOU 16913	+	+	+	+	+		
	Bosna i Hercegovina	Vlašić			ZA 2552	+						
	Bosna i Hercegovina	Čabulja			ZAHO	+						
	Bosna i Hercegovina				ZA	+						
	Bosna i Hercegovina	Rakitnica, Konjic			ZA	+						
	Bosna i Hercegovina				ZA	+						
	Bosna i Hercegovina	Čabulja, Šljem			ZAHO	+						
	Bosna i Hercegovina	Čvrsnica, Crepulja			ZAHO	+						
	Bosna i Hercegovina	Prenj, Porim			ZAHO	+						
	Bosna i Hercegovina	Prenj	43°33'0.9.8"	17°54'58.82"	BEOU 16948	+					+	
	<i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i>	Crna Gora	Đurđevića Tara	43°15'5.31''	19°4'16.57''	BEOU 16884	+		+			++
		Crna Gora	Dobrilovine			BEOU KEGB 998/96						+
Crna Gora		Lojanik (Boban)			BEOU 28538	+						
Crna Gora		Kanjon Drage	43°16'0.6.3"	19°07'00.0"	BEOU 16975	+					+	
Crna Gora		Kanjon Sušice			BEOU 818/94	+						
Crna Gora		Mratinje	43°16'47.8"	18°50'53.7"	BEOU 16958	+					+	
Crna Gora		Crvena greda	43°10'0.5.8"	19°03'48.1"	BEOU 1204/89						+	
Crna Gora	Maganik			VB31380 BEOU						+		





Tabela 2. Podaci analiziranih taksona *Xeranthemum* grupe (nastavak)

Takson	Država	Lokalitet	N	E	Vaučer brojevi	Morfo.	Mikromo.	Anatom.	Fitoh.	Molek.	Biol. akt.
<i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i>	Crna Gora	Plužine	43°16'47,8"	18°50'53,7"	BEOU 16958	+	+		+		+
	Crna Gora	Sinjajevina	42° 54'08.8"	19°23'19.80"	BEOU 16924	+				+	
	Bosna i Hercegovina	Kanjon Sutjeske			BEOU 28546	+				+	
<i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertisceus</i>	Crna Gora	Grebaja	42°30'35.61"	19°46'37.78"	BEOU 1930	+			+	+	+
	Crna Gora	Visitor	42°37'25.07"	19°53'4.58"	BEOU 16918	+	+	+		+	
	Crna Gora	Komovi	42°40'9.61"	19°39'28.37"	BEOU 16925	+				+	
	Crna Gora	Mali (Donji) Kotao	42°30'27,7"	19°46'50,8"	BEOU 16928	+				+	
	Crna Gora	Maja Karanfil			BEOU 16937	+					
	Crna Gora	Rugovska klisura			KEGB 2221/91	+					
	Crna Gora	Maja Karanfil (Krošnja)			BEOU 17683	+					
	Crna Gora	Visitor	42° 36'992"	19°53'012"	BEOU 17878	+					
	Srbija	Kanjon Mileševskog potoka			BEOU 5547	+					
	Srbija	Peć, Mileševac potok			ZA	+					
	Albanija	Buni Jezerces	42° 40'9.61"	19°39'28.37"	BEOU KEGB						+
<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i>	Crna Gora	Lovćen	42° 23'59.71"	18°50'15.71"	BEOU 16942	+					+
	Crna Gora	Štirovnik	42° 23'17.1"	18°48'12.4"	BEOU 21241	+					
	Crna Gora	Jezerki vrh	42° 23'57.8"	18°50'37.3"	BEOU 21064	+					
	Crna Gora	Orjen			BEO 25927	+					
	Crna Gora	Orjenske lokve	42°33'35.7"	18°33'05.2"	BEOU 16917	+	+	+	+	+	+
	Crna Gora	Golišavac			BEOU 17600	+					
	Crna Gora	Orjensko sedlo			BEOU 28556	+					
Hrvatska	Mali Kabl.			ZAHO	+						
<i>Chardinia orientalis</i>	Iran		34°43'02"	46°53'35"	Susanna 1715 et al. (BC)		+				
<i>Xeranthemum inapertum</i>	Španija		41°23'02"	3°8'11"	Garcia-Jacas & Susanna 2797 (BC)		+				



Tabela 2. Podaci analiziranih taksona *Xeranthemum* grupe (nastavak)

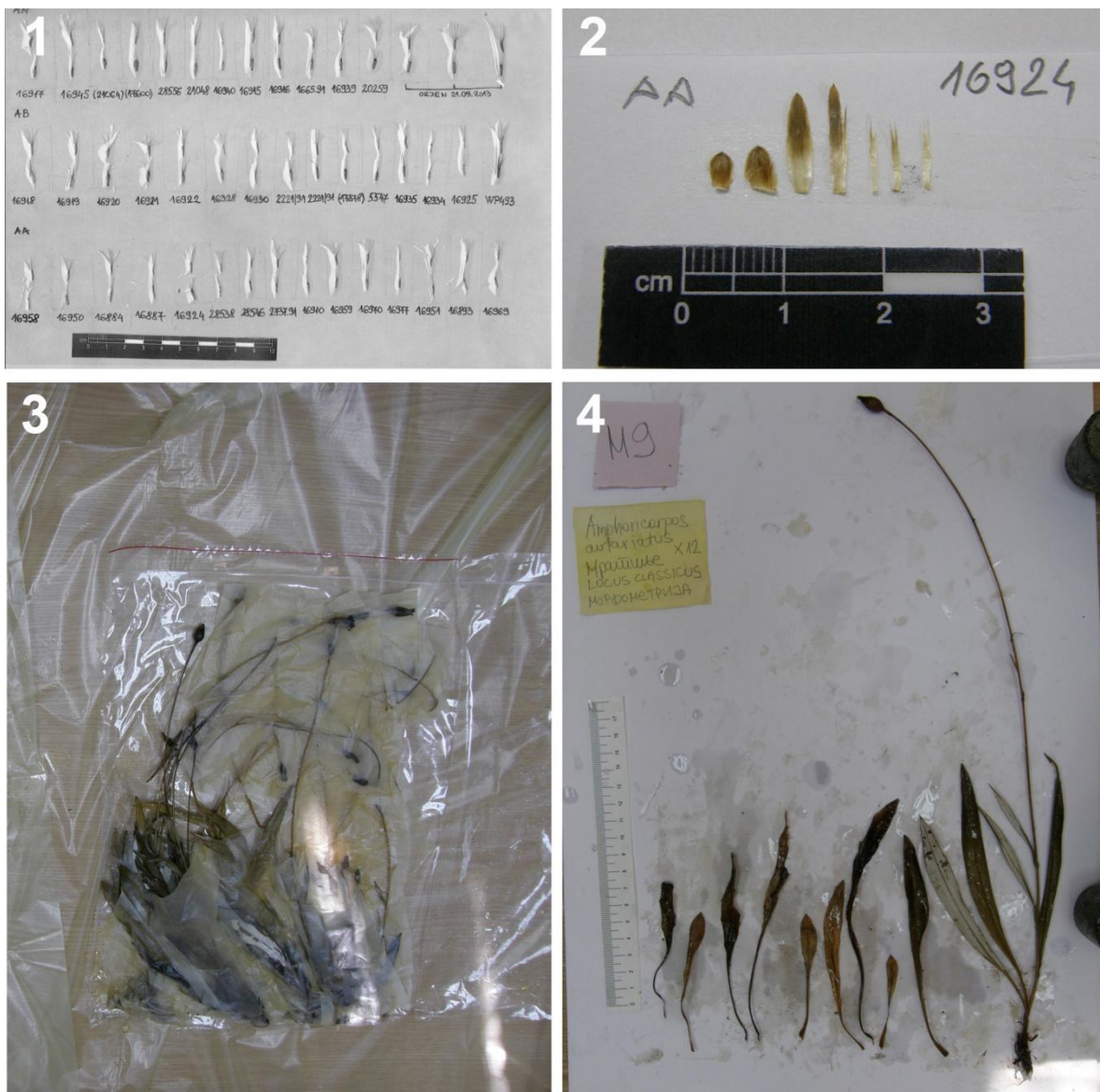
Takson	Država	Lokalitet	N	E	Vaučer brojevi	Morfo.	Mikromo.	Anatom.	Fitoh.	Molek.	Biol. akt.
<i>X. annuum</i>	Srbija	Đerdap	44°39'28.1"	22°32'26.8"	BEOU 17280		+	+			
<i>X. cylindraceum</i>	Srbija	Đerdap	44°36'44.6"	22°30'29.9"	BEOU 17281		+	+	+		
<i>Siebera pungens</i>	Turska		37°03'	37°21'	Susanna 2316 et al (BC)		+				

+ označava koje su analize urađene za koje taksone.



### 3.2. Morfološke metode

Za morfometrijsku analizu uzorkovani su balkanski taksoni roda *Amphoricarpos*. Analizirano je ukupno 98 jedinki (prikupljenih na terenu i iz herbarijuma). Na terenu je uzorkovano od 10 do 20 individua po populaciji. Biljni materijal je fiksiran na terenu i čuvan u rastvoru 50% alkohol : glicerol (1 : 1) do pravljenja preparata u taksonomskoj laboratoriji Katedre za morfologiju i sistematiku biljaka. Svaka jedinka koja je analizirana je fotografisana sa lenjirom i rednim brojem. Stabljika i svi listovi rozete su ispravljani, presovani, a zatim fotografisani. Iz glavice su serijski izvučene involukralne brakteje i palje i napravljeni su preparati, koji su zatim fotografisani sa lenjirom (Slika 9). Merenja su vršena pomoću programa Digimizer, Image Analysis softver (MedCalc Software, Belgium).



Slika 9. Materijal pripremljen za morfometrijsku analizu. 1 Cipsele. 2 Involukralne brakteje. 3 Biljni materijal u rastvoru 50% alkohol : glicerol (1 : 1). 4 Jedinka sa listovima i cvasti.



### 3.2.1. Analize morfoloških karaktera

Analizirano je 28 karaktera, uključujući kvantitativne (20) i kvalitativne (8) karaktere. Morfološki karakteri obuhvaćeni analizom prikazani su u Tabeli 3. Karakteri koji su analizirani u saglasnosti su sa ranije korišćenim karakterima za razlikovanje taksona unutar roda *Amphoricarpos* pronađenim u literaturi. Karakteri listova se odnose na merenje svih listova, posebno na stabljici, posebno u rozeti, a za analizu je upoređivana srednja vrednost. Isti princip je važio i za karaktere involukralnih brakteja. Za merenje karaktera involukruma uzeta je po jedna brakteja iz niza, počev od najdonjeg spoljašnjeg (prvog) listića (ukupno 7 morfološki različitih listića) (Slika 9 - 2). U analizu su uzeti samo karakteri obodne cipsele jer je pregledom literature ustanovljeno da oni imaju taksonomski značaj. Kvalitativnim karakterima je dodeljivana numerička oznaka, nakon čega su pretvoreni u srednje vrednosti kako bi bili uporedivi.



Tabela 3. Analizirani morfološki karakteri i oznake

Naziv karaktera	Oznaka
Visina stabljike	S_H
Pokrivenost stabljike trihomama	S_Ha
Broj listića na stabljici	SL_no
Dužina listića stabljike	SL_L
Broj grana stabljike	SC_br_no
Oblik lista rozete	RL_S
Dužina lista rozete	RL_L
Širina lista rozete	RL_W
Broj listova u rozeti	RL_no
Pokrivenost lica lista rozete trihomama	RL_Ha_ad
Pokrivenost naličja lista rozete trihomama	RL_Ha_ab
Dužina cvasti (glavice)	C_H
Širina cvasti (glavice)	C_W
Broj glavica na jedinki	C_no
Dužina prvog listića involukruma	I_H_1
Dužina listića involukruma	I_H
Širina listića involukruma	I_W
Oblik listića involukruma	I_S
Površina listića involukruma	I_Ar
Položaj šiljka srednjeg (2.) listića involukruma	I_Ap
Dužina obodne cipsele	AC_H
Širina obodne cipsele	AC_W
Oblik obodne cipsele	AC_S
Dužina ušastih nastavaka obodne cipsele	AC_Ap
Dlakavost obodne cipsele	AC_Ha
Širina okriljenog dela obodne cipsele	AC_Ma
Broj čekinja papusa	AC_Pa
Dužina čekinja papusa	AC_Pa_H



### 3.2.2. Statistička obrada morfometrijskih podataka

Za sve analizirane morfološke karaktere urađena je deskriptivna statistika. Izračunati su minimum, maksimum, srednja vrednost, standardna devijacija i koeficijent korelacije. Na osnovu toga urađena je analiza varijabilnosti morfoloških karaktera i poređenje između taksona, a rezultati su prikazani u tabelama i grafički u obliku box plotova.

Koeficijent varijacije (CV%) korišćen je kako bi se opisala varijabilnost morfoloških karaktera. Nisko varijabilni karakteri imali su  $CV\% < 10$ , umereno varijabilni  $CV\% > 10$  i  $CV\% < 30$ , visoko varijabilni  $CV\% > 30$ , a jako visoko varijabilni  $CV\% > 50$ .

Za CDA (kanonijska diskriminantna analiza - Canonical Discriminant Analysis - CDA) analizu su izabrani određeni karakteri vegetativnih i reproduktivnih struktura. Na osnovu tog seta karaktera su urađene sve CDA analize. CDA ispituje strukturu razlika između grupa (grupa populacija, populacija ili taksona), koje su prethodno definisane, odnosno testira hipotezu o morfološkoj diferencijaciji definisanih grupa. Ovom analizom se dobijaju i informacije koji karakteri su najbolji za razlikovanje definisanih grupa. Takođe se dobija niz Fischer-ovih linearnih diskriminantnih funkcija. Kanonijskom diskriminantnom analizom se smanjuje dimenzionalnost multivarijantnih podataka tako da se veliki broj ulaznih promenljivih svodi na manji skup novih složenih dimenzija (kanoničkih funkcija) uz minimalan gubitak informacija. Cilj ove analize je da se odredi doprinos svakog karaktera sveukupnoj morfološkoj diskriminaciji i da se odredi set karaktera koji najbolje diskriminiše morfološke klasterne.

CDA je urađena za karaktere koji su izabrani na osnovu više kriterijuma: a) PCA značajni karakteri (PCA skorovi veći od 0.7) i b) lična zapažanja. Spearman - ovim testom su izračunati koeficijenti korelacije između parova svih karaktera. U slučajevima kad je apsolutna vrednost koeficijenta korelacije između dva karaktera bila veća od 0.9 samo jedan od ta dva karaktera je izabran za dalju analizu.

Klusterska analiza (eng. Cluster analysis). Kanonijskom diskriminantnom analizom su izračunate i Mahalanobisove distance na osnovu kojih je urađena klusterska analiza. Pri klusterskoj analizi se ne zna pripadnost objekata klasterima, niti konačan broj klastera.



Klasterska analiza vrši grupisanje objekata npr. taksona, grupa populacija ili populacija u klastera prema njihovim sličnostima odnosno razlikama. Kao metod klasterovanja korišćen je UPGMA (eng. "Unweighted pair - group average") metod, koji definiše distance između dva klastera kao prosek udaljenosti između svih parova posmatranih objekata. Svi grafici sa predstavljenim rezultatima CDA analize su praćeni i odgovarajućim klasifikacionim stablima (dendrogramima), koji predstavljaju grafički prikaz rezultata klusterske analize.





### 3.3. Mikromorfološke metode

Biljni materijal (zreli listovi, delovi stabljika, involukralne brakteje, cvetni regioni i cipsele) sakupljen je na prirodnim staništima. U mikromorfološku analizu uključeni su predstavnici svih rodova *Xeranthemum* grupe, takođe, bilo je uključeno i više taksona iz odgovarajućih rodova (Tabela 2).

Suvi uzorci pričvršćeni su na specijalne metalne valjčiće, a zatim su napareni sa 30 nm debelim slojem zlata u BAL - TEC, SCD 005 SPUTTER COATER vakuum uparivaču. Tako pripremljeni uzorci analizirani su na skenirajućem elektronskom mikroskopu (JEOL JSM-6460LV)

Morfologija trihoma je urađena prema Wurdack (1986), opis papusa prema Small (1919), a insercija cipsele prema Häffner (2000).

#### 3.3.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija sa energetske-disperzivnim spektrometrijom - SEM-EDS

Morfološke karakteristike (involukralnih brakteja i listića krunice), kao i morfologija i hemijski sastav precipitiranih mineralnih faza dobijeni su analizom na skenirajućim elektronskim mikroskopom tipa JEOL JSM6610LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) koji je povezan sa energetske-disperzivnim spektrometrom XMax (Oxford Instruments) u uslovima visokog vakuuma, pri naponskim ubrzanjem zraka od 20 kV.

Predhodno na vazduhu osušeni uzorci su zalepljeni na aluminijumski nosač pomoću dvostruko-lepljive ugljenične trake, a zatim radi neophodne provodnosti prekriveni slojem zlata na neparivaču tipa BALTEC-SCD-005 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Za dobijanje sadržaja elemenata (hemijski sastav precipitiranih mineralnih faza) korišćeni su unutrašnji standardi. Granica detekcije za većinu elemenata bila je 0.1 tež.%. Kako su uzorci nepolirani i s obzirom da se ovom metodom ne može determinisati sadržaj prvih pet elemenata periodnog sistema hemijske analize precipitiranih mineralnih vrsta mogu se smatrati kvalitativnim. Kako bi se opisao trodimenzionalni model kristala korišćena je metoda Millerovih indeksa (Miller 1839).



### 3.3.2. Rendgenska difraktometrija praha - XRPD

Precipitirane mineralne faze na involukralnim braktejama vrste *X. cylindraceum* analizirane su metodom rendgenske difrakcije praha pomoću Rigaku SmartLab difraktometra. Uzorci su analizirani korišćenjem  $\text{CuK}\alpha$  rendgenskog zračenja u opsegu od  $5^\circ$  do  $50^\circ 2\theta$ , sa korakom od  $0.01^\circ 2\theta$  i vremenskim zadržavanjem od  $1^\circ/\text{min}$ . Prisustvo faza u uzorcima determinisano je korišćenjem PDF - 2 baze podataka Internacionalnog Centra za difrakcione podatke (International Centre for Diffraction Data - ICDD).

### 3.3.3. Mikro - Ramanska spektroskopija

Mikro - ramanski spektri precipitiranih mineralnih faza na involukralnim braktejama vrste *X. cylindraceum* dobijeni su pomoću DXR Ramanskog mikroskopa (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Korišćeno je diodno lasersko pobuđivačko zračenje talasne dužine 532 nm i snage na površini uzorka od 10 mW. Prikupljanje raspršene svetlosti izvršeno je pomoću Olympusovog mikroskopa sa korigovanom konfokalnom optikom (apertura - 50  $\mu\text{m}$ , standardna radna udaljenost objektiva  $5\times$ , rešetka od 1.800 linija/mm i rezolucija od  $2\text{ cm}^{-1}$ ). Prečnik laserske tačke na uzorku je bio 1  $\mu\text{m}$ . Za prikupljanje spektara i manipulaciju korišćen je Thermo Scientific OMNIC softver.



### 3.4. Anatomske metode

Biljni materijal, koren, stablo, drška cvasti, list i cvast dve vrsta roda *Xeranthemum* iz Srbije, kao i adventivni koren, rizom, drška cvasti, list i cvast balkanskih taksona roda *Amphoricarpus*, od po pet jedinki po taksonu, je sakupljen na prirodnim staništima tokom perioda cvetanja (više manje u istoj ontogenetskoj fazi) i čuvan u fiksativu, 50% EtOH ili u FAA (EtOH (95%) : glacijalna sirćetna kiselina : formalin (37% formaldehid) : dejonizovana H<sub>2</sub>O = 50 : 5 : 10 : 35).).

Pripremljeni su privremeni i trajni preparati zrelih korenova, adventivnih korenova, rizoma, stabljika, listova, drški cvasti i cvasti biljaka. Delovi biljaka su sečeni sveži ili su bili podvrgnuti pripremi za standardnu parafinsku proceduru (Ruzin 1999). Ručno rađeni poprečni preseći svežeg biljnog materijala urađeni su pomoću oštrog žileta. Neki privremeni preparati (stabljika i list) su obojeni toluidinskim plavim (0.05% v/v, vodeni) (O'Brien i sar. 1964), floroglucinol - HCl (Phloroglucinol-HCl) reagensom za detektovanje lignina (lignifikovanih ćelijskih zidova) (Jensen 1962) ili sa Lugolovim rastvorom za vizuelizaciju skroba (Johansen 1940). Pored toga, delovi listova nekih taksona su "prosvetljeni" držanjem u smeši glacijalne sirćetne kiseline i 30% vodonik peroksida (1: 1 v/v) na 60° C (1 – 5 dana). Epidermalni otisci listova su napravljeni pomoću transparentnog laka i transparentne lepljive trake. Za pripremu poprečnih i uzdužnih preseka (debljine 8 – 10 μm) srednjih delova biljnih organa upotrebljena je standardna parafinska metoda. Preseći su dvojno obojeni u safraninu O (1%, v/v 50% EtOH) i alcian blu (1% v/v, vodeni), a zatim su postavljeni na predmetne pločice pomoću Kanada balzam. Trajni preseći čuvaju se na Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka, Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta. Posmatranja i merenja su izvršena na svetlosnom mikroskopu Leica DM2000 sa digitalnom kamerom Leica DFC320 i pomoću računara sa softverom za snimanje i merenje Leica IM 1000.

Sva merenja su predstavljena kao srednje vrednosti ± standardna devijacija. Statistička analiza je urađena pomoću Microsoft Excel softvera.



### 3.5. Fitohemijske metode

Biljni materijal [(100 mg cipsela za analizu masnih kiselina (balkanski taksoni roda *Amphoricarpos* i *X. cylindraceum*), 0.50 g listova za analizu fenolnih jedinjenja (balkanski taksoni roda *Amphoricarpos*) i 1.00 g listova za analizu seskviterpenskih laktona (*A. elegans*)] sakupljen je na prirodnim staništima (Tabela 2). Zrele cipsele su sakupljene u papirne kesice. Listovi su sakupljeni u zip kesice u kojima je bio silika gel sa indikatorom vlage.

#### 3.5.1. Masne kiseline iz cipsela

##### 3.5.1.1. Ekstrakcija ulja

Samlevenim zrelim cipselama (100 mg) dodato je po 2 mL *n*-heksana i uzorci (9) su stavljeni u vorteks 10 min. Nakon toga, uzorci su centrifugirani na 9.500 rpm, 5 min, 25°C. Supernatant je filtriran, a dobijeno ulje je koncentrovano pod konstantnim protokom azota.

##### 3.5.1.2. Transesterifikacija ulja

Transesterifikacija ulja je izvršena dodavanjem 250 mL KOH u metanolu (0.5 M). Uzorci su stavljeni u vorteks tokom 2 min, a zatim im je dodat 1 mL *n*-heksana i uzorci su stavljeni u šejker 2 min. Na kraju, uzorci su centrifugirani (4500 rpm, 6 min, 25°C). Supernatant je filtriran (MS<sup>®</sup> PTFE Syringe Filter, veličina pora 0.45 μm, dijametar 13 mm) u tamne vijale i sačuvan za kasniju analizu.

##### 3.5.1.3. GC-FID analiza masnih kiselina

Estri masnih kiselina (FAMES) su analizirani na gasnom hromatogramu sa plameno jonizujućim detektorom (GC-FID) (Agilent Technology 7890A). Injektovan je 1 μL uzorka u injektor. Korišćena je DB-5ms kapilarna kolona (30 m x 250 μm x 0.25 μm) pod



sledećim uslovima: inicijalna temperatura pećnice, 150 °C (4 min); gradijent temperature 4 °C/min do 280 °C; vreme zadržavanja na 280 °C, 5 min; temperatura injektora i detektora, 300 °C. Split odnos je bio 1:50. Helijum je korišćen kao noseći gas (protok 1 mL/min). Vodoniak (30 mL/min) i sintetički vazduh (400 mL/min) su korišćeni za plamenu jonizaciju. Kao make-up gas korišćen je azot (25 mL/min). Identifikacija metil estara masnih kiselina je urađena poređenjem sa retencionim vremenima standarda FAME MIX (C4-24 Supelco). Relativna količina metil estara masnih kiselina izračunata je integraljenjem površine svakog pika i izražena je u procentima. Sve analize su urađene u triplikatu.

### **3.5.2. Ekstrakcija i izolacija seskviterpenskih laktona za HPLC i NMR analizu**

#### **3.5.2.1. Ekstrakcija i izolacija seskviterpenskih laktona (SLs)**

Intaktnim suvim listovima (1.00 g) dodat je CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i zatim su listovi stavljeni 10 min u ultrazvučno kupatilo na sobnoj temperaturi. Nakon filtriranja i uparavanja do suva, ekstraktu je dodata smeša MeOH : heksan (1 : 1). Donja faza (MeOH frakcija) izdvojena u levku za odvajanje je odvojena, a heksanska frakcija je ekstrahovana više puta sa metanolom i MeOH ekstrakti su zatim spojeni. Ukupni MeOH ekstrakt je uparen do suva u rotacionom vakuum uparivaču i korišćen za HPLC i NMR analizu.

#### **3.5.2.2. HPLC i NMR analiza**

NMR spektri snimani su u CDCl<sub>3</sub>, na aparatu Bruker AVANCE III, 500 MHz. Hromatografska analiza ukupnog MeOH ekstrakta je urađena na aparatu 1100 Series liquid chromatograph Agilent Technologies sa diode array detektorom (DAD; λ=210 nm) i autosemplerom. Kolona za razdvajanje je bila Zorbax Eclipse XDB C18 (250 m x 9.4 mm; 5 μm). Temperatura kolone bila je 20 °C, gradijent protoka mobilne faze 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Gradijent smeše rastavrača (rastvarač A voda, rastvarač B 100 % acetonitril) bio je: 0 – 5 min, 10% B; 5 – 20 min, 10 – 35% B; 20 – 30 min, 35% B, 30 – 40 min, 35- 50% B; 40 – 60 min, 50% B; 60 – 61 min, 50 – 10% B; 61 – 66 min, 10% B. Injektovan je 1 μL uzorka.



### 3.5.3. UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS analiza

#### 3.5.3.1. Ekstrakcija

Biljni materijal za ekstrakciju pripremljen je tako što je 0.5 g intaktnih listova, kao i 0.5 g samlevenih listova u laboratorijskom mlinu i usitnjenih u avanu pomoću tečnog azota, balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* (*Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *murbeckii*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*) podvrgnuto ekstrakciji pomoću 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> tokom 10 min na sobnoj temperaturi. Ovako dobijenih osam ekstrakata (četiri od intaktnih listova i četiri od samlevenih listova) profiltrirano je kroz Whatman No. 1 filter papir i upareno do suva pomoću rotacionog vakuum uparivača. Svakom uzorku dodato je 10 ml smeše MeOH : *n*-heksan (1:1). Uzorci su zatim centrifugirani (3000 rpm, 1 min, 25 °C). Nakon toga, uzeta je donja faza (MeOH frakcija) i uparena do suva pomoću rotacionog vakuum uparivača. Svakom uzorku dodat je po 1 mL MeOH i uzorci su profiltrirani kroz teflonske filtere (MS<sup>®</sup> PTFE Syringe Filter, veličina pora 0.45 μm, dijametar 13 mm) u tamne vijale i čuvani u frižideru na temperaturi 4 °C do dalje upotrebe.

#### 3.5.3.2. Analiza fenolnih jedinjenja

Za analizu je napravljen polazni rastvor smeše flavonoida (naringenin, apigenin, hrizoeriol i acacetin) i fenolnih kiselina (hlorogenska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva, kofeinska kiselina i *p*-kumarinska kiselina) koncentracije 1000 mg/L, rastvaranjem standardnih jedinjenja u metanolu. Razblaživanjem polaznog rastvora mobilnom fazom pripremljena je serija radnih rastvora koncentracija: 0.025; 0.050; 0.100; 0.250; 0.500; 0.750 i 1.000 mg/l. Polazni i radni rastvori su čuvani u mraku na 4 °C. Kalibracione krive su dobijene korelisanjem površina pikova sa koncentracijom standardnih rastvora.

Za analizu je korišćen sistem za ultraefikasnu tečnu hromatografiju (UHPLC): Accela 600 pumpa i Accela autosempler (Thermo Fisher Scientific). Za analitičko razdvajanje korišćena je Synchronis C18 kolona (50 × 2.1 mm, 1.7 μm veličina čestica)



(Thermo Fisher Scientific). Mobilna faza je bila: (A) voda sa 0.1 % mravlje kiseline i (B) acetonitril sa 0.1 % mravlje kiseline. Gradijentni program bio je sledeći: 0.0 – 1.0 min, 5 % B; 1.0 – 14.0 min, 5 – 95 % B; 14.0– 14.1 min, 95 – 5 % B; narednih 6 min, 5 % B. Injekciona zapremina za sve uzorke iznosila je 5 $\mu$ L, a brzina protoka je bila 275  $\mu$ L/min.

Sistem za tečnu hromatografiju bio je povezan sa linearnim jon trap-Orbitrap hibridnim masenim analizatorom (LTQ OrbiTrap XL). Jonizacija je izvedena u negativnom modu pomoću elektron- sprej interfejsa (HESI-II, Thermo Fisher Scientific). Vrednosti parametara jonskog izvora su iznosili: napon jonskog izvora 5 kV, napon kapilara - 40 V, napon cevi - 80 V, temperatura kapilare 275 °C, glavni i pomoćni protok gasa (N<sub>2</sub>) 42 i 11 proizvodnih jedinica. Maseni spektri su snimani u opsegu odnosa *m/z* 100- 1000. Za proučavanje fragmentacije ispitivanih jedinjenja korišćena je koliziono indukovana disocijacija (CID). Normalizovana koliziona energija indukovane disocijacije bila je konstantna i iznosila je 35 eV.

Fenolna jedinjenja su kvantifikovana poredjenjem sa retencionim vremenima, tačnim masama i masenim spektrima standardnih jedinjenja. Masa identifikovanih jedinjenja dobijena na osnovu masene spektrometrije visoke rezolucije je poređena sa tačnom masom izračunatom primenom ChemDraw softvera. Na taj način dobijene su molekulske formule nepoznatih jedinjenja, dok je njihova identifikacija predložena na osnovu specifične *MS<sup>n</sup>* fragmentacije.

### 3.6. Molekularne metode

#### 3.6.1. Biljni materijal

Biljni materijal (mladi listovi iz 18 balkanskih populacija roda *Amphoricarpos*) sakupljen na prirodnim staništima (Tabela 2) stavljen je u plastične zip kesice sa silika gelom sa indikatorom vlage. U analizu su bili uključeni, pored ova taksona iz roda *Amphoricarpos* još i *A. exsul* i *A. praedictus*, i *A. elegans*; *X. annumm*, *X. cylindraceum*, *X. inapertum* i *X. longepapposum*; *Chardinia orientalis* i *Siebera pungens*; i dve vrste roda *Shangwua* (*Sh. denticulata* i *Sh. jacea*). Outgrupa su bili odabrani taksoni iz podtribusa Carlininae (*Carlina vulgaris*), Cardopatiinae (*Cardopatum corymbosum*) i Echinopsinae



(*Echinops emiliae*) prateći filogeniju Herrando-Moraira i sar. (2019). ITS sekvence *Chardinia orientalis* (S1715), *Shangwua denticulata*, *Siebera pungens*, *Xeranthemum annuum* (S2362), *X. cylindraceum*, *X. inapertum* (S1456) i *X. longepapposum*, i autgrupe su preuzeti od GenBank-e. Vaučer uzorci, izvor materijala i GenBank vaučer brojevi su dati u radu Herrando- Moraira i sar. (2019).

### 3.6.2. Ekstrakcija, amplifikacija i sekvenciranje DNK

Ukupna DNK je ekstrahovana primenom CTAB protokola (Doyle and Doyle, 1987), modifikovanog prema Culling (1992) i Tel-Zur i sar. (1999) od svežih listova sakupljenih na terenu kao i iz herbarizovanog materijala.

Prvi skrining je urađen na 8 individua iz reprezentativnih balkanskih populacija upotrebom 12 plastidnih markera: *ndh-rpl32*, *rpl32-trnL<sup>(UAG)</sup>*, *rpl16* intron, *ndhA* intron, *trnG* intron, *trnT<sup>(UGU)</sup>-trnL<sup>(UAA)</sup>*, *5'trnK<sup>(UUU)</sup>-3'rps16*, *ndhC-trnV<sup>(UAC)</sup>* (Shaw i sar. 2005, 2007, 2014), *ycf3-trnS* (Hershkovitz 2006), *trnH-psbA*, (Hamilton, 1999), and *trnS<sup>(GCU)</sup>-trnC<sup>(GCA)</sup>* and *trnG<sup>(UCC)</sup>-trnT<sup>(GGU)</sup>* (Kim i sar. 2005); pet plastidnih mikrosatelita (*ccmp1*, *ccmp2*, *ccmp3*, *ccmp5* i *ccmp7*, cf. Weising i Gardner 1999) i dva jedarna ribozomalna markera (ITS i ETS, cf. White i sar. 1990; Baldwin i Markos, 1998; Linder i sar. 2000). Samo plastidni intergenski spejser *ycf3-trnS* i jedarni ribozomalni ITS su pokazali filogenetski signal. Sve populacije su amplifikovane za ova dva regiona.

Intergenski spejser *ycf3-trnS* region: tri individue po populaciji su uzorkovane od balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*, i po jedna individua iz ostalih populacija, ukupno 60 individua. Plastidni intergenski spejser *ycf3-trnS* je amplifikovan sa prajmerima SP43122F kao forward ("napred") prajmerom i SP44097R kao reverse ("nazad") prajmerom (Hershkovitz 2006). PCR amplifikacija je uključila korak inicijalizacije (95 °C 1 min 35 s), zatim pratećih trideset pet ciklusa amplifikacije pod sledećim uslovima: 95 °C 1 min 30 s, 52 °C 1 min 30 s, i 72 °C 2 min, sa dodatnim korakom ekstenzije od 10 min na 72°C.





Interni transkribujući spejser ITS: za analizu ITS regiona, uzorkovana je jedna individua po populaciji (ukupno 26 individua). ITS je amplifikovan pomoću ITS1 kao forward (“napred”) prajmerom i ITS4 kao reverse (“nazad”) prajmerom (White i sar. 1990). PCR amplifikacija je uključila korak inicijalizacije na 95 °C 2 min, i zatim pratećih trideset ciklusa amplifikacije pod sledećim uslovima: 94 °C 1 min 30 s, 55 °C 2 min, i 72 °C 3 min, sa dodatnim korakom ekstenzije od 15 min na 72 °C.

Za plastidne i jedarne regione reakcije su urađene na zapreminu od 25 µL sa 10% 10mM 10×AmpliTaq puferom, 10% 25 mM MgCl<sub>2</sub> rastvorom, 10% 2mM od svakog dNTP, 4% svakog prajmera od 5µM, jedna jedinica AmpliTaq® polimeraze (Applied Biosystems Foster City, CA, USA), 1 µL od BSA (bovine serum albumin, New England Biolabs, NE, USA) na 0.4 mg/ml za cpDNA ili 0.5 µL DMSO (dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) za jedarni region i 2 µL template DNK nepoznate koncentracije. Ovo je urađeno do 25 µL koristeći sterilnu destilovanu vodu.

Oba regiona su sekvencionisara sa istim prajmerima korišćenim za amplifikaciju. Sekvenciranje nukleotida je urađeno na ABI 3730XL Analyser (Applied Biosystems) prateći protokol prema Macrogen Inc., Koreja.

### 3.6.3. Filogenetske analize

Sekvence su vizuelno poravnate pomoću softver BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999). Kako bi se ispitali odnosi između rodova *Xeranthemum* grupe kao i korelacija DNK sekvenci sa taksonomijom, urađene su Bajesove analize na tri skupa podataka. Skup podataka 1 je uključivao ITS sekvence, skup podataka 2 trnS i skup podataka 3 kombinovane ITS + trnS sekvence (rezultati oba skupa podataka 1 i 2 nisu otkrili nikakve jake nepodudarnosti). Bajesove analize su urađene pomoću evolutivnog modela utvršenog pomoću jModeltest v.2.1.10 (Darriba i sar. 2012). Model GTR + G je izabran kao model koji najbolje odgovara nukleotidnoj supstituciji upotrebom Akaike Information Criteria (AIC) u svim skupovima podataka. Analize su urađene pomoću Mr. Bayes v. 3.2 (Ronquist i sar. 2012). Analize su inicirane slučajnim početnim stablima, a četiri Markovljeva lanca su se izvodila istovremeno za  $20 \times 10^6$  generacija. Sačuvana je jedna na svakih 1000 generacija, a prvih



5.000 generacija odbačene su kao “burn-in” period nakon potvrđivanja da su se vrednosti log-verovatnoće stabilizirale pre korišćenja Tracer 1.7.1 (Rambaut i sar., 2018) proveravajući da je vrednost Efektivne veličine uzorka (EES) bila veća od 200 nakon odbacivanja 25% stabala kao “burn-in”. Internodije sa posteriornim verovatnoćama  $\geq 0.095$  su smatrane statistički značajnim.

### 3.7. Utvrđivanje biološke aktivnosti ekstrakata

Biljni materijal (listovi) taksona roda *Amphoricarpos* sakupljen je na prirodnim staništima tokom 2010. i 2011. godine (Tabela 2). Listovi su sakupljeni u papirne kesice i osušeni na tamnom i suvom mestu.

#### 3.7.1. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti

##### 3.7.1.1. Ekstrakcija

Sva tri uzorka, *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (4.00 g suvih intaktnih listova) su ekstrahovana dietil etrom tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Ekstrakti su filtrirani i upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču i dobijeno je 30.76 mg (*Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*), 25.53 mg (*A. autariatus* subsp. *autariatus*) i 30.40 mg (*A. autariatus* subsp. *bertisceus*) sirovih suvih ekstrakata. Već korišćeni listovi za ekstrakciju sa dietil etrom (tri uzorka) su samleveni i svaki uzorak je ponovo ekstrahovan sa 80% MeOH tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Svaki ekstrakt je filtriran i upareni do suva pomoću rotacionog vakuum uparivača i dobijeno je 30.15 mg (*A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*), 38.00 mg (*A. autariatus* subsp. *autariatus*) i 18.60 mg (*A. autariatus* subsp. *bertisceus*) sirovih suvih ekstrakata. Nova tri uzorka istih taksona (4.00 g suvih listova) su samlevena i svaki je ekstrahovan sa 50% acetona tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Svaki ekstrakt je filtriran i filtrati su upareni do do suva pomoću rotacionog vakuum uparivača i dobijeno je 15.60 mg (*A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*), 12.13



mg (*A. autariatus* subsp. *autariatus*) i 11.64 mg (*A. autariatus* subsp. *bertisceus*) sirovih suvih ekstrakata.

### 3.7.1.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti

Antibakterijska aktivnost testirana je na gram negativnim (*Enterobacter cloacae* humani izolat, *Escherichia coli* ATCC 35210, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) i gram pozitivnim bakterijama (*Bacillus cereus* klinički izolat, *Listeria monocytogenes* NCTC 7973, *Micrococcus flavus* ATCC 10240 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538). Organizmi su dobijeni iz Mikološke laboratorije, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerziteta u Beogradu, Srbija. Antibakterijski test je sproveden mikrodilucionom metodom (Hanel i Raether, 1988; Espinel-Ingroff 2001). Bakterijske suspenzije su podešene sterilnim fiziološkim rastvorom do koncentracije od  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL. Inokulum je pripreman svakodnevno i čuvan na 4 °C do upotrebe. Razblaženja inokuluma su kultivisana na čvrstom medijumu kako bi se potvrdilo odsustvo kontaminacije i proverila validnost inokuluma. Svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu i ponovljeni tri puta.

Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije (MIC i MBC) su određene upotrebom mikrotitracionih ploča sa 96 bunarčića. Bakterijska suspenzija je podešena sa sterilnim fiziološkim rastvorom do koncentracije od  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL. Svaki ekstrakt (dietil etar, 80% MeOH i 50% aceton) je rastvoren u 5% DMSO i dodat (10 mg/mL) u Tryptic Soy Broth (TSB) hranljivu podlogu (TSB) (100 mL) sa bakterijskim inokulumom ( $1.0 \times 10^4$  CFU po bunarčiću) da bi se postigla željena koncentracija. Mikroploče su inkubirane na rotacionom šejkeru (160 rpm) tokom 24 h na temperaturi od 37 °C. Najniže koncentracije bez vidljivog rasta (na binokularnom mikroskopu) su definisane kao koncentracije koje potpuno inhibiraju rast bakterija (MIC). Minimalne baktericidne koncentracije (MBC) su određene serijskom sub-kultivacijom 2 µL u mikrotitracione ploče koje sadrže 100 µL podloge po bunarčiću i daljom inkubacijom tokom 24 h. Najniža koncentracija bez vidljivog rasta je definisana kao MBC, što ukazuje na 99.5% ubijanja



originalnog inokuluma. Optička gustina svakog bunarića je merena na talasnoj dužini od 655 nm pomoću microplate manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories) i upoređena sa slepom i pozitivnom kontrolom. Kao pozitivne kontrole korišćeni su antibiotici streptomycin i ampicilin (1 mg/mL u sterilnom fiziološkom rastvoru). Svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu i ponovljeni tri puta.

### 3.7.1.3. Određivanje antifungalne aktivnosti

Antifungalna aktivnost testirana je na mikromicete *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *A. versicolor* (ATCC 11730), *A. ochraceus* (ATCC 12066), *A. niger* (ATCC 6275), *Trichoderma viride* (IAM 5061), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *P. ochrochloron* (ATCC 9112) i *Candida albicans* (ATCC 10231) koje su dobijene iz Mikološke laboratorije, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerziteta u Beogradu, Srbija. Mikromicete su održavane na malt agaru a kulture su čuvane na 4 °C i subkultivisane jednom mesečno (Booth 1971). Antifungalni test je sproveden modifikovanom mikrodilucionom metodom (Hanel i Raether, 1988; Espinel-Ingroff 2001). Spore mikromiceta su sprane sa površine agar ploča sa sterilnim 0.85% slanim rastvorom koji sadrži 0.1% Tween 80 (v/v). Suspenzija spora je podešena sa sterilnim fiziološkim rastvorom do koncentracije od približno  $1.0 \times 10^5$  u konačnoj zapremini od 100  $\mu$ L po bunariću. Inokulumi su čuvani na 4 °C za dalju upotrebu. Razblaženja inokuluma su kultivisana na čvrstom malt agaru kako bi se potvrdilo odsustvo kontaminacije i da bi se proverila validnost inokuluma. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) vršeno je tehnikom serijskog razblaživanja pomoću mikrotitracione ploče sa 96 bunarčića. Ispitivani ekstrakti (dietil etar, 80% MeOH i 50% aceton) su dodavani u koncentraciji od 10 mg/mL u Malt hranljivu podlogu (MA) sa inokulumom. Mikroploče su inkubirane na rotacionom šejkeru (160 rpm) tokom 72 h na temperaturi od 28 °C. Najniže koncentracije bez vidljivog rasta (na binokularnom mikroskopu) definisane su kao MIC. Fungicidne koncentracije (MFC) su utvrđene serijskom subkultivacijom 2  $\mu$ L testiranih ekstrakata rastvorenih u medijumu i inokulisanih tokom 72 h, u mikrotitracione ploče koje sadrže 100  $\mu$ L medijuma po bunarčiću i dalje inkubacije 72 h na 28° C. Najniža



koncentracija bez vidljivog rasta je definisana kao MFC, što ukazuje na 99.5% ubijanja originalnog inokuluma. Fungicidi bifonazol i ketokonazol su korišćeni kao pozitivne kontrole (1 – 3500 µg/mL). Svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu i ponovljeni tri puta.

### 3.7.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti

#### 3.7.2.1. Ekstrakcija

Svaki uzorak (1.00 g suvih i samlevenih listova taksona *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*) je rastvoren u 20 mL MeOH i čuvan na sobnoj temperaturi. Nakon 24 h, tečni ekstrakti su filtrirani pomoću Whatman No. 1 filter papira i ostatak je ponovo ekstrahovan sa jednakom zapreminom rastvarača. Nakon 48 h, postupak je ponovljen. Ukupni tečni ekstrakti su upareni do suva na 40 °C pomoću rotacionog vakuum uparivača. Dobijeni suvi metanolni ekstrakti su čuvani u sterilnim epruvetama i čuvani na 4 °C.

Tečni metanolni i vodeni ekstrakti su pripremljeni mešanjem 1 mg suvog samlevenog biljnog materijala i 1 mL rastvarača. Nakon 24h, dobijeni ekstrakti su filtrirani koristeći Whatman No. 1 filter papir i čuvani na 4 °C.

Uzorak (1.00 g samlevenih suvih listova) vrste *Amphoricarpos elegans* je ekstrahovan u Soksletovom ekstraktoru koristeći čist *n*- heksan, etil acetat i MeOH kao rastvarače tokom 6 h. Rastvarači (3 x 120 mL) su sukcesivno menjani nakon 2, 4 i 6 h. Ekstrakti su upareni do suva pomoću rotacionog vakuum uparivača čuvani na 4 °C.

#### 3.7.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Sadržaj fenola u biljnim ekstraktima (suvi metanolni i tečni metanolni i vodeni ekstrakti) taksona *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* utvrđen je pomoću spektrofotometrijske metode (Singleton i sar. 1999). Metanolni rastvor ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/mL je korišćen za analizu. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0.5 mL rastvora ekstrakta,



2.5 mL Folin- Čokalteuovog reagensa, 2 mL 7.5% NaHCO<sub>3</sub> i inkubirana 15 min na 45 °C. Apsorbanca je utvrđena na  $\lambda_{\max} = 765$  nm. Na osnovu izmerene apsorpcije, sadržaj fenola u ekstraktima je izražen u ekvivalentu galne kiseline, GAE (mg GA/g ekstrakta).

Fenolni sadržaj metanolnog, etil acetatnog i *n*- heksanskog ekstrakta vrste *A. elegans* određen je UV spektroskopijom (Singleton i sar. 1999). Metanolni rastvor ekstrakta (1 mg/mL) je korišćen za analizu. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0.1 mL rastvora ekstrakta sa 0.5 mL 10% Folin- Čokalteuovog reagensa i 0.4 mL 7.5% NaHCO<sub>3</sub> i inkubirana 120 min na sobnoj temperaturi. Apsorpcija je određena na  $\lambda_{\max} = 740$  nm. Na osnovu izmerene apsorbanacije, sadržaj fenola u ekstraktima je izražen u ekvivalentu galne kiseline (GAE) ili mg GA/g ekstrakta

### 3.7.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Sadržaj flavonoida u ispitivanim biljnim ekstraktima (suvi metanolni i tečni metanolni i vodeni ekstrakti) taksona *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* određen je spektrofotometrijskom metodom (Quettier- Deleu i sar. 2000). Uzorak je sadržao 1 mL metanolnog rastvora ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/mL i 1 mL 2% AlCl<sub>3</sub>. Uzorci su inkubirani 1h na sobnoj temperaturi. Apsorpcija je određena na  $\lambda_{\max} = 415$  nm. Na osnovu izmerene apsorbanace, sadržaj flavonoida u ekstraktima je izražen u ekvivalentu rutina, RUE (mg RU/g ekstrakta).

Sadržaj flavonoida u suvom metanolnom, etil acetatnom i *n*-heksanskom ekstraktu vrste *A. elegans* je takođe određen UV spektroskopijom (Matejić 2012). Uzorak je sadržao 0,1 mL metanolnog rastvora ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/mL, 0,41 mL 80% EtOH, i 0,01 mL i 0,1 mL Al (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O i CH<sub>3</sub>COOK svaki. Uzorci su inkubirani 40 min na sobnoj temperaturi. Apsorpcija je određena na  $\lambda_{\max} = 415$  nm. Na osnovu izmerene apsorbanace, sadržaj flavonoida u ekstraktima je izražen u ekvivalentu kuercetina (QUE), ili mg QU/g ekstrakta.



### 3.7.2.4. Utvrđivanje antioksidativne aktivnosti

Sposobnost biljnog ekstrakta (suvi metanolni i tečni metanolni i vodeni ekstrakti) taksona *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* da neutrališe 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) slobodni radikal utvrđen je spektrofotometrijskom metodom (Tekao i sar. 1994; Kumarasamy i sar. 2007). Razblaženja iz početnog metanolnog rastvora su napravljena kako bi se dobile koncentracije od 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.99, 0.97 µg/mL i sa rastvorom DPPH. Nakon 30 min u mraku na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanacija na 517 nm. Kontrolni uzorci su sadržali sve reagense osim ekstrakta. Procenat inhibicije je izračunat pomoću jednačine: % inhibicije =  $100 \times (A \text{ kontrole} - A \text{ uzorka}) / A \text{ kontrole}$ , dok su IC50 vrednosti procenjene iz % inhibicije u odnosu na koncentracijsku sigmoidalnu krivu, pomoću nelinearne regresijske analize. U prikazanim rezultatima, antioksidativna efikasnost ekstrakta se povećava sa smanjenjem IC50 vrednosti.

Antioksidativna aktivnost ekstrakata vrste *A. elegans* je utvršena korišćenjem tri testa (DPPH, ABTS i FRAP).

Sposobnost biljnih ekstrakata (suvi metanolni, etil acetatni i *n*-heksanski) da neutrališe 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) slobodni radikal je utvršen UV spektroskopijom (Tekao i sar. 1994; Kumarasamy i sar. 2007). Razblađenja početnog metanolnog rastvora su napravljena da bi se dobile koncentracije od 500, 350, 275, 250, 200, 100, 50 µg/mL DPPH. Nakon 40 min u mraku na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanacija na 517 nm. Kontrolni uzorci su sadržali sve reagense osim ekstrakta. Procenat inhibicije je izračunat korišćenjem jednačine: % inhibicije =  $100 \times (A \text{ kontrole} - A \text{ uzorka}) / A \text{ kontrole}$ , dok su IC50 vrednosti procenjene iz % inhibicije u odnosu na koncentracijsku sigmoidalnu krivu, koristeći nelinearnu regresijsku analizu. U prikazanim rezultatima, antioksidativna efikasnost ekstrakta se povećava sa smanjenjem IC50 vrednosti.

Korišćen je ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) metod (Re R, Pellegrini i sar. 1999) sa nekim modifikacijama. ABTS radikalski katjon se generiše oksidacijom ABTS sa kalijum persulfatom i njegova redukcija u prisustvu antioksidanata



koji doniraju vodonik se meri spektrofotometrijski na 734 nm. Reakciona smeša od 5 mg ABTS je rastvorena u kalijum persulfatu pre eksperimenta. Ovaj rastvor je rastvoren destilovanom vodom kako bi se kalibrisala apsorbanca radnog rastvora sa vrednošću 0.700 na 734 nm. Koncentracija uzorka je bila 1 mg/mL. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 15  $\mu$ L test uzorka i 4 – 1,5 mL ABTS. Nakon 4 min inkubacije na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanca smeše na 734 nm. Aktivnost uklanjanja radikala za svaki ekstrakt je određena na osnovu linearne kalibracione krive askorbinske kiseline i izražena je kao mg askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta (mg Vit C/g d.e.).

Moć redukcije ispitivanih ekstrakata određena je korišćenjem sposobnosti ferri redukcije pomoću FRAP testa (Li i sar. 2008). Ovaj test je zasnovan na redukcijskoj snazi jedinjenja (antioksidansa). Potencijalni antioksidant će redukovati ferri jon ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na fero jon ( $\text{Fe}^{2+}$ ); ovaj drugi formira plavi kompleks ( $\text{Fe}^{2+}/\text{TPTZ}$ ), koji povećava apsorpciju na 593 nm. Ukratko, FRAP reagens je pripremljen mešanjem acetatnog pufera (200  $\mu$ L, pH 3.6), rastvora 20  $\mu$ L TPTZ i 20  $\mu$ L  $\text{FeCl}_3$ . Rastvor uzorka (30  $\mu$ L) i reagens (0,9 mL FRAP) su temeljno mešani i inkubirani na 37° C. Apsorbana je merena na 593 nm nakon 5 min. Standardna kalibraciona kriva je pripremljena korišćenjem različitih koncentracija  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Svi rastvori su sveže pripremljeni. Rezultati su izraženi u mmol Fe/mg suvog ekstrakta (mmol Fe/mg d.e.). Svi opisani testovi izvedeni su na Perkin Elmer Lambda Bio UV- Vis spektrofotometru.

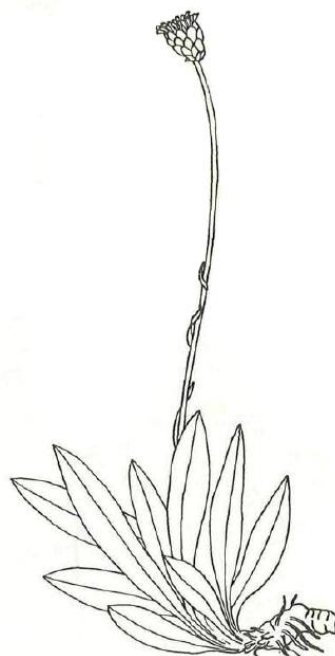
### 3.7.3. Statistička analiza podataka

Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardne devijacije (srednja vrednost  $\pm$  SD) gde je to prikladno. Sve statističke analize izvršene su korišćenjem Microsoft Ekcel softvera.

Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti. Postojanje značajnih razlika između rezultata za ukupni sadržaj fenola i flavonoida i antioksidativnih svojstava ekstrakata analizirano je pomoću ANOVA [38]. IC50 vrednosti dobijene u antioksidativnim testovima ustanovile su regresionu jednačinu između koncentracije uzoraka i efekta neutralizacije.



Ilustracija *Amphoricarpos autariatus* Blečić et Mayer: Habitus, Blečić i Mayer (1967). Die europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos* VISIANI. Phytion, 12, 150-158



## 4 REZULTATI



## 4. REZULTATI

### 4.1. Morfometrijske analize *Xeranthemum* grupe

#### 4.1.1. Deskriptivna statistika karaktera balkanskih taksona roda *Amphoricarpus*

Na osnovu deskriptivne statističke analize utvrđeno je da koeficijent varijacije istraživanih karaktera varira od 8.4% do 181.3%. Veoma visok koeficijent varijacije ( $CV\% > 50$ ) imaju sledeći karakteri: broj listova u rozeti (RL\_no), dužina listića stabljike (SL\_L), širina okriljenog dela obodne cipsele (AC\_Ma), broj glavica na jedinki (C\_no), broj čekinja papusa obodne cipsele (AC\_Pa), širina cvasti (glavice) (C\_W) i broj grana stabljike (SC\_br\_no). Visok koeficijent varijacije ( $CV\% > 30 < 50$ ) imaju sledeći karakteri: dužina lista rozete (RL\_L), oblik obodne cipsele (AC\_S), oblik lista rozete (RL\_S), pokrivenost stabljike trihomama (S\_Ha), širina lista rozete (RL\_W), dužina ušastih nastavaka obodne cipsele (AC\_Ap), broj listića na stabljici (SL\_no), dlakavost obodne cipsele (AC\_Ha). Umeren koeficijent varijacije ( $CV\% > 10 < 30$ ) imaju: dužina obodne cipsele (AC\_H), širina listića involukruma (I\_W), dužina čekinja papusa obodne (AC\_Pa\_H), pokrivenost lica lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ad), pokrivenost naličja lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ab), dužina prvog listića involukruma (I\_H\_1), površina listića involukruma (I\_Ar), dužina cvasti (glavice) (C\_H), visina stabljike (S\_H), širina obodne cipsele (AC\_W). Nizak koeficijent varijacije ( $CV\% < 10$ ) imaju: dužina listića involukruma (I\_H), položaj šiljka srednjeg (2.) listića involukruma (I\_Ap) i oblik listića involukruma (I\_S) (Tabela 4).

Box plotovi za karaktere visina stabljike (S\_H), pokrivenost stabljike trihomama (S\_Ha), broj listića na stabljici (SL\_no), dužina listića stabljike (SL\_L), broj grana stabljike (SC\_br\_no) i oblik lista rozete (RL\_S) prikazani su na Slici 10. Box plotovi za karaktere dužina lista rozete (RL\_L), širina lista rozete (RL\_W), broj listova u rozeti (RL\_no), pokrivenost lica lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ad), pokrivenost naličja lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ab) i dužina cvasti (glavice) (C\_H) prikazani su na Slici 11. Box plotovi za karaktere širina cvasti (glavice) (C\_W), broj glavica na jedinki (C\_no), dužina



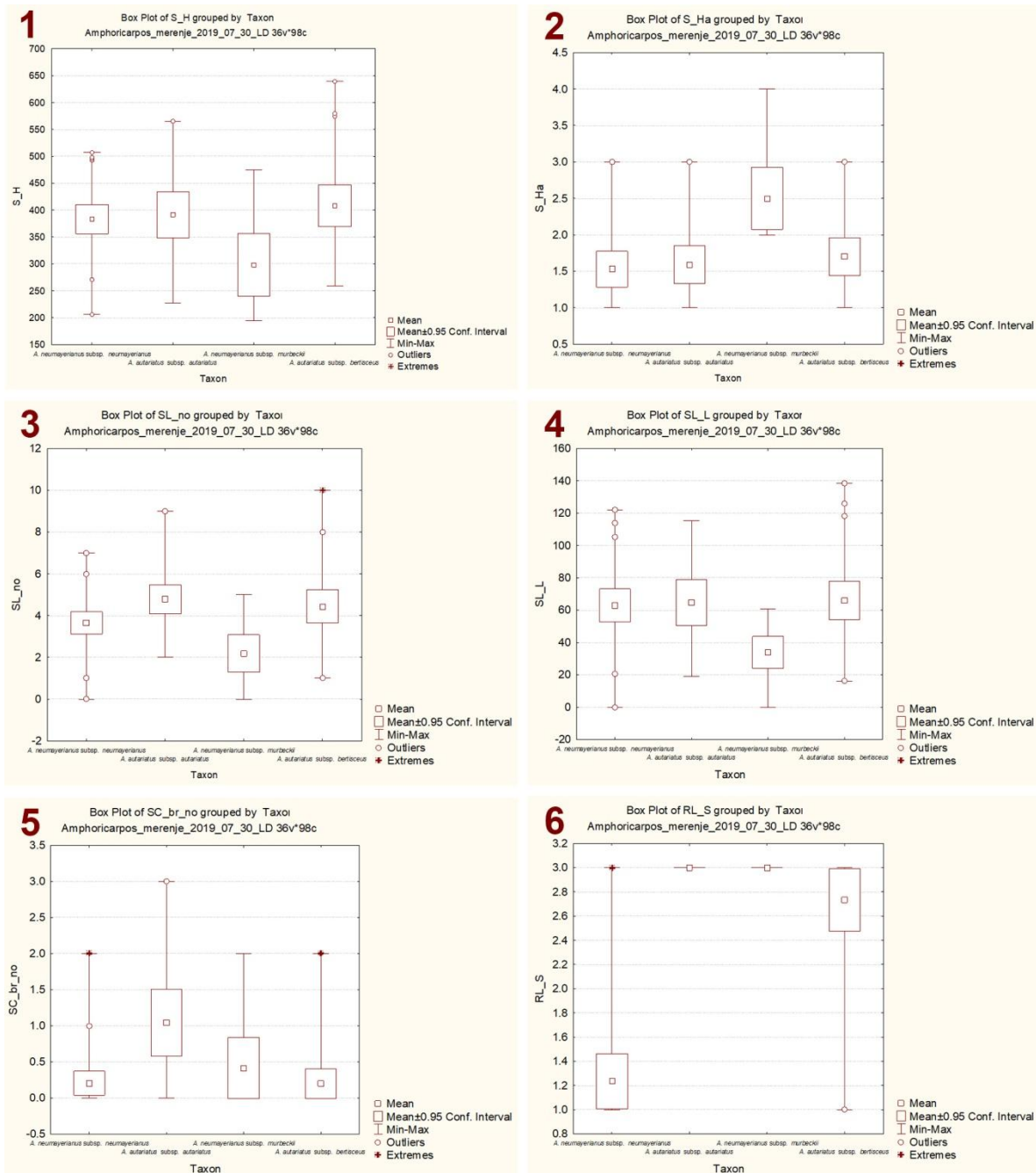
prvog listića involukruma (I\_H\_1), dužina listića involukruma (I\_H), širina listića involukruma (I\_W) i oblik listića involukruma (I\_S) prikazani su na Slici 12. Box plotovi za karaktere površina listića involukruma (I\_Ar), položaj šiljka srednjeg (2.) listića involukruma (I\_Ap), dužina obodne cipsele (AC\_H), širina obodne cipsele (AC\_W), oblik obodne cipsele (AC\_S) i dužina ušastih nastavaka obodne cipsele (AC\_Ap) prikazani su na Slici 13. Box plotovi za karaktere dlakavost obodne cipsele (AC\_Ha), širina okriljenog dela obodne cipsele (AC\_Ma), broj čekinja papusa obodne cipsele (AC\_Pa) i dužina čekinja papusa obodne cipsele (AC\_Pa\_H) prikazani su na Slici 14.



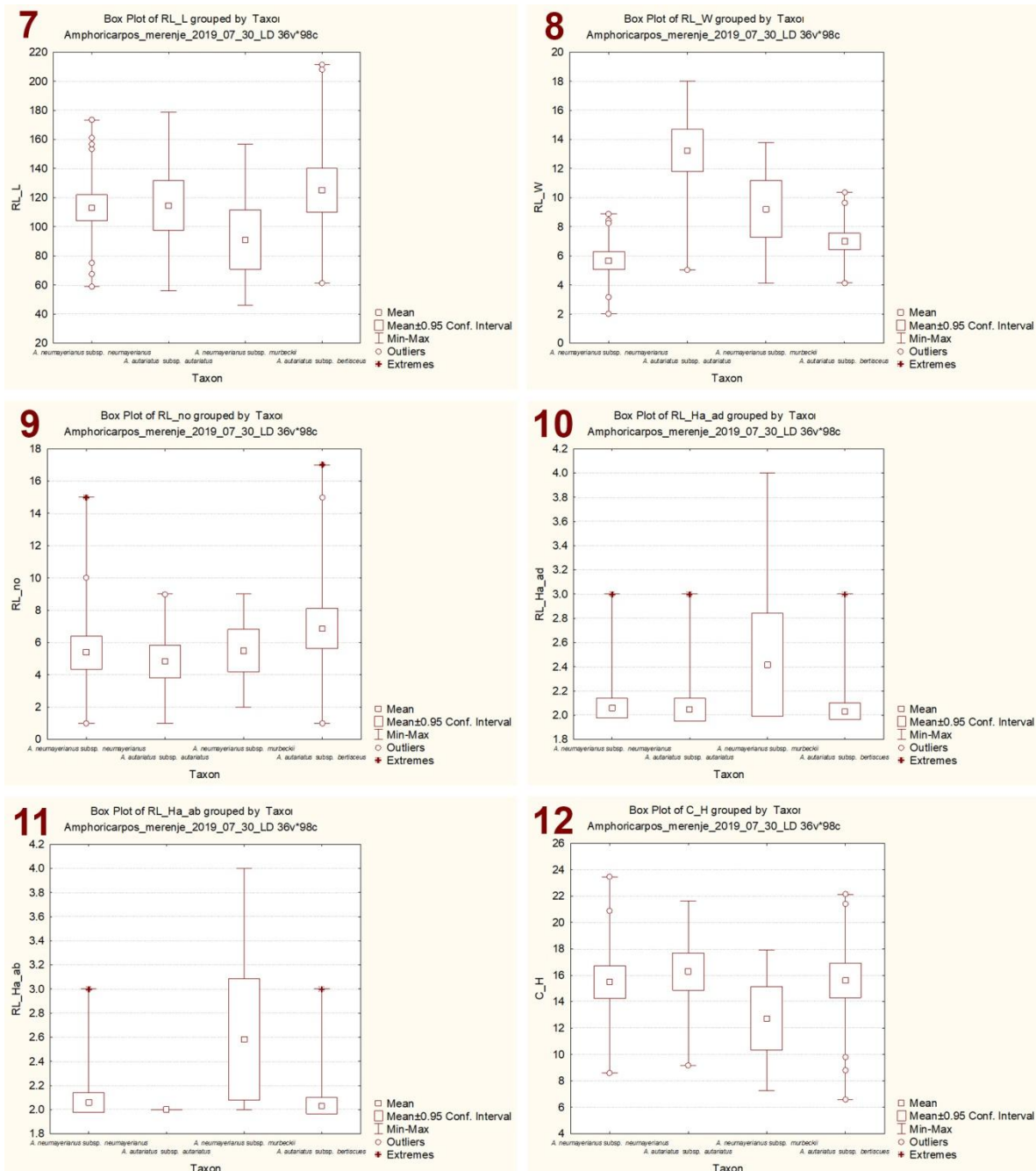
Tabela 4. Rezultati deskriptivne statističke analize za karaktere

Naziv karaktera i oznaka	Mean	Min	Max	SD	CV (%)
Visina stabljike <b>S_H</b>	382.333	194.537	639.7533	96.96271	25.3608
Pokrivenost stabljike trihomama <b>S_Ha</b>	1.7143	1	4	0.73218	42.7103
Broj listića na stabljici <b>SL_no</b>	3.9794	0	10	1.87071	47.0102
Dužina listića stabljike <b>SL_L</b>	60.6694	0	138.4188	30.93232	50.9851
Broj grana stabljike <b>SC_br_no</b>	0.4184	0	3	0.75878	181.3661
Oblik lista rozete <b>RL_S</b>	2.3061	1	3	0.95689	41.4933
Dužina lista rozete <b>RL_L</b>	114.3643	46.058	211.2762	35.43066	30.9805
Širina lista rozete <b>RL_W</b>	8.2127	2.0307	18.0199	3.69318	44.9693
Broj listova u rozeti <b>RL_no</b>	5.7245	1	17	2.91028	50.839
Pokrivenost lica lista rozete trihomama <b>RL_Ha_ad</b>	2.0918	2	4	0.32385	15.4818
Pokrivenost naličja lista rozete trihomama <b>RL_Ha_ab</b>	2.102	2	4	0.3658	17.4022
Dužina cvasti (glavice) <b>C_H</b>	15.3647	6.5927	23.4549	3.57608	23.2746
Širina cvasti (glavice) <b>C_W</b>	14.2474	3.7941	32.9093	7.89443	55.4094
Broj glavica na jedinki <b>C_no</b>	1.3061	1	4	0.67972	52.0413
Dužina prvog listića involukruma <b>I_H_1</b>	5.0828	2.7801	7.2126	1.02254	20.1175
Dužina listića involukruma <b>I_H</b>	9.9231	6.4012	12.0136	0.94862	9.5597
Širina listića involukruma <b>I_W</b>	2.2719	1.8333	2.9372	0.26828	11.8083
Oblik listića involukruma <b>I_S</b>	3.0624	2.5	3.6	0.26002	8.4909
Površina listića involukruma <b>I_Ar</b>	21.1149	13.4515	31.912	4.32386	20.4777
Položaj šiljka srednjeg (2.) listića involukruma <b>I_Ap</b>	1.9402	1.3333	2	0.16879	8.6997
Dužina obodne cipsele <b>AC_H</b>	6.1045	4.9715	7.6816	0.66534	10.8993
Širina obodne cipsele <b>AC_W</b>	2.2747	1.5188	4.0218	0.60253	26.488
Oblik obodne cipsele <b>AC_S</b>	2.2914	1	3	0.89633	39.1171
Dužina ušastih nastavaka obodne cipsele <b>AC_Ap</b>	0.4505	0.2013	0.9029	0.20471	45.4432
Dlakavost obodne cipsele <b>AC_Ha</b>	1.9375	1	3	0.92871	47.9334
Širina okriljenog dela obodne cipsele <b>AC_Ma</b>	0.3256	0.0775	0.7989	0.16655	51.1541
Broj čekinja papusa obodne cipsele <b>AC_Pa</b>	4.2774	2	9	2.23644	52.2848
Dužina čekinja papusa obodne cipsele <b>AC_Pa_H</b>	6.0332	4.5729	7.9415	0.93291	15.463

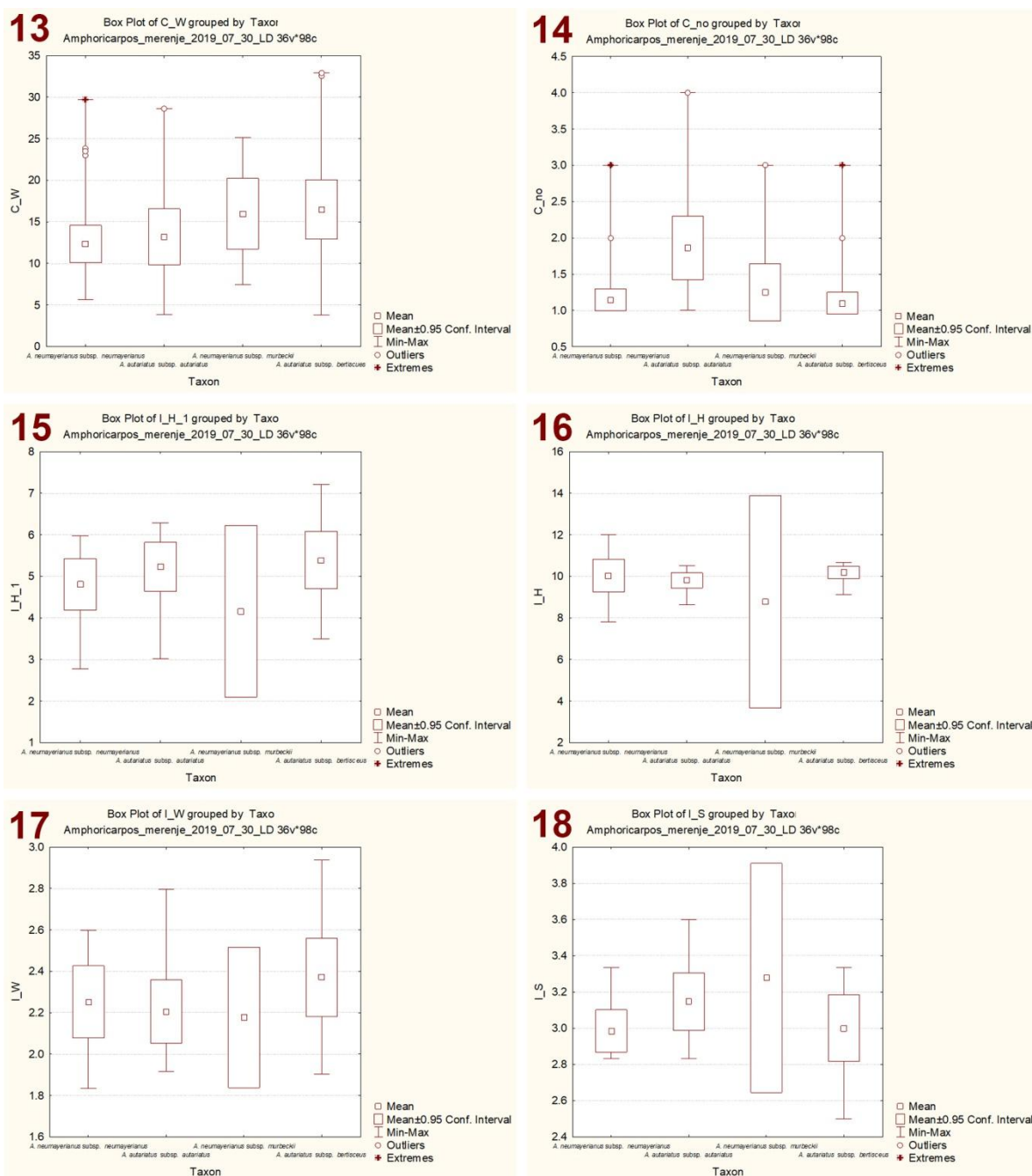
Legenda: Mean - srednja vrednost, Min. - minimalna vrednost, Max. - maksimalna vrednost, SD - standardna devijacija, CV - koeficijent varijacije



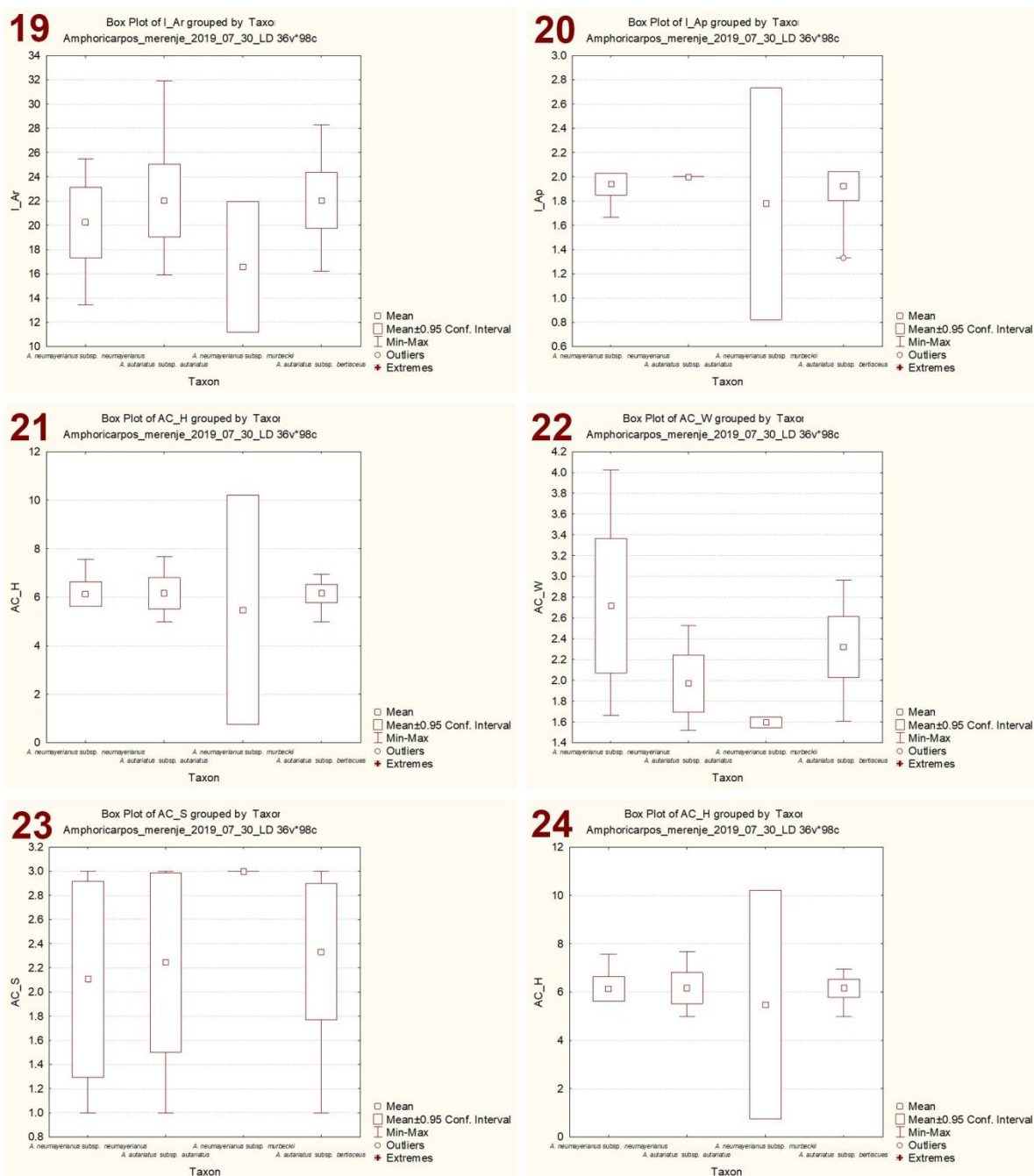
Slika 10. Deskriptivna statistika. Box plotovi za karaktere: 1 - visina stabljike (S\_H); 2 - pokrivenost stabljike trihomama (S\_Ha); 3 - broj listića na stabljici (SL\_no); 4 - dužina listića stabljike (SL\_L); 5 - broj grana stabljike (SC\_br\_no); 6 - oblik lista rozete (RL\_S).



Slika 11. Deskriptivna statistika. Box plotovi za karaktere: 7 - dužina lista rozete (RL\_L); 8 - širina lista rozete (RL\_W); 9 - broj listova u rozeti (RL\_no); 10 - pokrivenost lica lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ad); 11 - pokrivenost naličja lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ab); 12 - dužina cvasti (glavice) (C\_H).

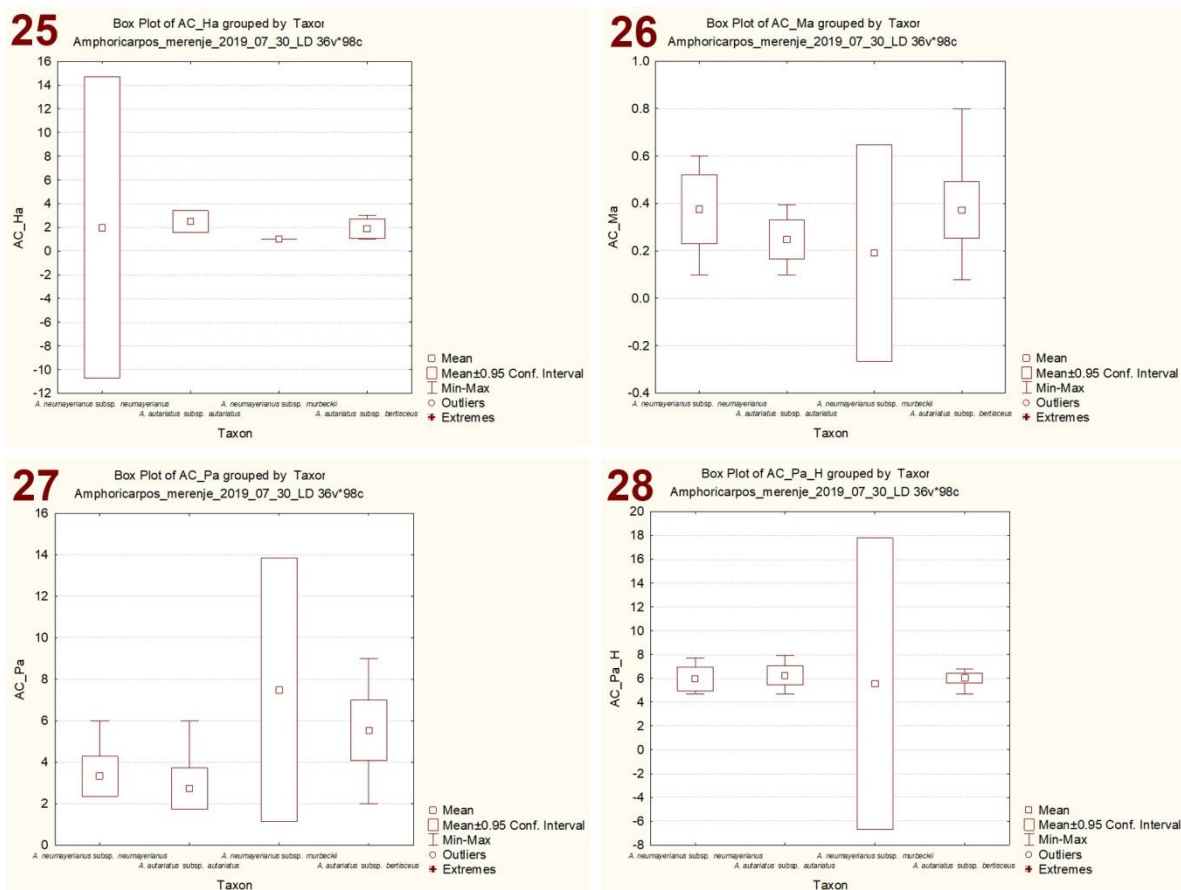


Slika 12. Deskriptivna statistika. Box plotovi za karaktere: 13 - širina cvasti (glavice) (C\_W); 14 - broj glavica na jedinki (C\_no); 15 - dužina prvog listića involukruma (I\_H\_1); 16 - dužina listića involukruma (I\_H); 17 - širina listića involukruma (I\_W); 18 - oblik listića involukruma (I\_S).



Slika 13. Deskriptivna statistika. Box plotovi za karaktere: 19 - površina listića involukruma ( $I_{Ar}$ ); 20 - položaj šiljka srednjeg (2.) listića involukruma ( $I_{Ap}$ ); 21 - dužina obodne cipsele ( $AC_H$ ); 22 - širina obodne cipsele ( $AC_W$ ); 23 - oblik obodne cipsele ( $AC_S$ ); 24 - dužina ušastih nastavaka obodne cipsele ( $AC_{Ap}$ ).



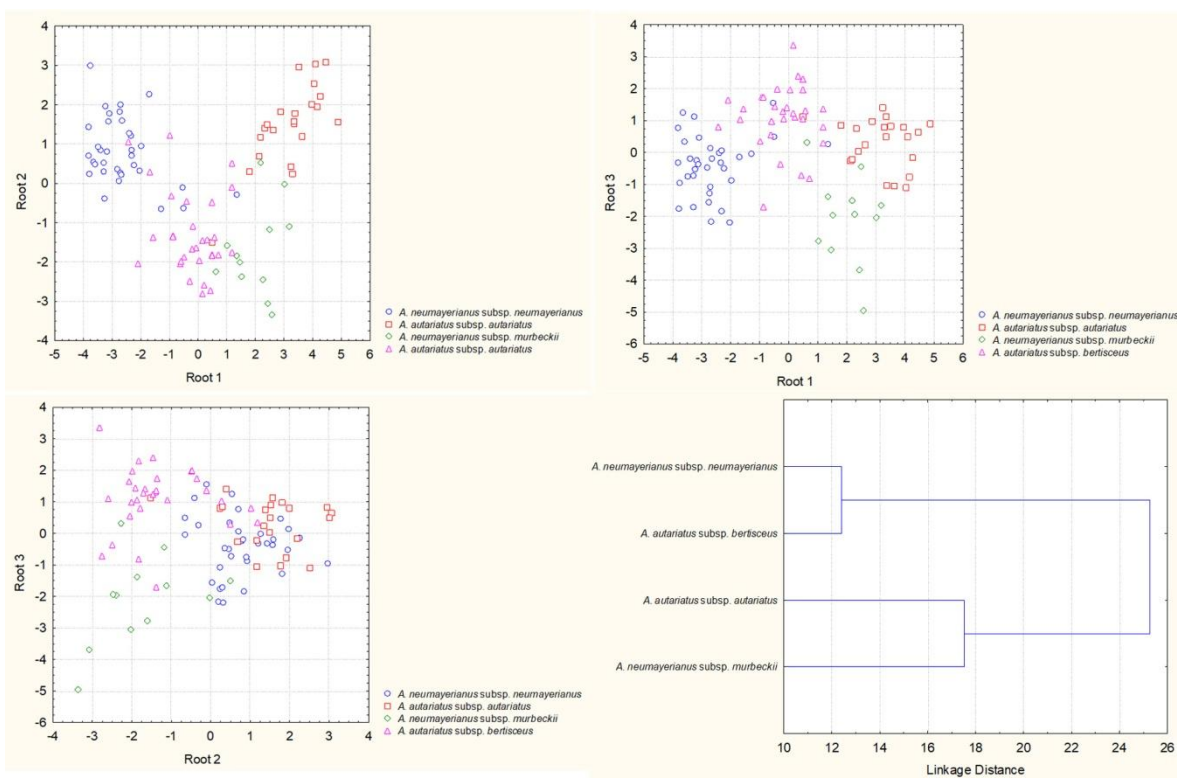


Slika 14. Deskriptivna statistika. Box plotovi za karaktere: 25 - dlakavost obodne cipsele (AC\_Ha); 26 - širina okriljenog dela obodne cipsele (AC\_Ma); 27 - broj čekinja papusa obodne cipsele (AC\_Pa); 28 - dužina čekinja papusa obodne cipsele (AC\_Pa\_H).



#### **4.1.2. Morfološka diferencijacija balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* - kanonijska diskriminantna analiza (CDA)**

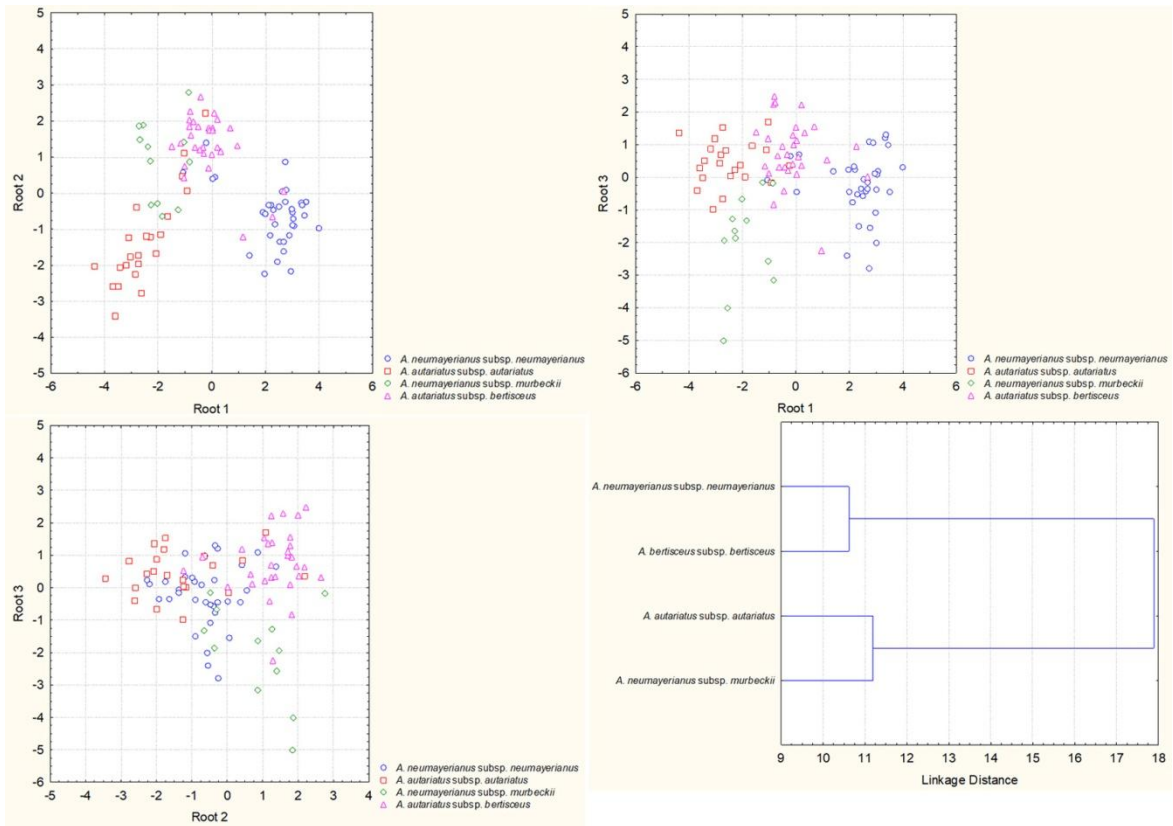
Kanonijska diskriminantna analiza *a priori* definisanih grupa kojom su analizirani karakteri balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* pokazala je dobro razdvajanje istraživanih taksona. *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* se izdvaja u negativnom delu prve ose i pozitivnom delu druge i treće ose. *A. autariatus* subsp. *autariatus* se izdvaja u pozitivnom delu prve, druge i treće ose. *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* se izdvaja u pozitivnom delu prve ose i negativnom delu druge i treće ose. *A. autariatus* subsp. *bertisceus* se izdvaja u negativnom delu prve i druge ose i pozitivnom delu treće ose (Slika 15). Karakteri koji najviše doprinose diferencijaciji su: broj grana stabljike (SC\_br\_no), oblik lista rozete (RL\_S), dužina lista rozete (RL\_L) i širina lista rozete (RL\_W). Na kladogramu se uočavaju dve jasno izdvojene klade. Prvu kladu čine dve podklade morfološki sličnih taksona: *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*, a drugu kladu čine dve podklade takođe morfološki sličnih taksona: *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (Slika 15). Ove dve klade pokazuju jasnu distancu, odnosno morfološke razlike između ove dve grupe taksona.



Slika 15. Kanonijska diskriminantna analiza balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*



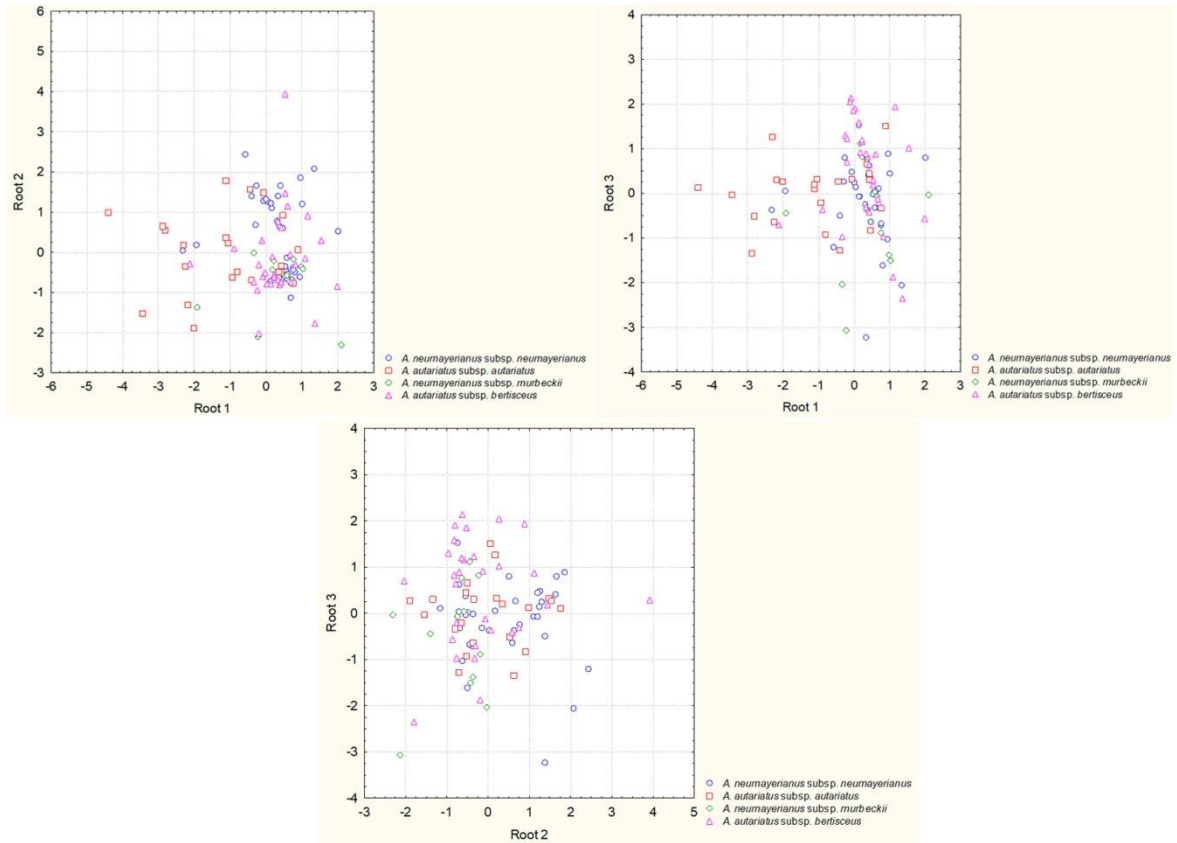
Kanonijska diskriminantna analiza kojom su analizirani karakteri habitusa i glavice: visina stabljike (S\_H), pokrivenost stabljike trihomama (S\_Ha), broj listića na stabljici (SL\_no), dužina listića stabljike (SL\_L), broj grana stabljike (SC\_br\_no), oblik lista rozete (RL\_S), dužina lista rozete (RL\_L), širina lista rozete (RL\_W), broj listova u rozeti (RL\_no), pokrivenost lica lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ad), pokrivenost naličja lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ab), dužina cvasti (glavice) (C\_H), širina cvasti (glavice) (C\_W) i broj glavica na jedinki (C\_no) balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* pokazala je najbolje razdvajanje istraživanih taksona. *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* se izdvaja u pozitivnom delu prve ose i negativnom delu druge i treće ose. *A. autariatus* subsp. *autariatus* se izdvaja u negativnom delu prve i druge ose i pozitivnom delu treće ose. *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* se izdvaja u negativnom delu prve i treće ose i pozitivnom delu druge ose. *A. autariatus* subsp. *bertisceus* se izdvaja u negativnom delu prve ose i pozitivnom delu druge i treće ose (Slika 16). Karakteri koji najviše doprinose diferencijaciji su: broj listića na stabljici (SL\_no), oblik lista rozete (RL\_S), dužina lista rozete (RL\_L), širina lista rozete (RL\_W) i pokrivenost naličja lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ab). Na kladogramu se uočavaju dve jasno izdvojene klade. Prvu kladu čine dve podklade morfološki sličnih taksona: *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*, a drugu kladu čine dve podklade takođe morfološki sličnih taksona: *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (Slika 16). Ove dve klade pokazuju jasnu distancu, odnosno morfološke razlike između ove dve grupe taksona, što je podržano i klaster analizom svih karaktera.



Slika 16. Kanonijska diskriminantna analiza balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* - karakteri habitusa i glavice



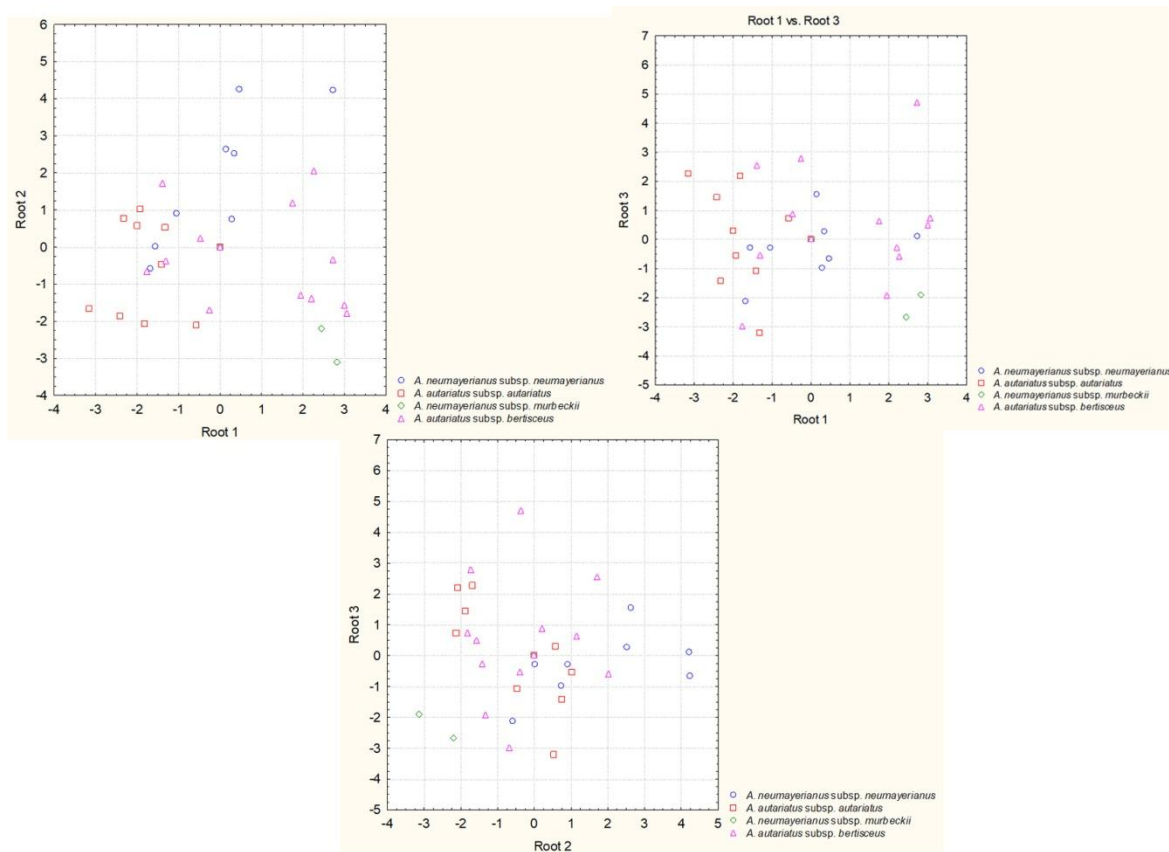
Kanonijska diskriminantna analiza kojom su analizirani karakteri glavice i involukruma balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* nije pokazala razdvajanje istraživanih taksona (Slika 17).



Slika 17. Kanonijska diskriminantna analiza balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* - karakteri glavice i involukruma



Kanonijska diskriminantna analiza kojom su analizirani karakteri cipsele balkanskih taksona roda *Amphoricarpus* nije pokazala razdvajanje istraživanih taksona (Slika 18).



Slika 18. Kanonijska diskriminantna analiza balkanskih taksona roda *Amphoricarpus* - karakteri cipsele



## 4.2. Mikromorfologija *Xeranthemum* grupe

Mikromorfološka analiza stabla, lista i involukralnih brakteja predstavnika *Xeranthemum* grupe je po prvi put uražena i prikazana u ovom istraživanju.

### 4.2.1. Mikromorfološka analiza stabla

Mikrografije stabla predstavnika *Xeranthemum* grupe prikazane su na Tabli A. Gusto raspoređene kovrdžave, nežlezdane trihome, posebno na rebrastoj površini stabla, morfološki su iste kod svih istraživanih vrsta (Tabla A1–15). Ove trihome su vermiformne (lanatne). Žlezdane trihome kapitatnog tipa, uočene kao žlezdane tačke, takođe su dokumentovane, ali je njihovo prisustvo ređe (Tabla A1–2, 8–10, 12). Kod nekih taksona žlezdane trihome nisu uočene, verovatno zbog gustog rasporeda nežlezdanih trihoma.



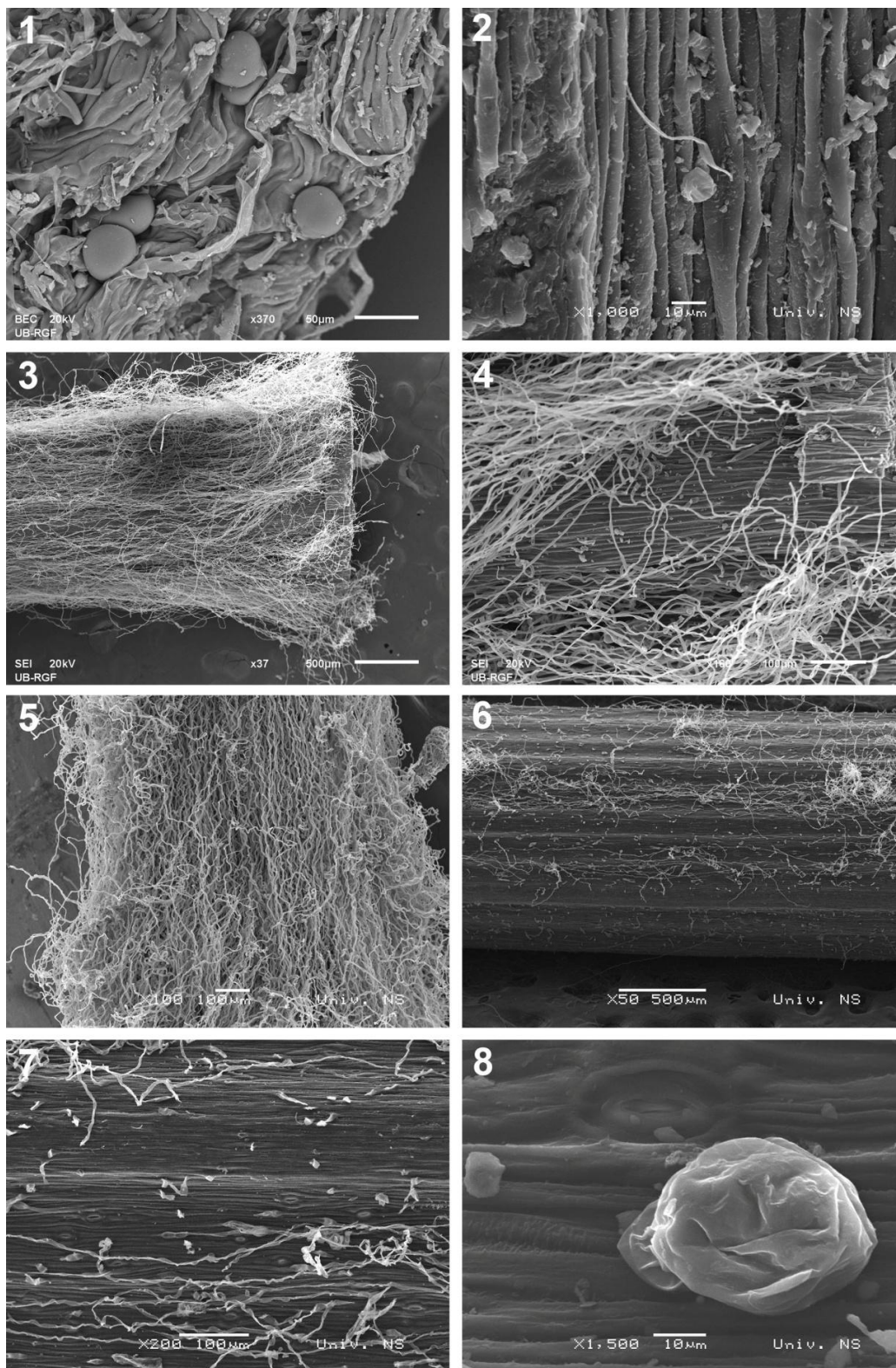


Tabla A. Mikrografije stabla predstavnika *Xeranthemum* grupe. 1, 2 *Sh. masarica*. 3, 4 *A. exsul*. 5 *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*. 6, 7, 8 *A. autariatus* subsp. *autariatus*.

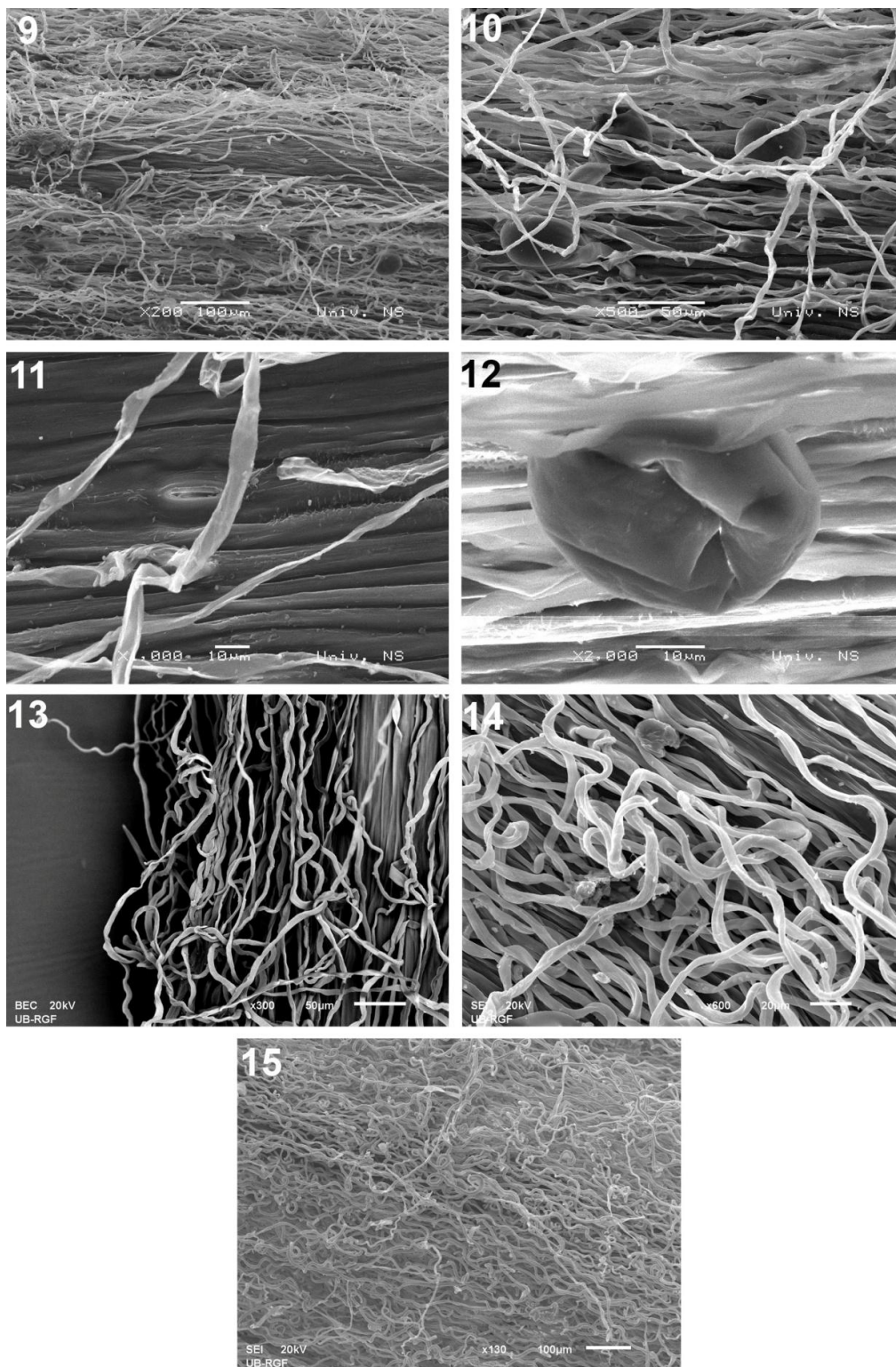


Tabla A. Mikrografije stabla predstavnika *Xeranthemum* grupe (nastavak). 9, 10 *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. 11, 12 *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*. 14 *Ch.orientalis*. 15. *X. inapertum*. 16. *S. pungens*.



#### 4.2.2. Mikromorfološka analiza listova

Mikrografije listova predstavnika *Xeranthemum* grupe prikazane su na Tabli B.

Adaksijalna površina lista *Sh. denticulata* (Tabla B1–2) je gola. Čelije adaksijalnog epidermisa su poligonalnog oblika (Tabla B1–2). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i glatki, odnosno ne pokazuju naboranost (Tabla B1–2). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su blago izvijugani do ravni (Tabla B1–2). Raspored ćelija adaksijalnog epidermisa je nalik “puzlama” (u obliku je slagalice) (Tabla B1–2). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B3–4) koje formiraju baršunasti indumentum. Na abaksijalnoj strani se takođe uočava veliki broj krupnih glandularnih trihoma, biserijatnog tipa (Tabla B3–4).

Adaksijalna površina lista *A. exsul* (Tabla B5–6) je prekrivena vermiformnim trihomama. Čelije adaksijalnog epidermisa su poligonalnog oblika (Tabla B5–6). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i glatki, odnosno ne pokazuju naboranost (Tabla B5–6). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su blago izvijugani do ravni (Tabla B5–6). Raspored ćelija adaksijalnog epidermisa je nalik “puzlama” (u obliku je slagalice) (Tabla B5–6). Retke glandularne trihome su prisutne na adaksijalnoj strani lista (Tabla B6). Anomocitne stome, blago uvučene, se uočavaju na adaksijalnoj strani lista (Tabla B6). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B7–8) koje formiraju baršunasti indumentum. Na abaksijalnoj strani se takođe uočavaju krupne glandularne trihome, biserijatnog tipa (Tabla B8).

Adaksijalna površina lista *A. elegans* sporadično je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B9–10). Čelije adaksijalnog epidermisa su poligonalnog oblika (Tabla B9–10). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i glatki, odnosno ne pokazuju naboranost (Tabla B9–10). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su blago izvijugani (Tabla B9–10). Raspored ćelija adaksijalnog epidermisa je nalik “puzlama” (u obliku je slagalice) (Tabla B9–10). Retke glandularne trihome su prisutne na adaksijalnoj strani lista (Tabla B9–10). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama koje formiraju baršunasti indumentum (Tabla B11).



Na abaksijalnoj strani nisu uočene glandularne trihome usled prisustva brojnih vermiformnih trihoma (Tabla B11).

Adaksijalna površina lista *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* sporadično je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B12–13). Čelije adaksijalnog epidermisa su poligonalnog oblika (Tabla B12–13). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i glatki (Tabla B12–13). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su ravni (Tabla B12–13). Raspored ćelija adaksijalnog epidermisa je nalik “puzlama” (u obliku je slagalice) (Tabla B12–13). Retke glandularne trihome su prisutne na adaksijalnoj strani lista (Tabla B13). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama koje formiraju baršunasti indumentum (Tabla B14–15). Na abaksijalnoj strani nisu uočene glandularne trihome usled prisustva brojnih gusto raspoređenih vermiformnih trihoma (Tabla B14–15).

Adaksijalna površina lista *A. autariatus* subsp. *autariatus* sporadično je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B16). Čelije adaksijalnog epidermisa su poligonalnog oblika (Tabla B16). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i glatki (Tabla B16). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su ravni (Tabla B16). Raspored ćelija adaksijalnog epidermisa je nalik “puzlama” (u obliku je slagalice) (Tabla B16). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama koje formiraju baršunasti indumentum (Tabla B17). Na abaksijalnoj strani se uočavaju krupne glandularne trihome, biserijatnog tipa (Tabla B17).

Adaksijalna površina lista *A. autariatus* subsp. *bertisceus* sporadično je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B18). Čelije adaksijalnog epidermisa su poligonalnog oblika (Tabla B18). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i glatki (Tabla B18). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su ravni (Tabla B18). Raspored ćelija adaksijalnog epidermisa je nalik “puzlama” (Tabla B18). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama formirajući baršunasti indumentum (Tabla B19–20). Na abaksijalnoj strani se uočavaju krupne glandularne trihome, biserijatnog tipa (Tabla B19–20).

Adaksijalna površina lista *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* sporadično je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B21). Čelije adaksijalnog epidermisa su



poligonalnog oblika (Tabla B21). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i glatki (Tabla B21). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su ravni (Tabla B21). Raspored ćelija adaksijalnog epidermisa je nalik “puzlama” (u obliku je slagalice) (Tabla B21). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama koje formiraju baršunasti indumentum (Tabla B22–23). Na abaksijalnoj strani se uočavaju krupne glandularne trihome, biserijatnog tipa (Tabla B22–23).

Adaksijalna površina lista *Ch. orientalis* sporadično je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B24). Ćelije adaksijalnog epidermisa su veoma nepravilnog oblika (Tabla B24). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i imaju izrazite nabore kutikule (Tabla B24). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su izvijugani (Tabla B24). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama koje formiraju baršunasti indumentum (Tabla B25). Na abaksijalnoj strani se uočavaju krupne glandularne trihome, biserijatnog tipa (Tabla B25).

Adaksijalna površina lista *X. inapertum* sporadično je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B26). Ćelije adaksijalnog epidermisa su poligonalne ili nepravilnog oblika (Tabla B26). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i neke ćelije imaju blage nabore kutikule (Tabla B26). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su izvijugani (Tabla B26). Antiklinalna granica ćelija adaksijalnog epidermisa u obliku kanala (Tabla B26). Retke glandularne trihome se uočavaju na adaksijalnoj strani lista (Tabla B26). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama koje formiraju baršunasti indumentum (Tabla B27). Na abaksijalnoj strani nisu uočene glandularne trihome usled prisustva brojnih gusto raspoređenih vermiformnih trihoma (Tabla B27).

Adaksijalna površina lista *X. annuum* sporadično je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B28). Ćelije adaksijalnog epidermisa su poligonalnog oblika (Tabla B28). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i neke ćelije imaju blage nabore kutikule (Tabla B28). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su blago izvijugani (Tabla B28). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama koje formiraju baršunasti indumentum (Tabla B29). Na



abaksijalnoj strani nisu uočene glandularne trihome usled prisustva brojnih gusto raspoređenih vermiformnih trihoma (Tabla B29).

Adaksijalna površina lista *X. cylindraceum* sporadično je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B30). Čelije adaksijalnog epidermisa su poligonalnog oblika (Tabla B31). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni i neke ćelije imaju blage nabore kutikule (Tabla B31). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su blago izvijugani (Tabla B31). Retke krupne glandularne biserijatne trihome se uočavaju na adaksijalnoj strani lista (Tabla B31). Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama koje formiraju baršunasti indumentum (Tabla B32). Na abaksijalnoj strani se uočavaju krupne glandularne biserijatne trihome (Tabla B33).

Adaksijalna površina lista *S. pungens* gusto je prekrivena vermiformnim trihomama (Tabla B34). Čelije adaksijalnog epidermisa su poligonalnog oblika (Tabla B35). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su konveksni sa veoma izraženim naborima (strijatna površina) (Tabla B35). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su izvijugani (Tabla B35). Anomocitne stome, koje su blago uvučene, se uočavaju na adaksijalnoj strani lista (Tabla B35). Retke krupne glandularne biserijatne trihome se uočavaju na adaksijalnoj strani lista. Abaksijalna strana lista je gusto prekrivena vermiformnim trihomama koje formiraju baršunasti indumentum (Tabla B34). Na abaksijalnoj strani nisu uočene glandularne trihome usled prisustva brojnih gusto raspoređenih vermiformnih trihoma (Tabla B34).

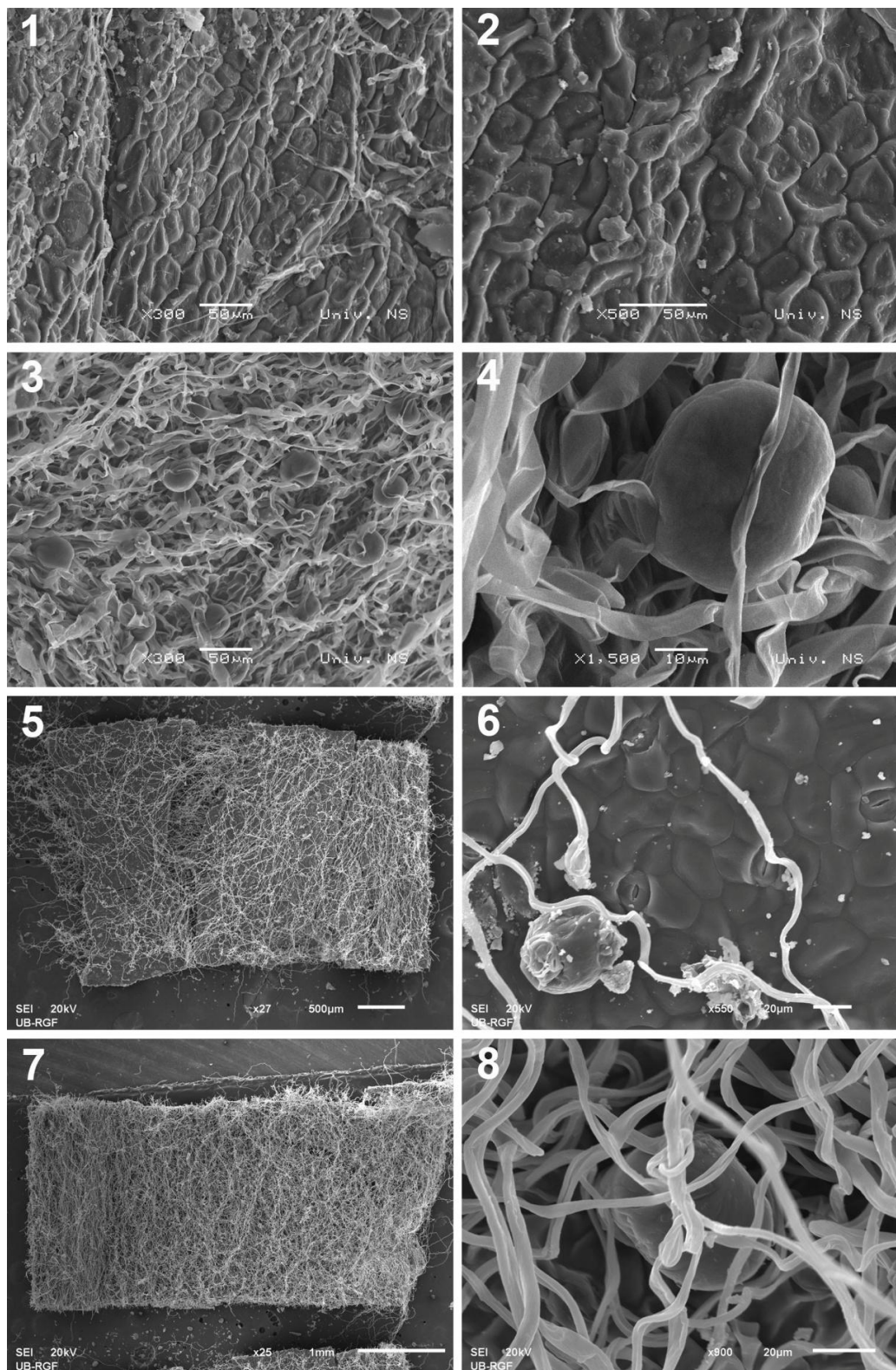


Tabla B. Mikrografije listova predstavnika *Xeranthemum* grupe. 1, 2, 3, 4 *Sh. denticulata* (1, 2 lice; 3, 4 naličje). 5, 6, 7, 8 *A. exsul* (5, 6 lice; 7, 8 naličje).

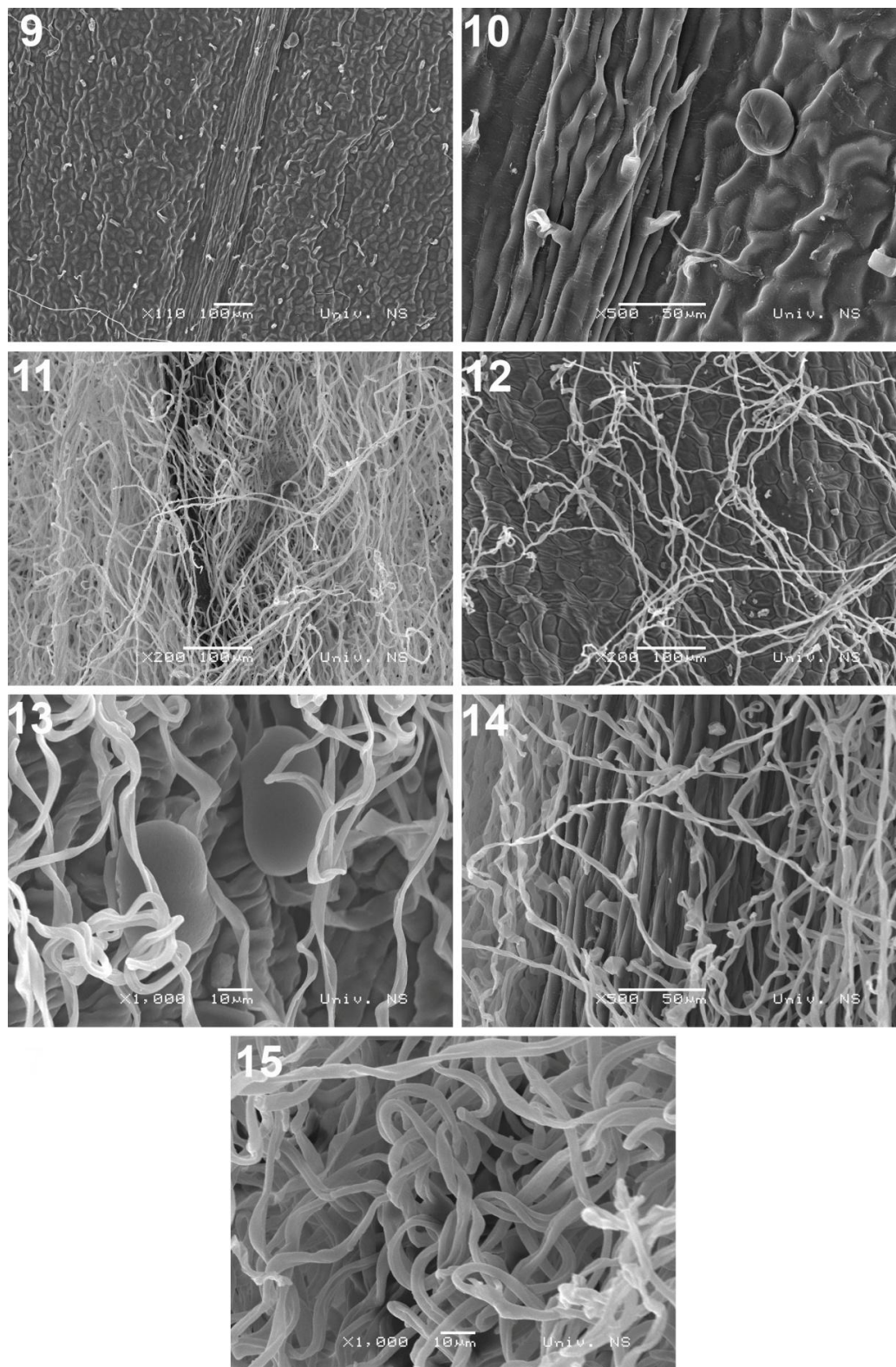


Tabla B. Mikrografije listova predstavnika *Xeranthemum* grupe (nastavak). 9, 10, 11 *A. elegans* (9, 10 lice; 11 naličje). 12, 13, 14, 15 *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (12, 13 lice; 14, 15 naličje).



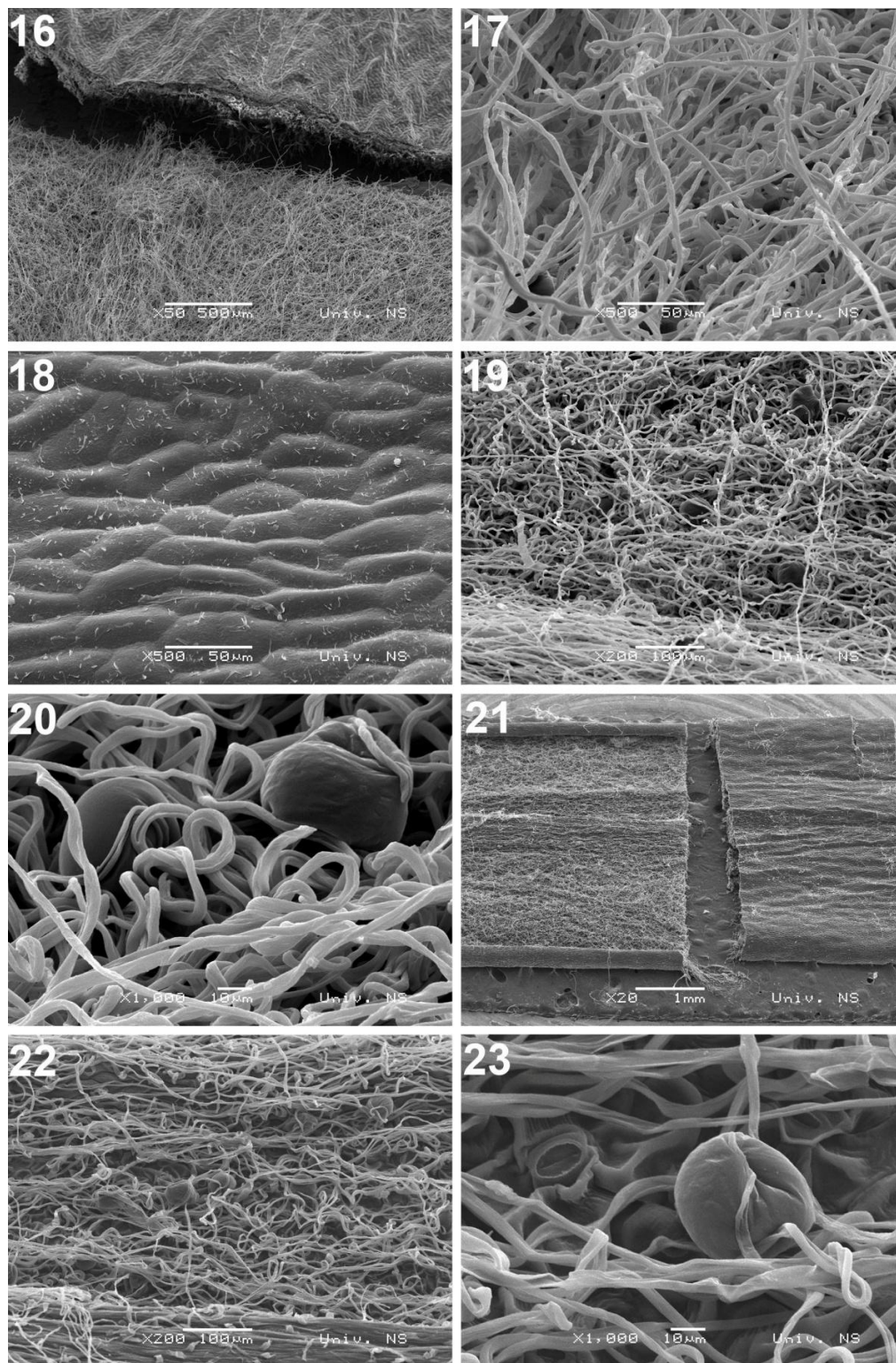


Tabla B. Mikrografije listova predstavnika *Xeranthemum* grupe (nastavak). 16, 17 *A. autariatus* subsp. *autariatus* (16 lice i naličje; 17 naličje). 18, 19, 20 *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (18 lice; 19, 20 naličje). 21, 22, 23 *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (21 lice i naličje; 22, 23 naličje).

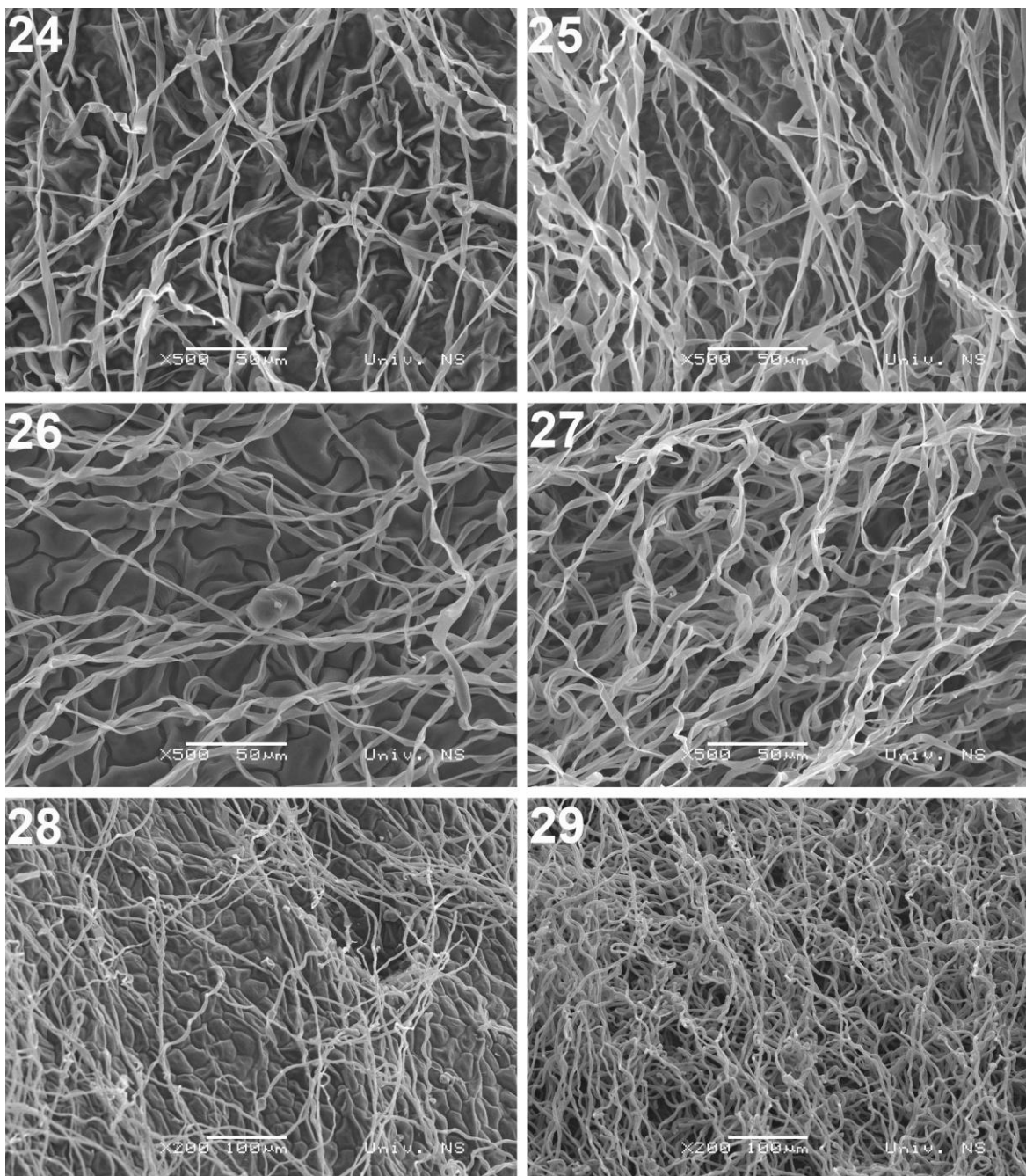


Tabla B. Mikrografije listova predstavnika *Xeranthemum* grupe (nastavak). 24, 25 *Ch.orientalis* (24 lice; 25 naličje). 26, 27 *X. inapertum* (26 lice; 27 naličje). 28, 29 *X. annuum* (28 lice; 29 naličje).

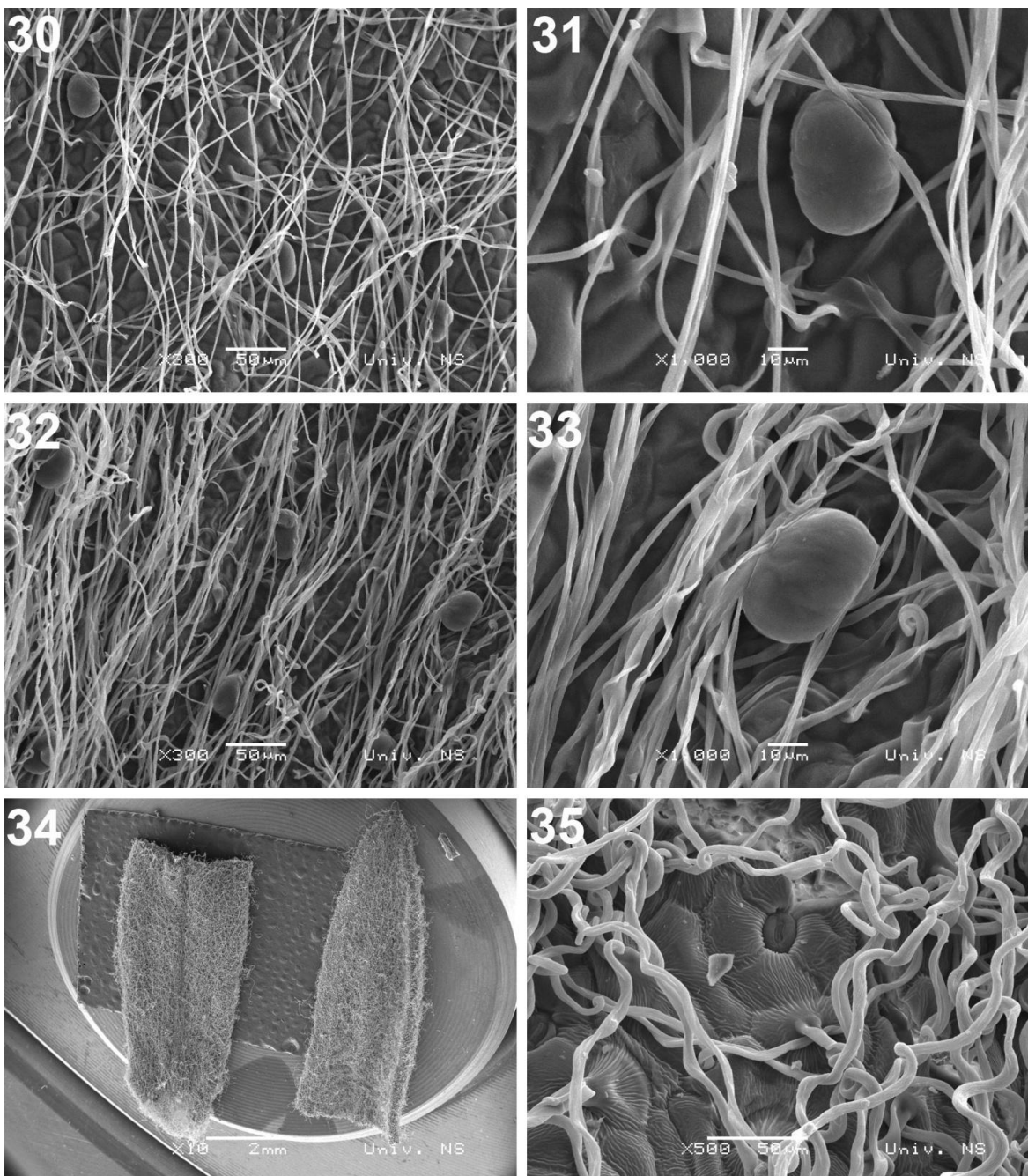


Tabla B. Mikrografije listova predstavnika *Xeranthemum* grupe (nastavak). 30, 31, 32, 33 *X. cylindraceum* (30, 31 lice; 32, 33 naličje). 34, 35 *S. pungens* (34 lice i naličje; 35 lice).



### 4.2.3. Mikromorfološka analiza involukralnih brakteja

Mikrografije involukralnih brakteja predstavnika *Xeranthemum* grupe prikazane su na Tablama C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>.

Mikrografije srednje involukralne brakteje vrste *Sh. masarica* prikazane su na Tabli C<sub>1</sub>. Srednja involukralna brakteja (srednji listić involukruma) je kožasto - opnasta, jajasto - lanceolatna, skoro glatka, sa nežlezdanim trihomama koje su sporadično raspoređene blizu ivica brakteje (Tabla C<sub>1</sub> - 1-3). Na površini se mogu uočiti stome (Tabla C<sub>1</sub> - 2-4). Površina je nepravilno mrežasta i na površini je prisutan vosak (Tabla C<sub>1</sub> - 4). Mukro (šiljak) je kratak i zaobljen (Tabla C<sub>1</sub> - 4).

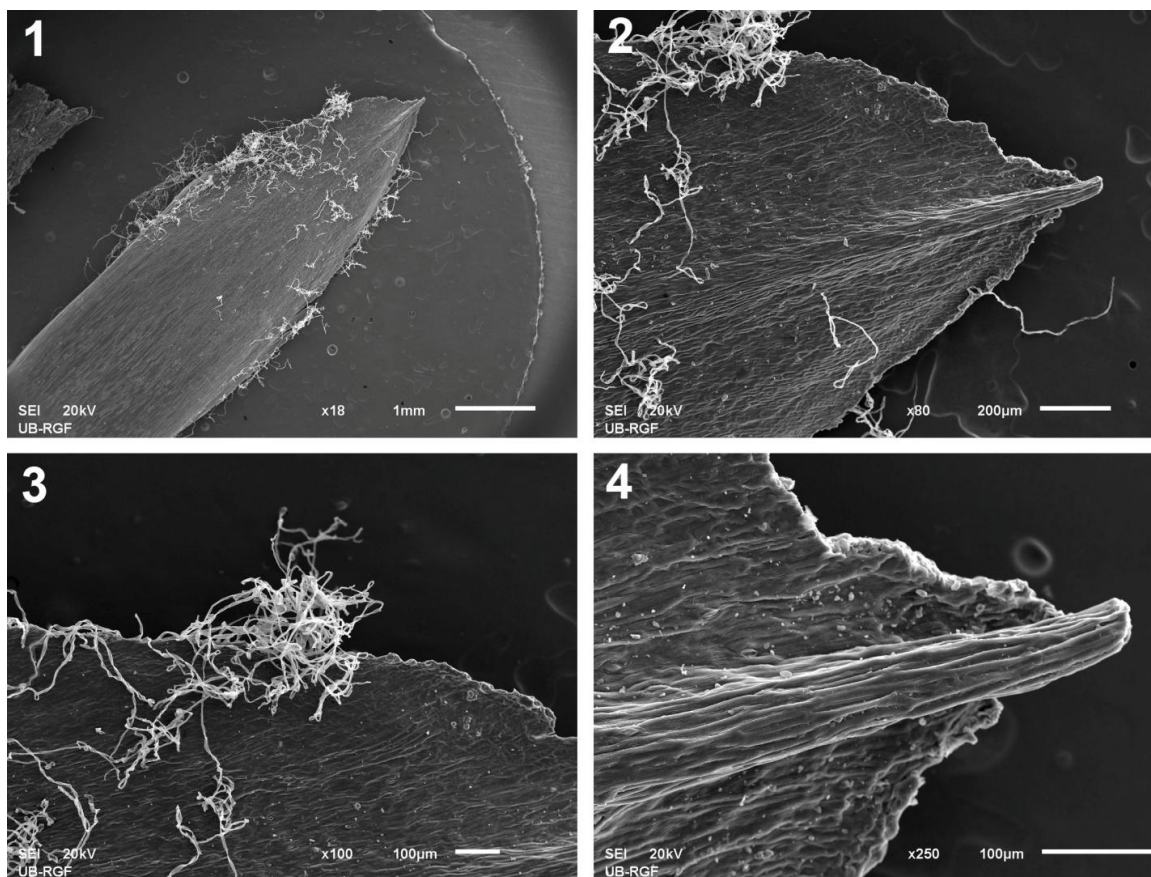


Tabla C<sub>1</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *Sh. masarica*. 1 Jajasto - lanceolatna srednja involukralna brakteja. 2 Nepravilno mrežasta površina brakteje sa voskom., 3 Nežlezdane trihome na ivici brakteje. 4 Kratak i zaobljen mukro.



Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *A. exsul* prikazane su na Tabli C<sub>2</sub>. Srednja involukralna brakteja je kožasto-opnasta, jajasto-lanceolatna do objajasta, sa nežlezdanim trihomama koje su raspoređene po ivicama i na vrhu brakteje (Tabla C<sub>2</sub> - 1–3). Površina je mrežasto-naborana, na površini je prisutan vosak (Tabla C<sub>2</sub> - 1–4). Mukro (šiljak) je veoma kratak (Tabla C<sub>2</sub> - 4).

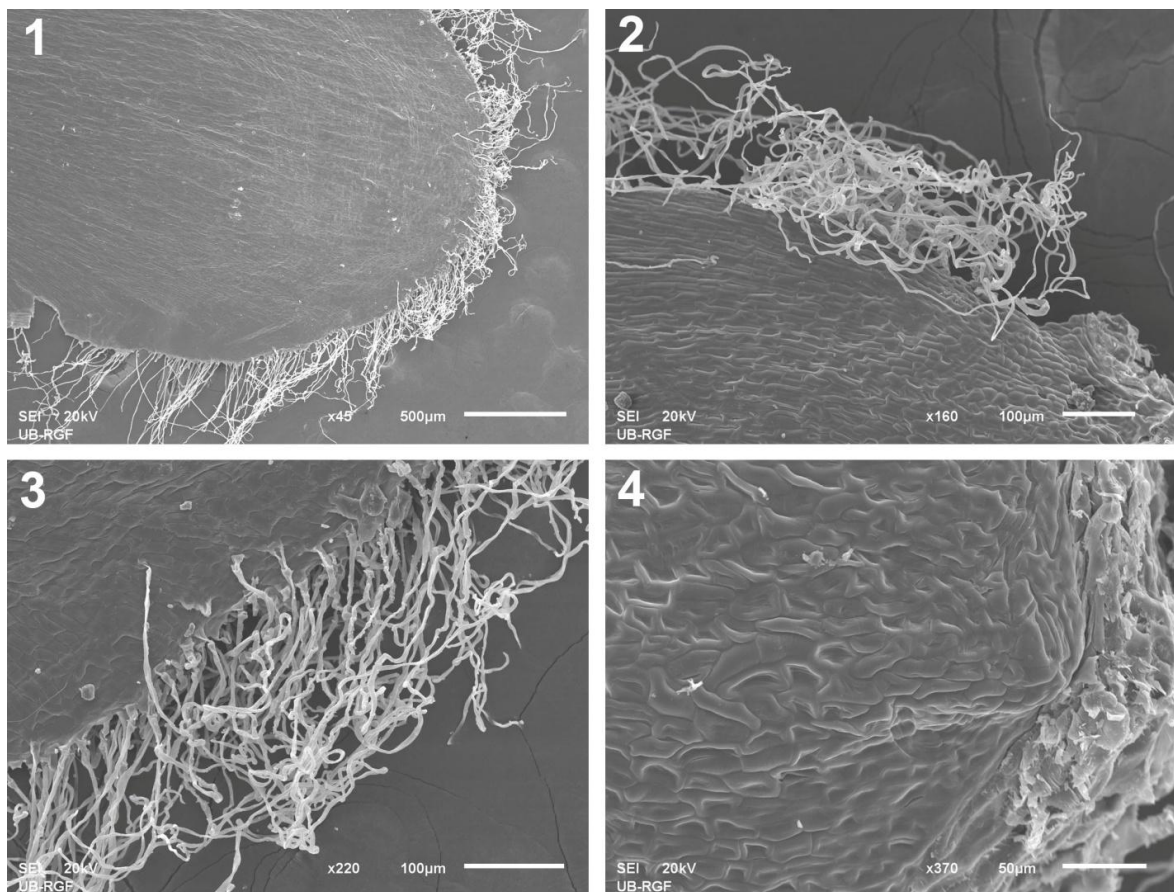


Tabla C<sub>2</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *A. exsul*. 1 Jajasto - lanceolatna do objajasta involukralna brakteja. 2 Mrežasto - naborana površina brakteje sa voskom. 3 Nežlezdane trihrome na ivici i na vrhu brakteje. 4 Veoma kratak mukro.



Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *A. elegans* prikazane su na Tabli C<sub>3</sub>. Srednja involukralna brakteja je kožasto - opnasta sa nežlezdanim trihomama koje su raspoređene po ivicama i na vrhu brakteje (Tabla C<sub>3</sub> - 1-2). Na površini se mogu uočiti uvučene stome (Tabla C<sub>3</sub> - 3). Površina je mrežasto-naborana i na površini je prisutan vosak (Tabla C<sub>3</sub> - 1-3). Mukro (šiljak) je duguljasto zaobljen (Tabla C<sub>3</sub> - 2).

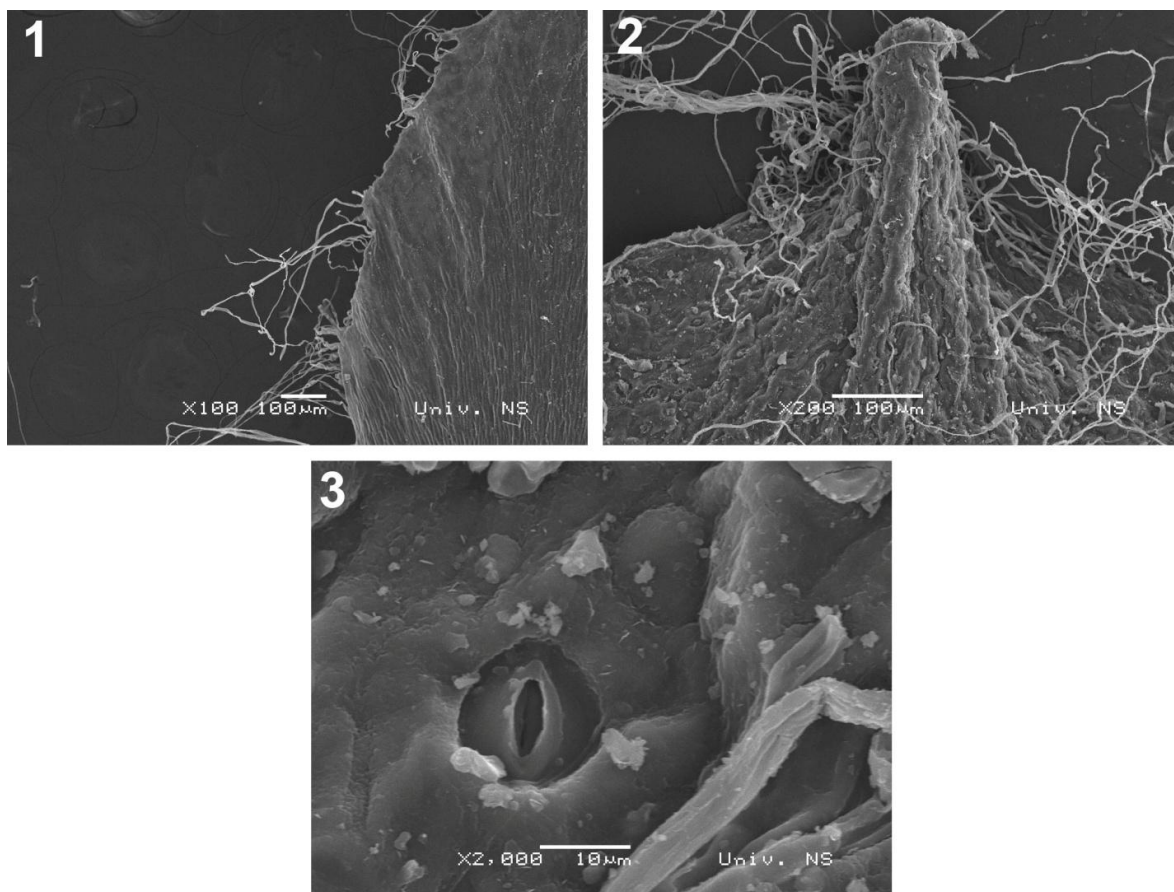


Tabla C<sub>3</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *A. elegans*. 1 Nežlezdane trihome na ivici brakteje i na vrhu. 2 Duguljasto zaobljen mukro. Mrežasto - naborana površina brakteje sa voskom. 3 Uvučena stoma i vosak na površini



Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* prikazane su na Tabli C<sub>4</sub>. Srednja involukralna brakteja je kožasto - opnasta sa nežlezdanim trihomama koje su raspoređene po ivicama i na vrhu brakteje (Tabla C<sub>4</sub> - 1–3). Na površini se mogu uočiti uvučene stome (Tabla C<sub>4</sub> - 4). . Površina je mrežasto-naborana i na površini je prisutan vosak (Tabla C<sub>4</sub> - 1–2). Mukro (šiljak) je kratak i zaobljen i jedva prelazi gornju ivicu brakteje (Tabla C<sub>4</sub> - 3).

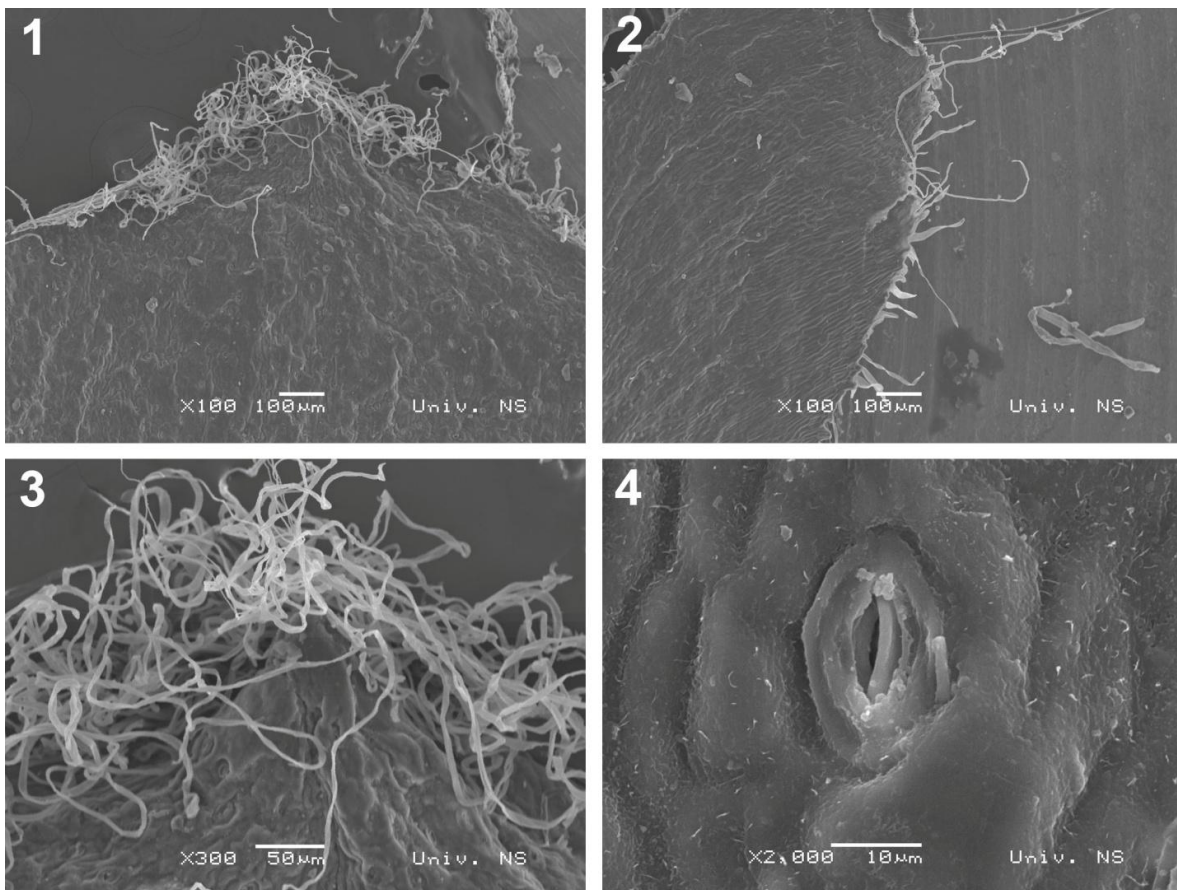


Tabla C<sub>4</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*. 1 Kožasto-opnasta brakteja sa nežlezdanim trihomama po ivici i na vrhu brakteje. 2 Mrežasto - naborana površina brakteje sa voskom. 3 Kratak i zaobljen mukro. 4 Uvučena stoma i vosak na površini.



Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *A. autariatus* subsp. *autariatus* prikazane su na Tabli C<sub>5</sub>. Srednja involukralna brakteja je duguljasta, bez trihoma (Tabla C<sub>5</sub> - 1–2). Površina involukralne brakteje je naborano-strijatna (Tabla C<sub>5</sub>) i prisutna je velika količina voska (Tabla C<sub>5</sub> - 4). Na površini se mogu uočiti uvučene stome (Tabla C<sub>5</sub> - 4). Mukro (šiljak) je tupo zaobljen i jedva prelazi gornju ivicu brakteje (Tabla C<sub>5</sub> - 1).

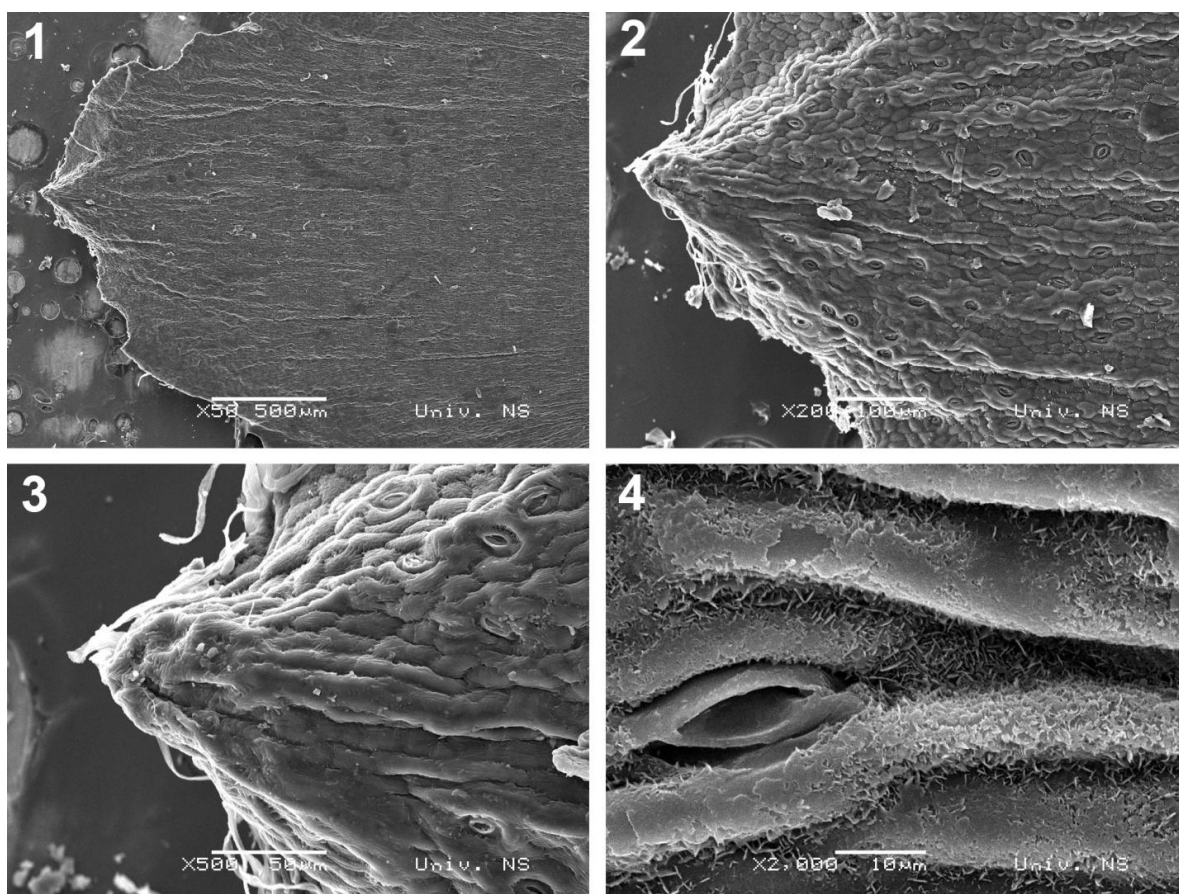


Tabla C<sub>5</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *A. autariatus* subsp. *autariatus*. 2, 3 Naborano - strijatna površina brakteje sa voskom. 1, 2, 3 Tupo zaobljen mukro.





Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *A. autariatus* subsp. *bertisceus* prikazane su na Tabli C<sub>6</sub>. Srednja involukralna brakteja je jajasta, bez trihoma (Tabla C<sub>6</sub> - 1). Površina involukralne brakteje je naborano - strijatna i prisutna je velika količina voska (Tabla C<sub>6</sub> - 2-3). Na površini se mogu uočiti uvučene stome (Tabla C<sub>6</sub> - 2-3). Mukro (šiljak) je duguljasto zaobljen i prelazi gornju ivicu brakteje (Tabla C<sub>6</sub> - 1-2).

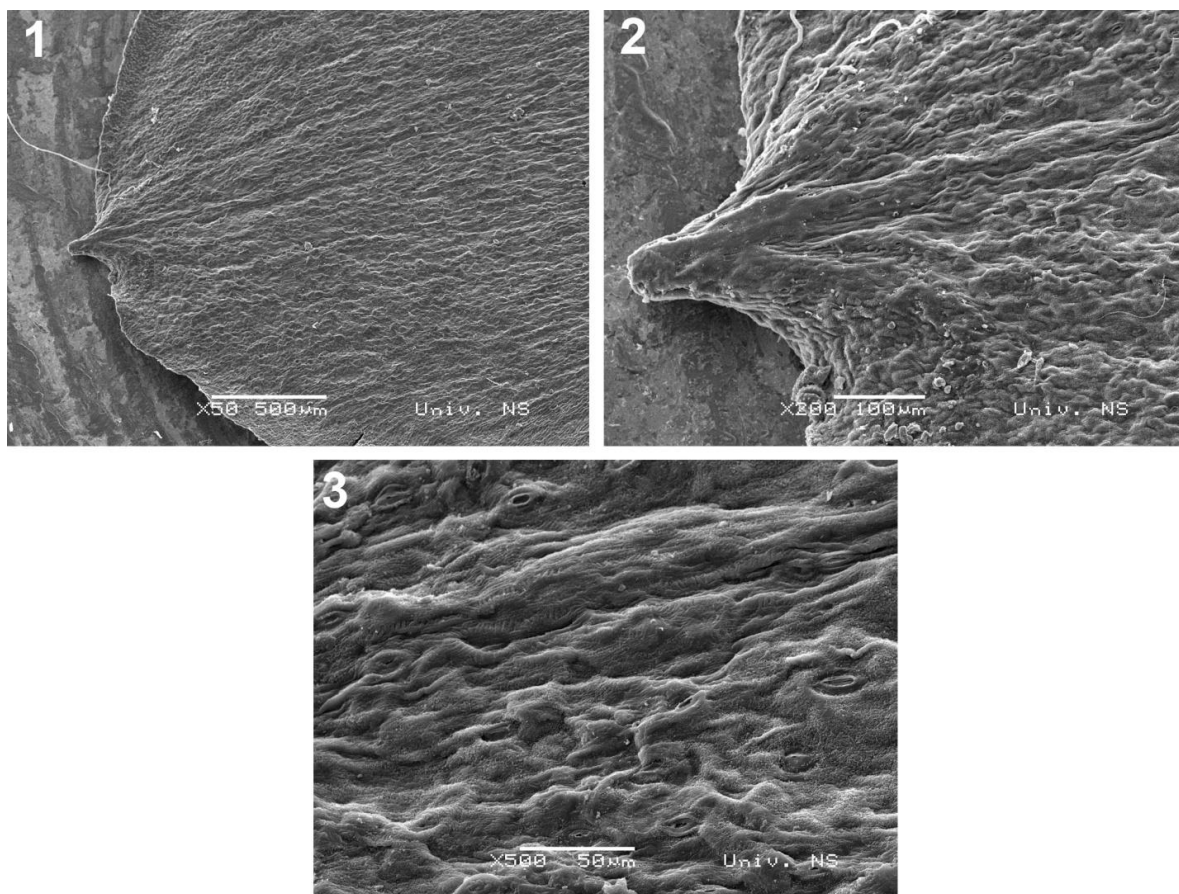


Tabla C<sub>6</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. 2, 3 Naborano - strijatna površina brakteje sa voskom. 1,2 Duguljasto zaobljen mukro.



Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* prikazane su na Tabli C<sub>7</sub>. Srednja involukralna brakteja je jajasta, bez trihoma (Tabla C<sub>7</sub> - 1). Površina involukralne brakteje je naborana sa izrazitim strijama i prisutna je velika količina voska (Tabla C<sub>7</sub> - 2-4). Na površini se mogu uočiti uvučene stome (Tabla C<sub>7</sub> - 2-4). Mukro (šiljak) je šiljat i prelazi gornju ivicu brakteje (Tabla C<sub>7</sub> - 1).

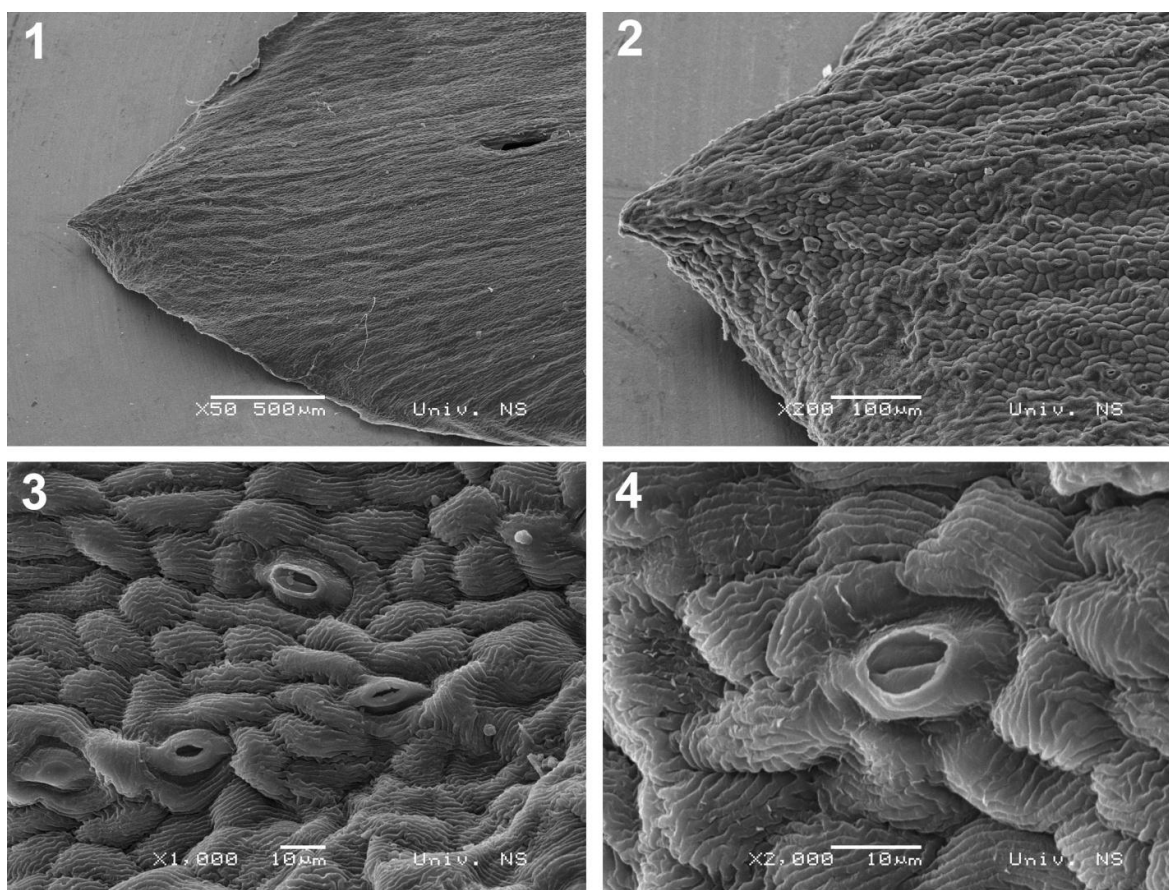
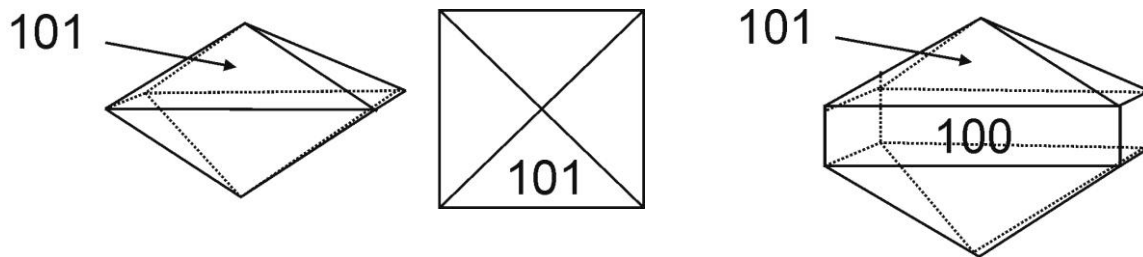


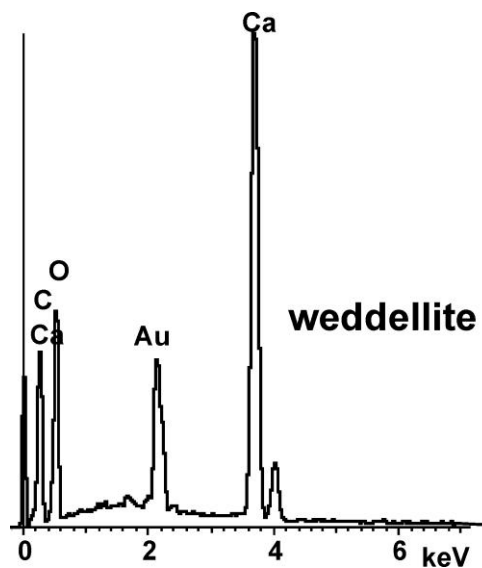
Tabla C<sub>7</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*. 1, 2, 3, 4 Naborana i izrazito strijatna površina sa voskom. 1, 2 Šiljat mukro.



Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *Ch. orientalis* prikazane su na Tabli C<sub>8</sub>. Srednja involukralna brakteja je kožasto - opnasta, jajasto - lanceolatna do objajasta, glatka, bez trihoma (Tabla C<sub>8</sub> - 1–2). Površina je mrežasta, prisutan je vosak (Tabla C<sub>8</sub> - 2). Mukro (šiljak) je veoma ušiljen sa dugačkim trnom (Tabla C<sub>8</sub> - 3). Na spoljašnjoj površini brakteje se nalazi veliki broj gusto pakovanih kristala (Tabla C<sub>8</sub> - 2, 4). Kristali su više manje iste veličine od 8 do 20µm (Tabla C<sub>8</sub> - 4). Javljaju se kao kombinacija oblika tetragonalne bipiramide [Milerov indeks (101)] i tetragonalne prizme [Milerov indeks (100)] (Tabla C<sub>8</sub> - 4–6). Na osnovu morfologije (Slika 19) i hemijskog sastava (Slika 20) ovi kristali odgovaraju vedelitu ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )



Slika 19. Kristali vedelita



Slika 20. EDS spektar vedelita

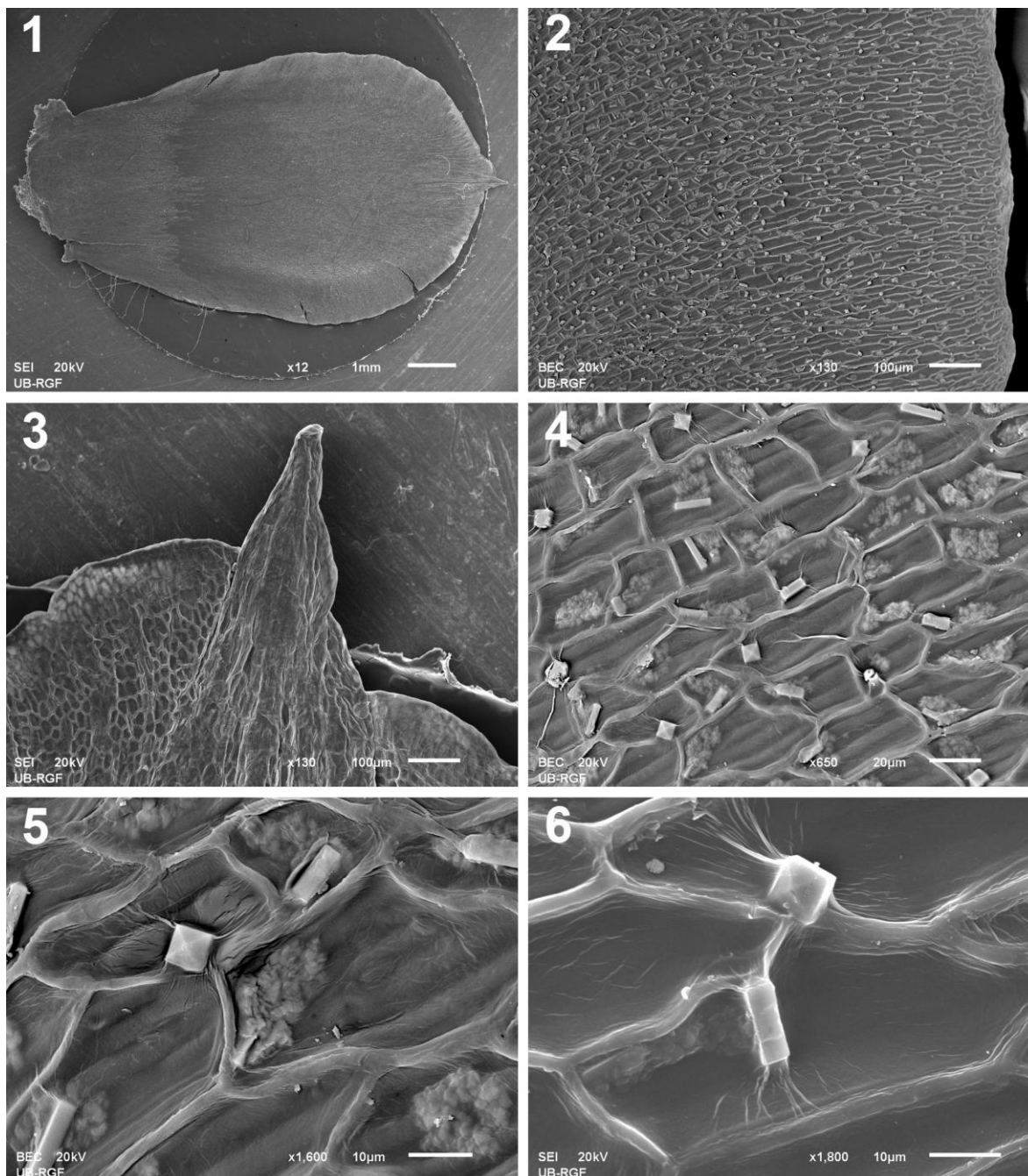


Tabla C<sub>8</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *Ch. orientalis*. 1 Kožasto - opnata, jajasto - lanceolatna brakteja. 2 Mrežasta površina brakteje. 3 Ušiljen mukro sa dugačkim trnom. 4 - 6 Kristali vedelita.



Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *X. inapertum* prikazane su na Tabli C<sub>9</sub>. Srednja involukralna brakteja je kožasto - opnasta, jajasto - lanceolatna do objajasta, glatka, bez trihoma (Tabla C<sub>9</sub>-1). Površina je mrežasta (Tabla C<sub>9</sub> - 2-3). Epidermske ćelije su gusto prekrivene kutikularnim voskom, koji se javlja u vidu pločica sa jednakim ili nejednakim ivicama (Tabla C<sub>9</sub> - 4, 6). Mukro (šiljak) je veoma ušiljen sa dugačkim trnom (Tabla C<sub>9</sub> - 1). Na spoljašnjoj površini brakteje se nalazi veliki broj gusto pakovanih kristala (Tabla C<sub>9</sub> - 4-6). Kristali su više manje iste veličine, od 8 do 20µm (Tabla C<sub>9</sub> - 4-6). Javljaju se u obliku tetragonalne bipiramide (Tabla C<sub>9</sub> - 4-6). Na osnovu hemijskog sastava i morfologije kristala ovi kristali odgovaraju vedelitu (CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O). Na unutrašnjoj površini brakteje se ne nalaze kristali (Tabla C<sub>9</sub> - 3).

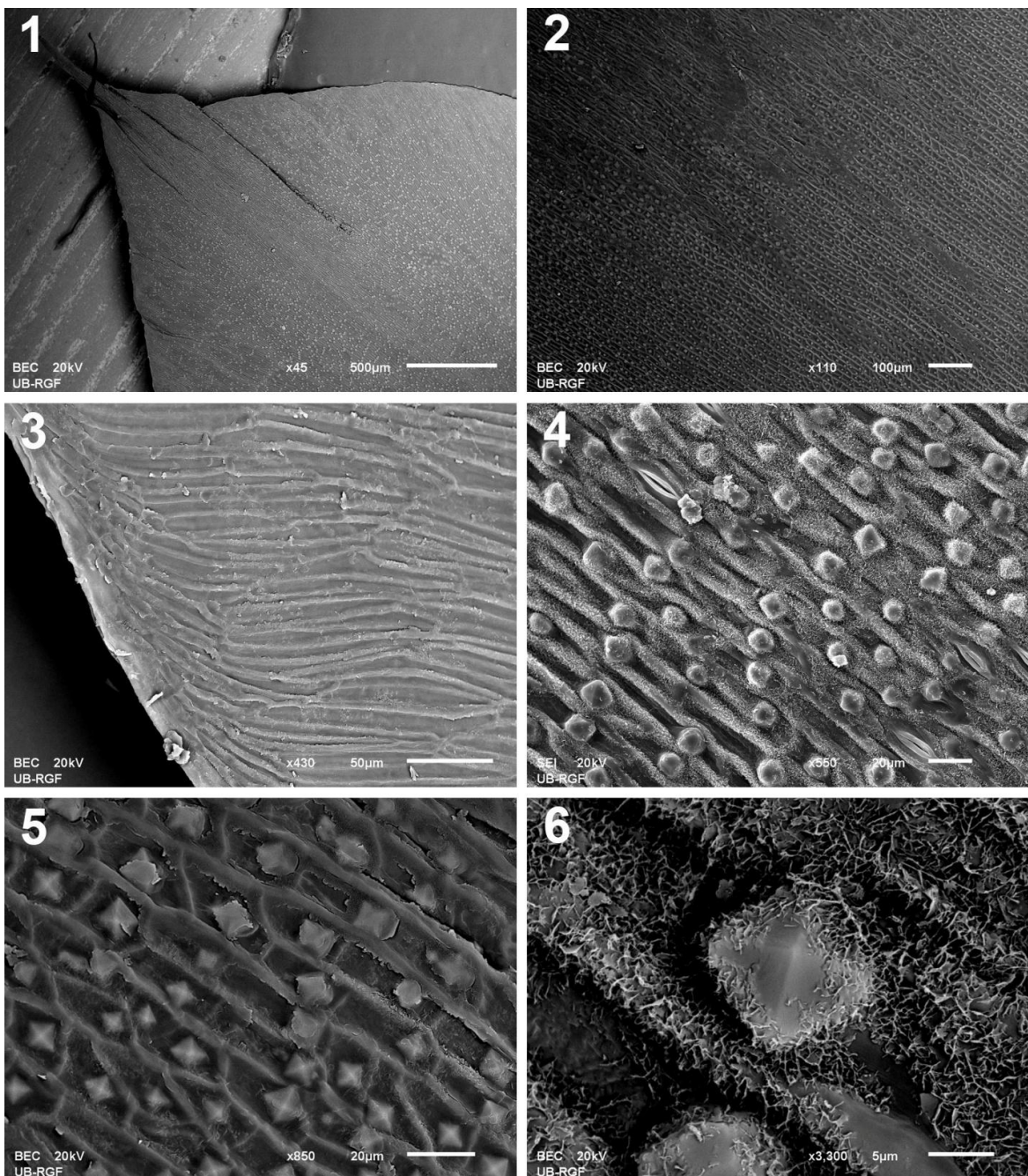


Tabla C<sub>9</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *X. inapertum*. 1 Kožasto - opnasta, jajasto - lanceolatna do objajasta brakteja. 2 Veoma ušiljen mukro sa dugačkim trnom. 3 Unutrašnja strana. 4 - 6 Spoljašnja strana sa kristalima vedelita. 5 Mrežasta površina brakteje. 6 Vosak na površini.



Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *X. annuum* prikazane su na Tabli C<sub>10</sub>. Srednja involukralna brakteja je kožasto-opnasta, jajasto-lanceolatna do objajasta, glatka, bez trihoma (Tabla C<sub>10</sub> - 1–2). Površina je mrežasta, prisutan je vosak (Tabla C<sub>10</sub> - 3–5). Mukro (šiljak) je veoma ušiljen sa dugačkim trnom (Tabla C<sub>10</sub> - 1–2). Na spoljašnjoj površini brakteje se nalazi veliki broj gusto pakovanih kristala (Tabla C<sub>10</sub> - 1–5). Kristali su više manje iste veličine, od 8 do 20µm (Tabla C<sub>10</sub> - 3–6). Javljaju se u obliku tetragonalne bipiramide (Tabla C<sub>10</sub> - 5–6). Na osnovu hemijskog sastava i morfologije ovi kristali odgovaraju vedelitu (CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O).

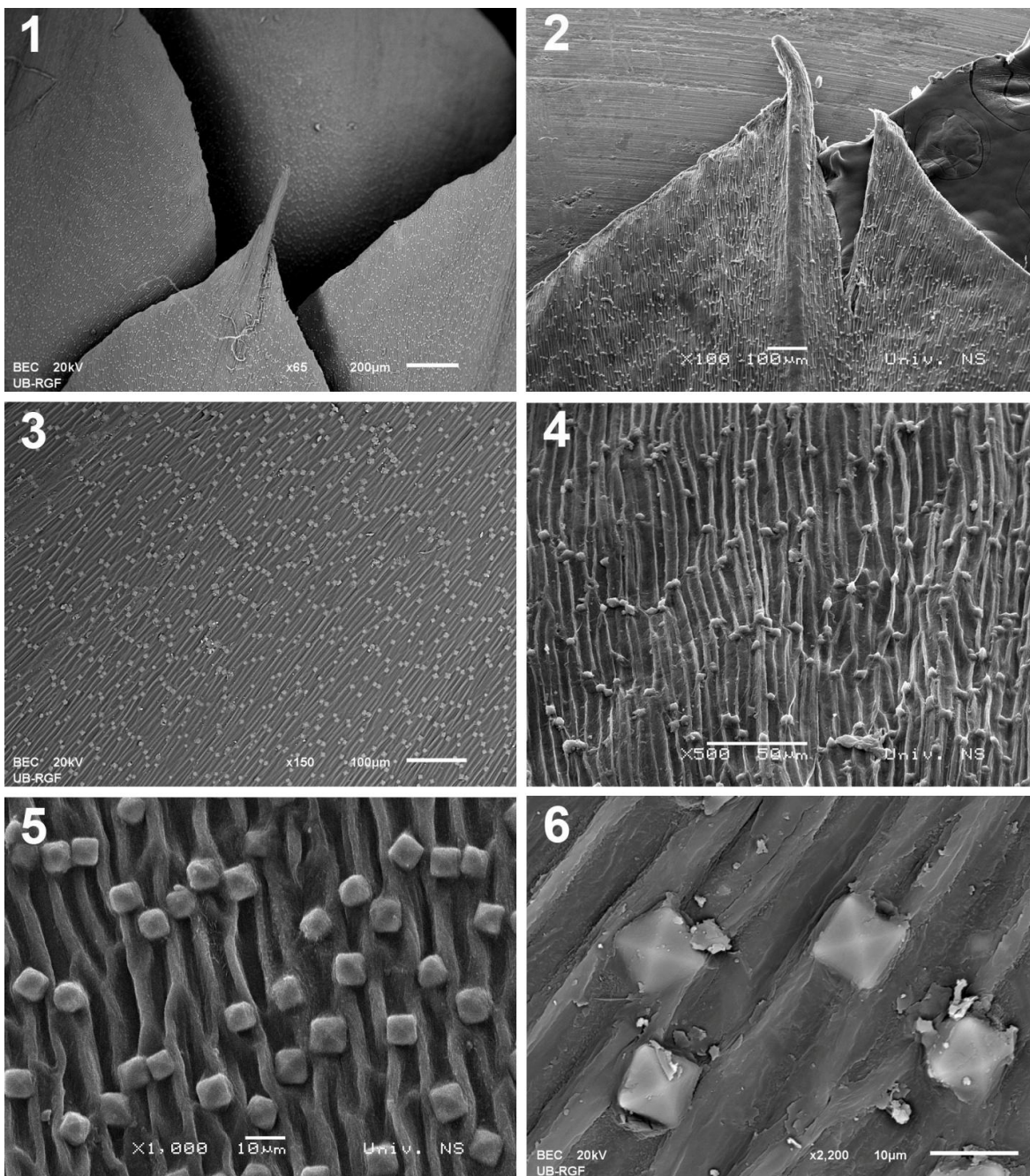


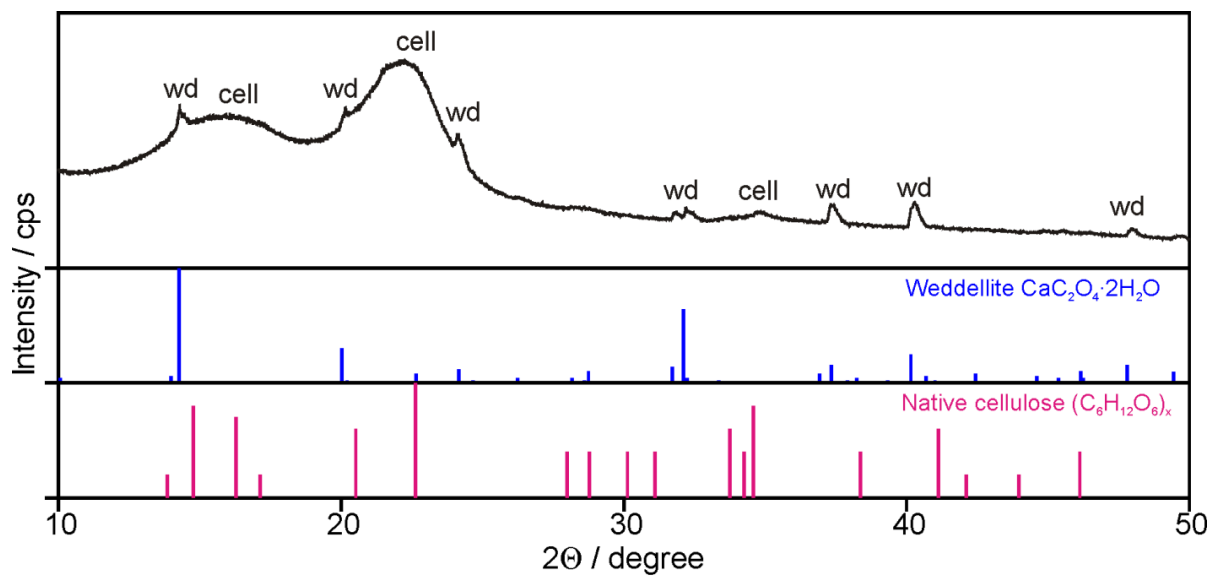
Tabla C<sub>10</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *X. annuum*. 1, 2 Kožasto - opnasta, jajasto - lanceolatna do objajasta cipsela. 2 Veoma ušiljen mukro sa dugačkim trnom. 4. Mrežasta površina brakteje. 3 - 6 Kristali vedelita.



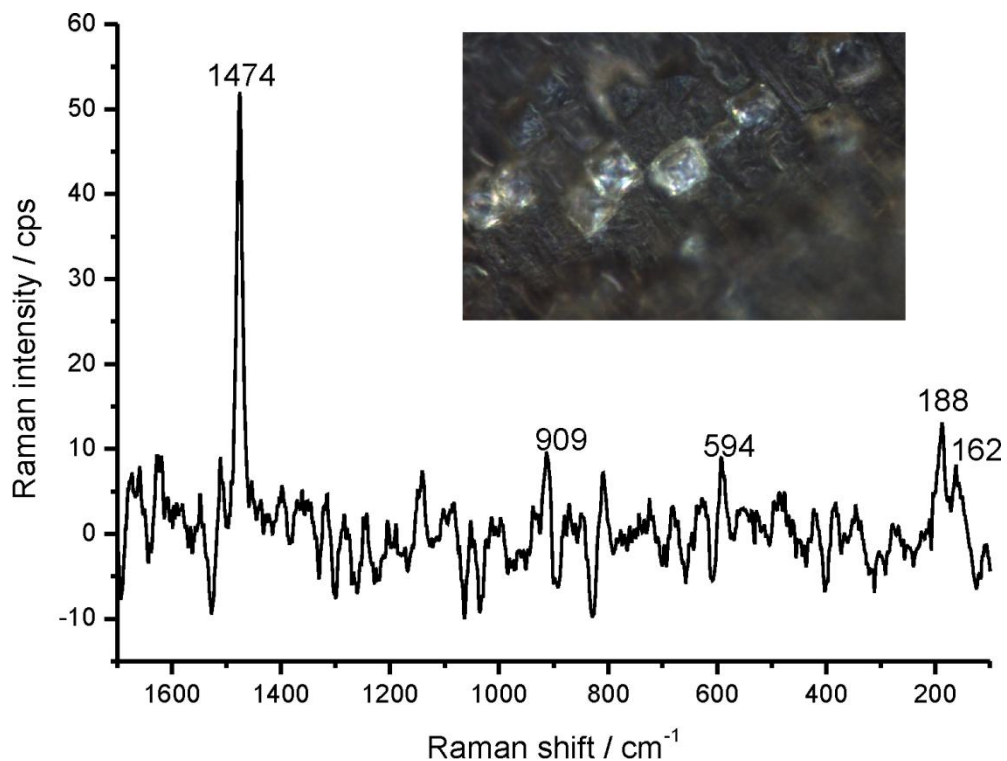


Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *X. cylindraceum* prikazane su na Tabli C<sub>11</sub>. Srednja involukralna brakteja je kožasto - opnasta, jajasto - lanceolatna do objajasta, glatka sa jasno uočljivim indumentumom u centralnom delu, sačinjenim od nežlezdanih i žlezdanih trihoma (Tabla C<sub>11</sub> - 1-5). Nežlezdane trihome se nalaze i na ivici brakteje (Tabla C<sub>11</sub> - 2). Žlezdane trihome su biserijatnog tipa (Tabla C<sub>11</sub> - 3, 5). Površina je mrežasta, prisutan je vosak (Tabla C<sub>11</sub> - 6). Mukro (šiljak) je kratak i zaobljen (Tabla C<sub>11</sub> - 1-2). Na spoljašnjoj površini brakteje se nalazi veliki broj gusto pakovanih kristala (Tabla C<sub>11</sub> - 2-4). Kristali se nalaze u gornjem delu kao i sa bočnih strana brakteje (Tabla C<sub>11</sub> - 2-3). U donjem delu brakteje nema kristala (Tabla C<sub>11</sub> - 6). Kristali su više manje iste veličine, od 8 do 20 μm (Tabla C<sub>11</sub> - 4). Javljaju se u obliku tetragonalne bipiramide (Tabla C<sub>11</sub> - 4, 7-8). Na osnovu hemijskog sastava i morfologije ovi kristali odgovaraju vedelitu (CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O).

XRPD i Mikro - Ramanova analiza involukralne brakteje *X. cylindraceum* potvrdile su prisustvo kristala vedelita. Pored vedelita (ICDD kartica 00-017-0541), na XRPD dijagramu (Slika 21), je jasno uočeno i prisustvo celuloze (ICDD kartica 00-003-0289 - prirodna celuloza). Prema Frost (2004), prisustvo trake istezanja ( $\nu$  (C- O)) na 1474 cm<sup>-1</sup> i drugih karakterističnih traka (909, 594, 188 and 163 cm<sup>-1</sup>) na Mikro-Ramanovom spektru (Slika 22) takođe ukazuju na prisustvo vedelita.



Slika 21. XRPD dijagram involukralne brakteje *Xeranthemum cylindraceum* sa referentnim XRD dijagramom vedelita (wd) - ICDD kartica 00-017-0541 i prirodne celuloze (cell) - ICDD kartica 00-003-0289.



Slika 22. Ramanov spektar (sa korekcijom pozadinskog signala) involukralne brakteje *Xeranthemum cylindraceum*.

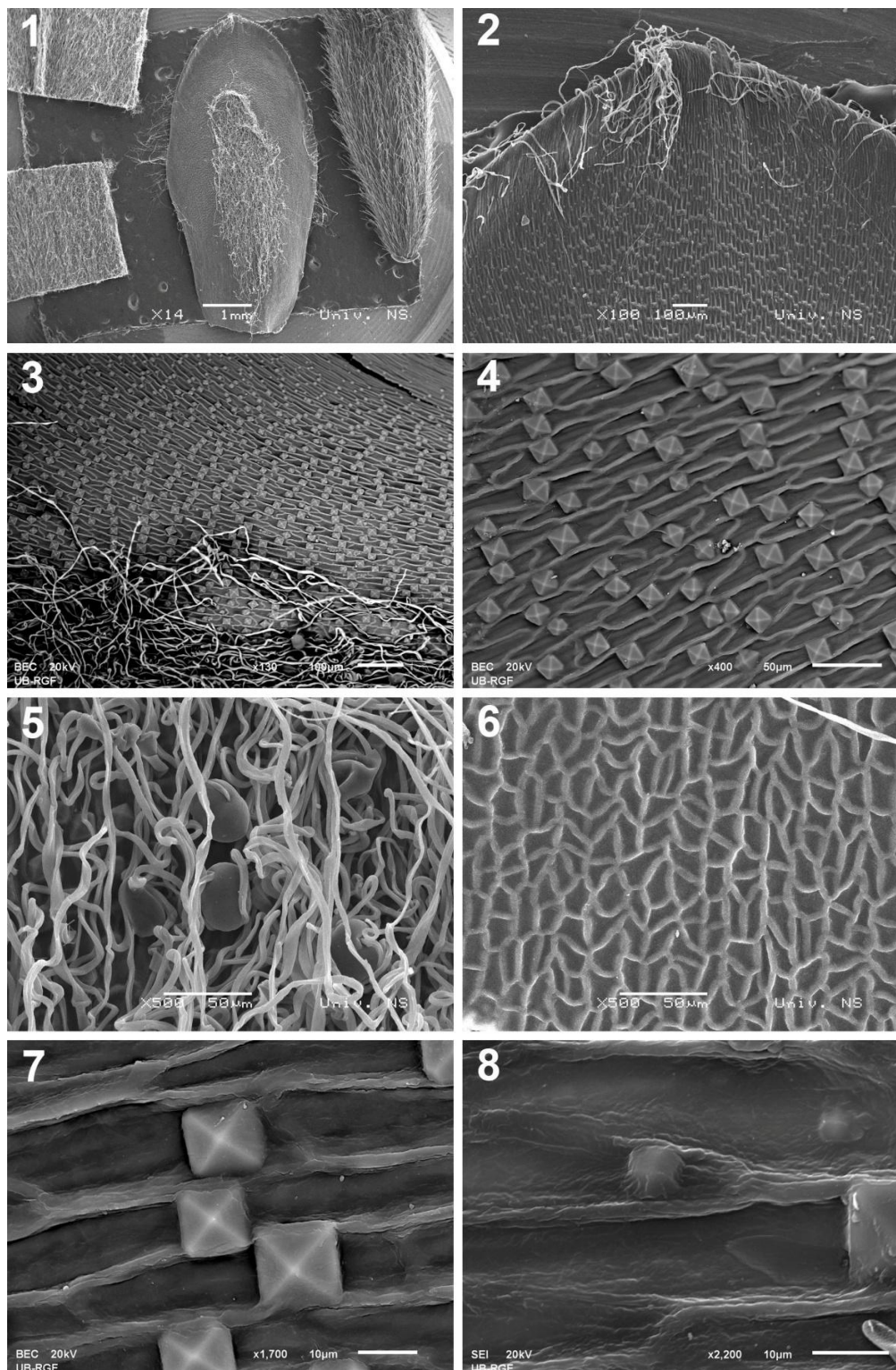


Tabla C<sub>11</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *X. cylindraceum*. 1 Kožasto - opnasta, jajasto - lanceolatna do objajasta brakteja. 2 Kratak i zaobljen mukro. 3, 5 Indumentum i glandularne trihome. 6 Donji deo brakteje bez kristala. Mrežasta površina brakteje. 3, 4, 7, 8 Kristali vedelita.



Mikrografije srednje involukralne brakteje (srednji listić involukruma) vrste *S. pungens* prikazane su na Tabli C<sub>12</sub>. Srednja involukralna brakteja je kožasto-opnasta, jajasta, glatka, sa jasno uočljivim indumentumom u centralnom delu, sačinjenom samo od nežlezdanih trihoma (Tabla C<sub>12</sub> - 1, 4). Indumentum je prileglo dlakav (Tabla C<sub>12</sub> - 4). Nežlezdane trihome se nalaze i na ivici brakteje (Tabla C<sub>12</sub> - 1). Površina je mrežasta, prisutan je vosak (Tabla C<sub>12</sub> - 3, 5). Mukro (šiljak) je dugačak, uspravan, oštar, šilast (Tabla C<sub>12</sub> - 1–2). Na spoljašnjoj površini brakteje se nalazi veliki broj gusto pakovanih kristala (Tabla C<sub>12</sub> - 4–6). Kristali se nalaze u gornjem delu kao i sa bočnih strana brakteje (Tabla C<sub>12</sub> - 4–5). U donjem delu brakteje nema kristala (Tabla C<sub>12</sub> - 3). Kristali su više manje iste veličine, od 8 do 20µm (Tabla C<sub>12</sub> - 5–6). Javljaju se u obliku tetragonalne bipiramide (Tabla C<sub>12</sub> - 5–6). Na osnovu hemijskog sastava i morfologije ovi kristali odgovaraju vedelitu (CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O).

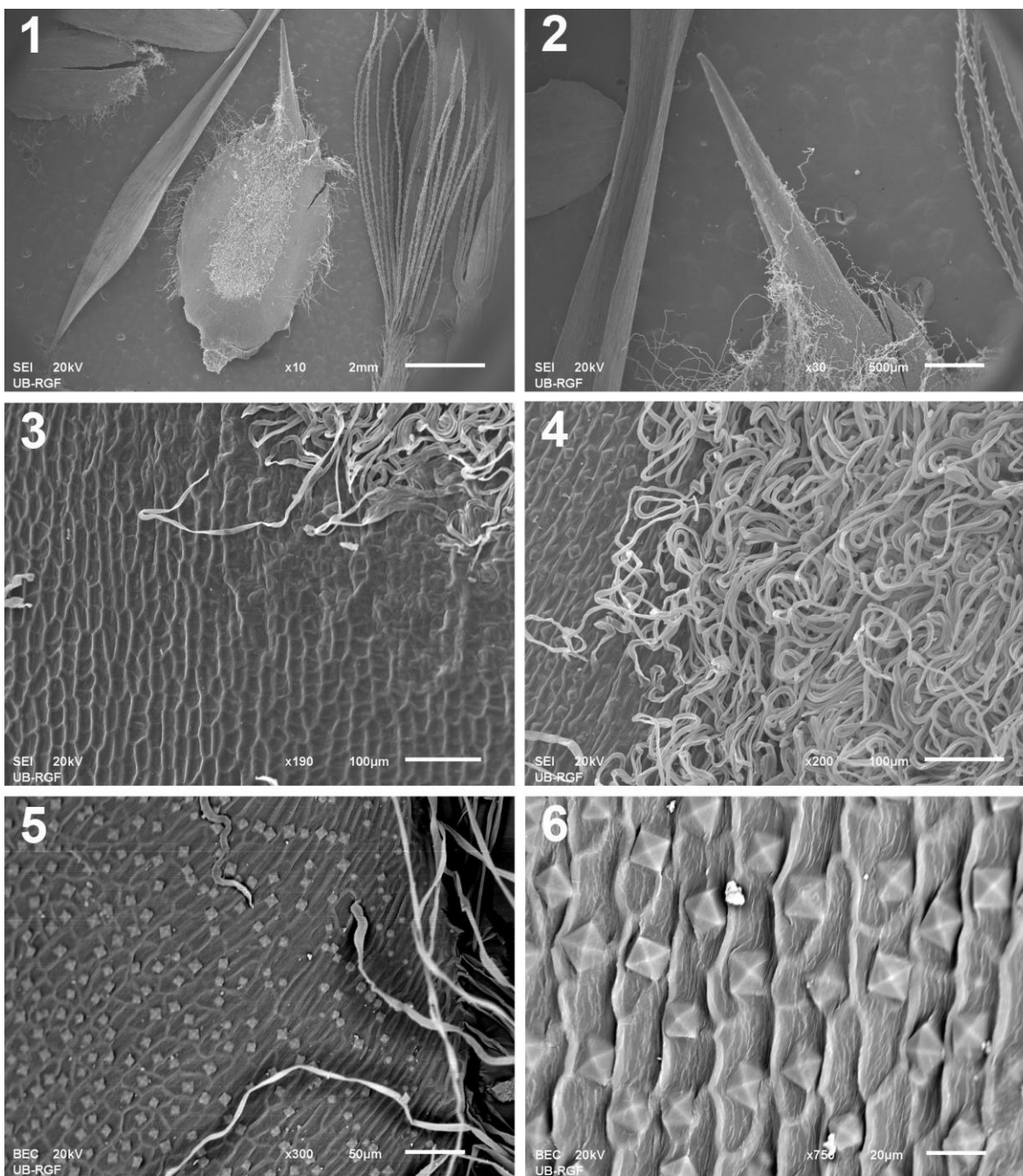
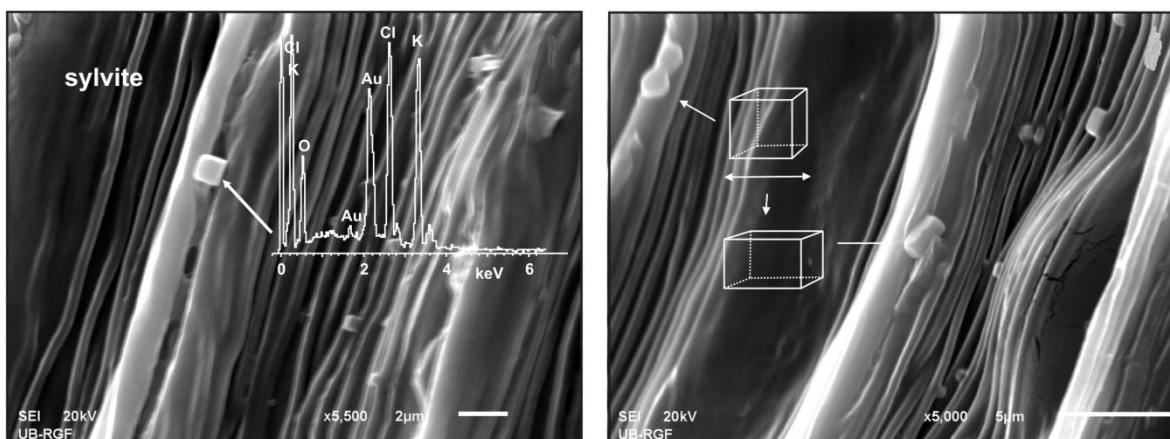


Tabla C<sub>12</sub>. Mikrografije srednje involukralne brakteje *S. pungens*. 1 Kožasto - opnasta, jajasta brakteja. 2 Dugačak, uspravan, oštar, šilast mukro. 3 Mrežasta površina brakteje. 4 Indumentum. 5, 6 Kristali vedelita.



#### 4.2.4. Mikromorfološka analiza cvetnog regiona

Mikrografije cvetnog regiona predstavnika *Xeranthemum* grupe su prikazani na Tabli D. Vrh stubica je dvodelan i sastoji se od dva kraka. Vrhovi grana stubića su kod *A. exsul* vrlo kratki, tupi, pravi i povezani (Tabla D1). Kod taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* i *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* vrhovi grana grana stubića su kratki, šiljati, razilazeći, povijeni prema spolja (Tabla D3, odnosno Tabla D6). Grane stubića su papilozne na spoljašnjoj strani (Tabla D1, 3–6). Spoljašnja površina kruničnog listića vrste *X. annuum* je mrežasta, bez kristala (tabla D7). Spoljašnja površina kruničnog listića *X. cylindraceum* je takođe mrežasta (Tabla D8). Na površini se mogu uočiti mali kristali identifikovani kao kristali silvita (KCl). Njihova veličina varira od 0.5 do 2  $\mu\text{m}$ , i javljaju se u formi pravilne kocke (Tabla D8). Neki kristali su delimično izduženi i zapravo predstavljaju deformisane kocke kristala (Slika 21). Zbog male količine i malih dimenzija kristala silvita na površini kruničnog listića vrste *X. cylindraceum*, prisustvo ovog kristala je određeno samo pomoću SEM - EDS analize (Slika 23).



Slika 23. EDS spektar silvita (levo) i kristal silvita (levo i desno)

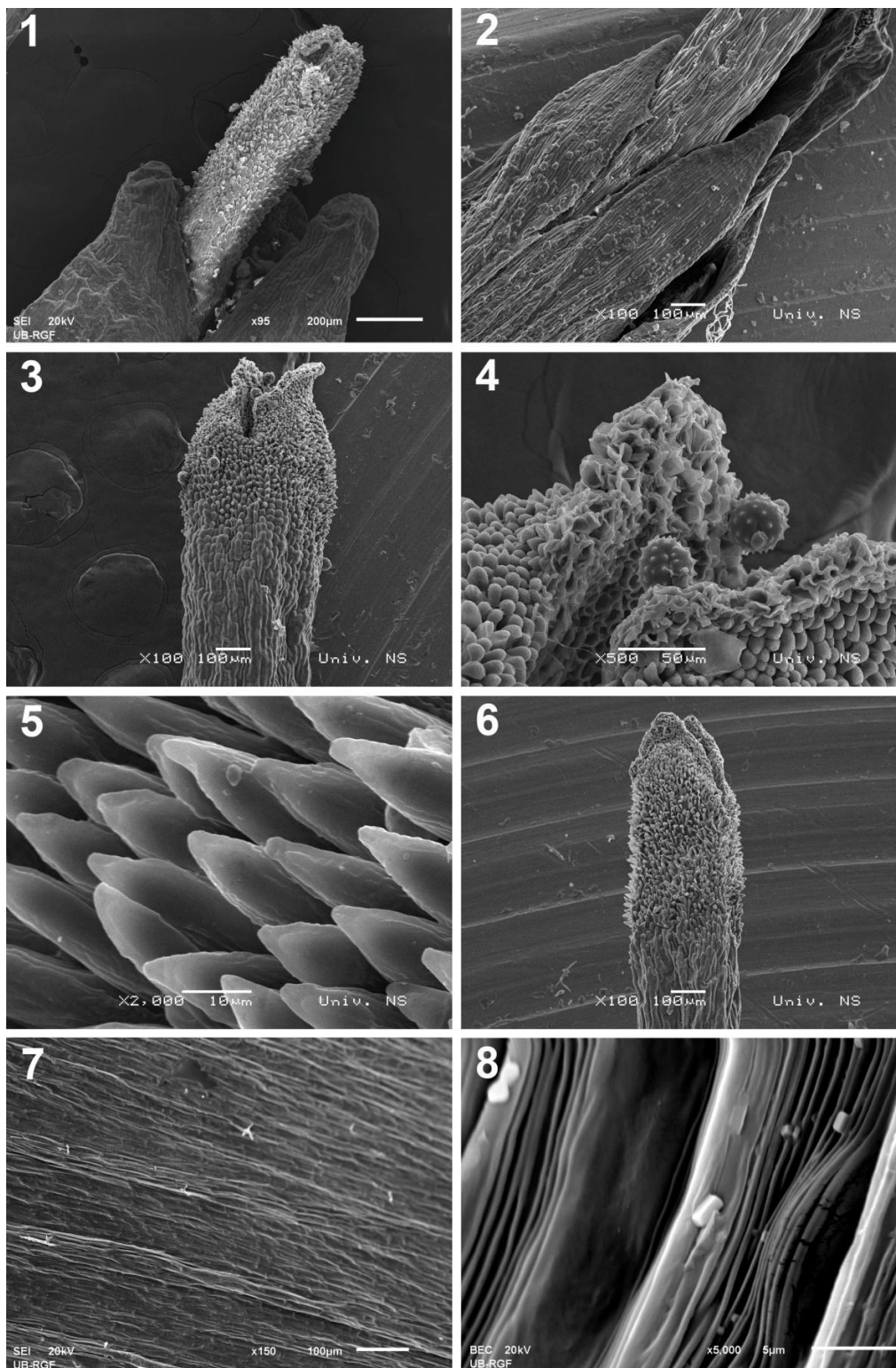


Tabla D. Mikrografije cvetnog regiona predstavnika *Xeranthemum* grupe. 1. *A. exsul*. 2, 3, 4, 5 *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. 6 *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*. 7 Površina krunice *X. annuum*. 8. Površina krunice *X. cylindraceum* sa kristalima silvita.



#### 4.2.5. Mikromorfološka analiza cipsela

Mikrografije cipsela predstavnika *Xeranthemum* grupe prikazane su na Tablama E<sub>1</sub>-E<sub>9</sub>.

Cipsele vrste *Sh. masarica* su homomorfne (Tabla E<sub>1</sub> - 1), braonkaste, prave, usko duguljasto - obkonične i sa više manje izraženim uzdužnim rebrima (Tabla E<sub>1</sub> - 1). Insercija cipsele je adaksijalna (Tabla E<sub>1</sub> - 2). Karpopodijum je asimetričan, formira potkovičastu kupu. Zidovi ćelija karpopodijuma su jedva vidljivi dajući gladak izgled karpopodijumu (Tabla E<sub>1</sub> - 2). Cipsele su potpuno gole, bez indumentuma (Tabla E<sub>1</sub> - 3). Površina cipsele je nepravilno talasasto mrežasta (Tabla E<sub>1</sub> - 3). Apikalna ivica perikarpa je redukovana, a kruna perikarpa potpuno odsustvuje (Tabla E<sub>1</sub> - 4). Papus je perasto - čekinjast, homomorfan, jednoredan, trajan, direktno se vezuje za gornju ivicu cipsele (Tabla E<sub>1</sub> - 5). Papus je izgrađen od brojnih perastih čekinja (Tabla E<sub>1</sub> - 4-6), donekle sraslih u osnovi (Tabla E<sub>1</sub> - 4). Boja papusa varira od slamnožute do braonkaste.



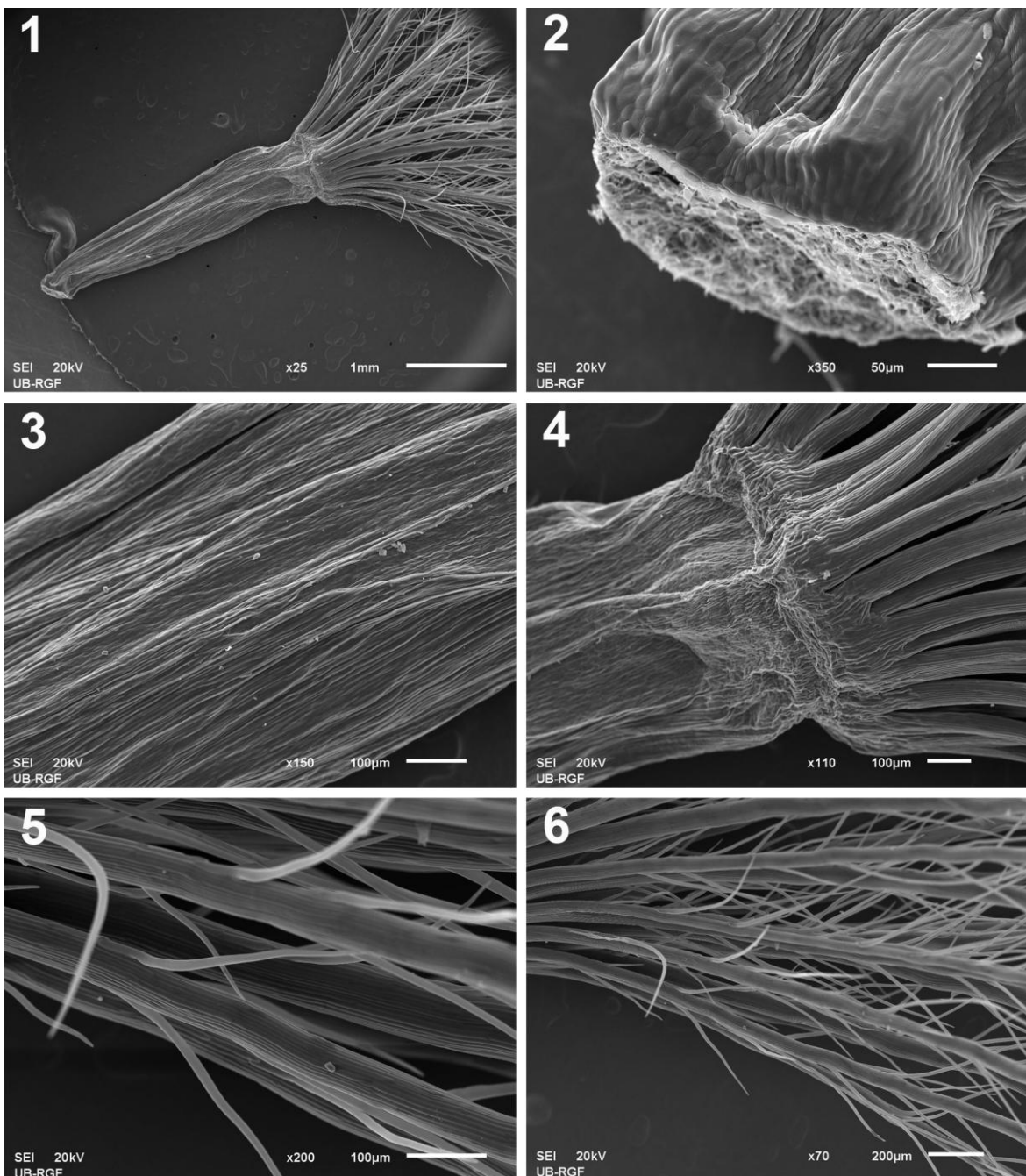


Tabla E<sub>1</sub>. Mikrografije cipsele *Sh. masarica*. 1 Cipsela. 2 Karpopodijum. 3 Nepravilno talasasto mrežasta površina cipsele. 4 Insercija papusa. 5, 6 Perasto - čekinjast papus.



Cipsele vrste *A. exsul* su dimorfne (Tabla E<sub>2</sub> - 1). Spoljašnja cipsela, koja nastaje od obodnih cvetova, je žućkasto-braonkasta, svilasta, prava, dorzoventralno spljoštena i donekle okriljena (Tabla E<sub>2</sub> - 1, desno). Unutrašnja cipsela, koja nastaje od centralnih cvetova, je žućkasto-braonkasta, svilasta, usko duguljasto-valjkasta sa više manje izraženim uzdužnim rebrima (Tabla E<sub>2</sub> - 1, levo). Insercija obe cipsele je adaksijalna (Tabla E<sub>2</sub> - 2–3). Karpopodijum obe cipsele je asimetričan, formira potkovičastu kupu. Zidovi ćelija karpopodijuma su jedva vidljivi dajući gladak izgled karpopodijumu (Tabla E<sub>2</sub> - 2–3). Brojne izdužene, nežlezdane, dvojne trihome, koje su kratko viljuškasto deljene na vrhu, su prisutne po površini unutrašnje cipsele (Tabla E<sub>2</sub> - 1–2), dok su ove trihome sporadično prisutne po površini spoljašnje cipsele, više u centralnom delu i bliže vrhu (Tabla E<sub>2</sub> - 1- 3). Trihome imaju više manje jednake vrhove (Tabla E<sub>2</sub> - 2–3). Cipsele su bez žlezdanih trihoma na površini. Površina obe cipsele je nepravilno talasasto mrežasta (Tabla E<sub>2</sub> - 2–3). Apikalna ivica perikarpa je redukovana, a kruna perikarpna potpuno odsustvuje (Tabla E<sub>2</sub> - 1). Papus je bradato-osasto zašiljen, homomorfan, šilast, trajan, sa jednorednim, bazalno glatkim i apikalno bradatim čekinjama, koje su direktno vezane za gornju ivicu cipsele (Tabla E<sub>2</sub> - 1). Unutrašnja cipsela poseduje mnogo više čekinja nego spoljašnja cipsela (Tabla E<sub>2</sub> - 1), dok čekinje spoljašnje cipsele poseduju mnogo više pinula po površini (Tabla E<sub>2</sub> - 4–5). Boja papusa varira od žućkaste do bele.

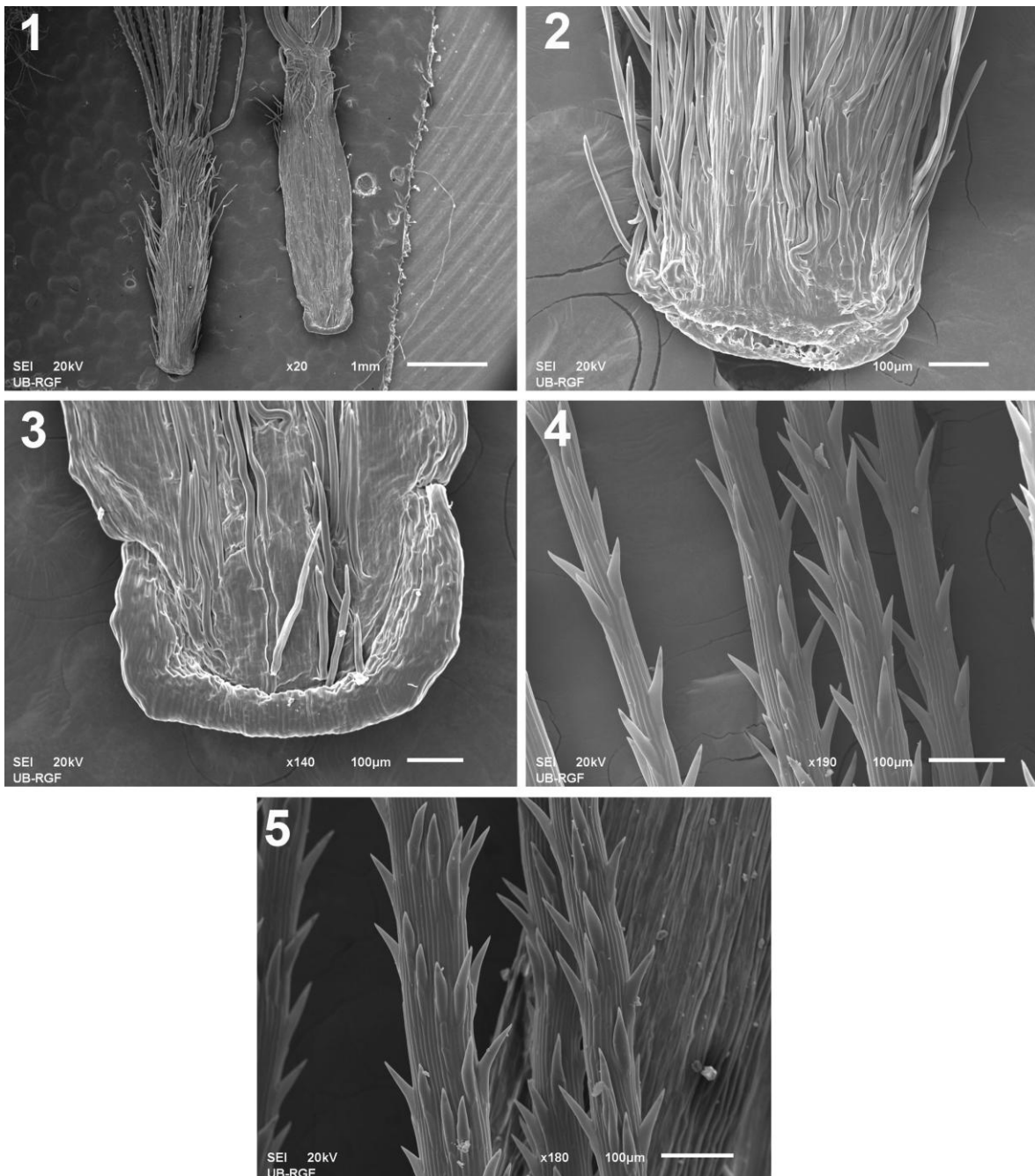


Tabla E<sub>2</sub>. Mikrografije cipsele *A. exsul*. 1 Unutrašnja (levo) i spoljašnja (desno) cipsele. 2 Karpopodijum. 3 Karpopodijum spoljašnje cipsele. 2 i 3 Nepravilno talasasto retikulatna površina cipsele. 4 Čekinjne unutrašnje cipsele. 5 Čekinjne spoljašnje cipsele.



Vrsta *A. elegans* poseduje dimorfne cipsele. Unutrašnja cipsela, koja nastaje od centralnih cvetova, je žućkasto-braonkasta, svilasta, usko duguljasto-valjkasta sa više manje izraženim uzdužnim rebrima (Tabla E<sub>3</sub> - 1). Inercija cipsele je adaksijalna (Tabla E<sub>3</sub> - 2). Karpopodijum je asimetričan, formira potkovičastu kupu. Zidovi ćelija karpopodijuma su jedva vidljivi dajući gladak izgled karpopodijumu (Tabla E<sub>3</sub> - 2). Izdužene, nežlezdane, dvojne trihome, koje su kratko viljuškasto deljene na vrhu sporadično su prisutne po površini cipsele (Tabla E<sub>3</sub> - 2, 5). Trihome imaju više manje jednake vrhove (Tabla E<sub>3</sub> - 3–4). Cipsele su bez žlezdanih trihoma na površini. Površina cipsele je naborano - mrežasta. Apikalna ivica perikarpa je redukovana, a kruna perikarpna potpuno odsustvuje (Tabla E<sub>3</sub> - 1). Papus je bradato-osasto zašiljen, homomorfan, šilast, trajan, sa jednorednim, bazalno glatkim i apikalno bradatim čekinjama u dva reda, koje su direktno vezane za gornju ivicu cipsele (Tabla E<sub>3</sub> - 1, 6–7). Na čekinjama se uočavaju sporadično raspoređene pinule (Tabla E<sub>3</sub> - 8). Boja papusa varira od žućkaste do bele. U centralnom delu gornjeg dela cipsele uočen je trag baze stubića, sačinjen od parenhimskog i provodnog tkiva, okružen ostacima nektarija, koje su blago uočljive (Tabla E<sub>3</sub> - 7). Nektarije su okruglog ili blago petougaoonog oblika (Tabla E<sub>3</sub> - 7).

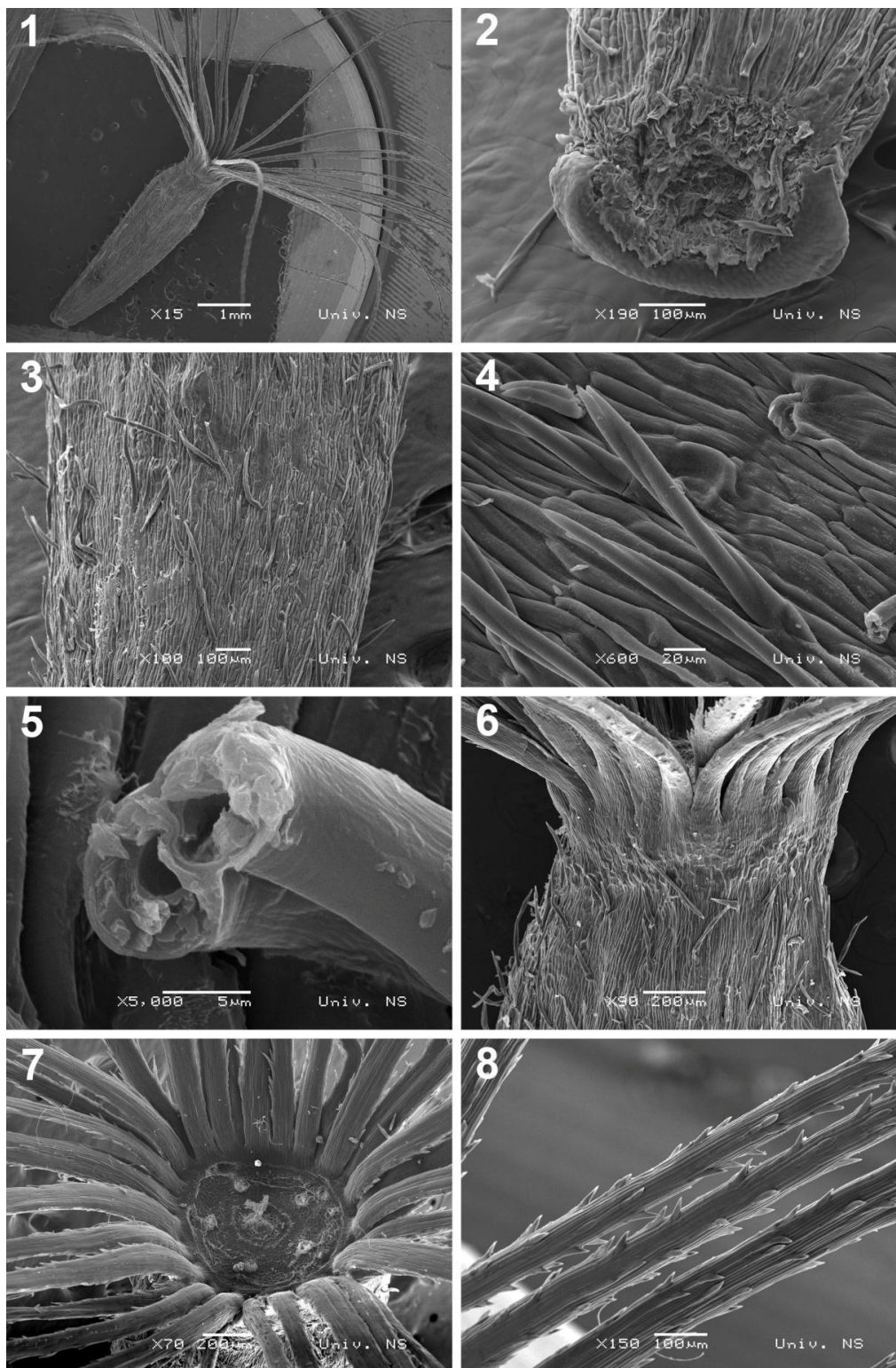


Tabla E<sub>3</sub>. Mikrografije unutrašnje cipsele *A. elegans*. 1 Unutrašnja cipsela. 2 Karpodijum. 3 Naborano - mrežasta površina cipsele. 4, 5 Dvojne trihome. 6 Insercija papusa. 7, 8 Bradato-osasto zašiljeni papus sa čekinjama u dva reda. Ostaci nektarija.



Spoljašnja cipsela vrste *A. elegans*, koja nastaje od obodnih cvetova, je žućkasto-braonkasta, skoro gola, usko duguljasto-valjkasta sa više manje izraženim uzdužnim rebrima, okriljena (Tabla E<sub>4</sub> - 1). Insercija cipsele je adaksijalna (Tabla E<sub>4</sub> - 2). Karpopodijum je asimetričan, formira potkovičastu kupu. Zidovi ćelija karpopodijuma su jedva vidljivi dajući gladak izgled karpopodijumu (Tabla E<sub>4</sub> - 2). Vrlo kratke, biserijatne, nežlezdane, dvojne trihome, koje su kratko viljuškasto deljene na vrhu, retko su prisutne po površini cipsele (Tabla E<sub>4</sub> - 3–4). Trihome imaju više manje jednake vrhove (Tabla E<sub>4</sub> - 4–5). Na okriljenom delu cipsele nisu prisutne trihome (Tabla E<sub>4</sub> - 5). Cipsele su bez žlezdanih trihoma na površini. Površina cipsele je naborano - mrežasta (Tabla E<sub>4</sub> - 4). Apikalna ivica perikarpa je redukovana, a kruna perikarpna potpuno odsustvuje (Tabla E<sub>4</sub> - 6). Papus je bradato-osasto zašiljen, homomorfan, šilast, trajan, sa jednorednim, bazalno glatkim i apikalno barbelatnim čekinjama u jednom redu, koje su direktno vezane za gornju ivicu cipsele (Tabla E<sub>4</sub> - 6–8). Na čekinjama se uočavaju sporadično raspoređene pinule sa spoljašnje strane (Tabla E<sub>4</sub> - 6–8). Sa unutrašnje strane čekinje nisu prisutne pinule (Tabla E<sub>4</sub> - 6–8). Boja papusa varira od žućkaste do bele.

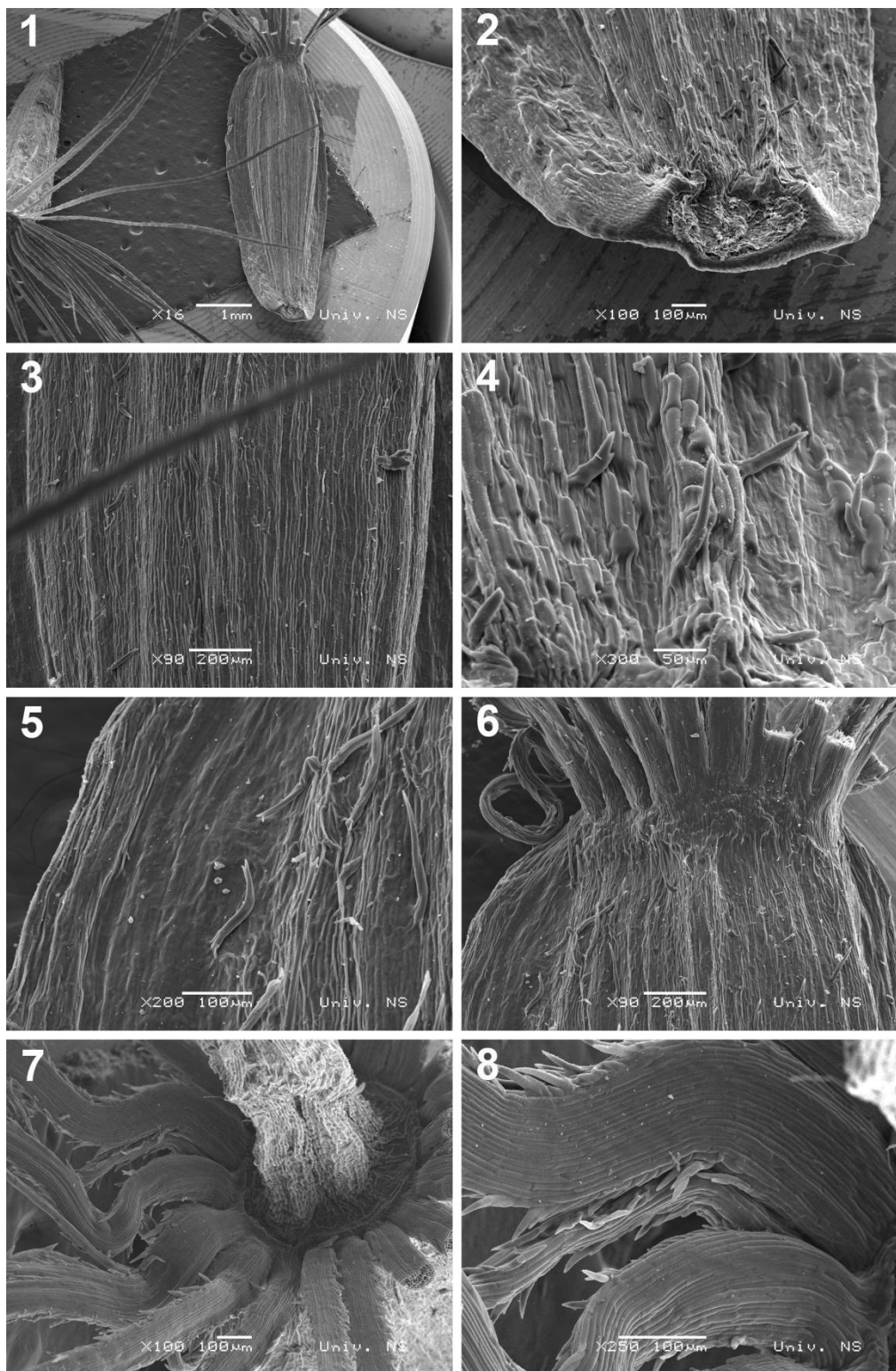


Tabla E4. Mikrografije spoljašnje cipsele *A. elegans*. 1 Cipsela. 2 Karpopodijum. 3, 4 Naborano - mrežasta površina cipsele i kratke dvojne trihome. 5 Okriljeni deo cipsele. 6 Inscerija papusa. 7, 8 Bradato-osasto zašiljeni papus sa čekinjama u jednom redu.



Iako vrsta *Ch. orientalis* poseduje dimorfne cipsele (Bremer 1994), bili smo u mogućnosti da istražimo jedino unutrašnje cipsele. Unutrašnja cipsela je obkonična, apikalno fino izbrazdana, delimično svilasta (bazalno rutava), sa više manje izraženim uzdužnim rebrima (Tabla E<sub>5</sub> - 1). Boja varira od boje slonovače do žućkaste. Insercija cipsele je adaksijalna (Tabla E<sub>5</sub> - 2). Karpopodijum je asimetričan, formira potkovičastu kupu. Zidovi ćelija karpopodijuma su jedva vidljivi dajući gladak izgled karpopodijumu (Tabla E<sub>5</sub> - 2). Površina cipsele je papilozna (Tabla E<sub>5</sub> - 3). Papile su krupne, izrazito strijatne (Tabla E<sub>5</sub> - 4). Brojne izdužene, nežlezdane, dvojne trihome, koje su kratko viljuškasto deljene na vrhu, su prisutne u bazalnom i centralnom delu cipsele (Tabla E<sub>5</sub> - 1, 5). Trihome imaju više manje jednake vrhove (Tabla E<sub>5</sub> - 5). Cipsele su bez žlezdanih trihoma na površini. Apikalna ivica perikarpa je redukovana, a kruna perikarpna potpuno odsustvuje (Tabla E<sub>5</sub> - 1, 5). Papus je osasto-zašiljen, plevičasto ljuspast, homomorfan, jednoređan, trajan (Tabla E<sub>5</sub> - 1), direktno vezan za gornju ivicu cipsele (Tabla E<sub>5</sub> - 6). Papus je sačinjen od širokih, kožasto-opnastih, šilastih ljuspi, više manje jednakih dužina i donekle sraslih u osnovi (Tabla E<sub>5</sub> - 1, 6). Ljuspe su sitno testeraste (Tabla E<sub>5</sub> - 7), bazalno glatke, sa malim pinulama koje nastaju u uskom centralnom delu i nastavljaju se do vrha, apikalno sa pinulama (Tabla E<sub>5</sub> - 7–8). Ljuspe imaju male pinule po spoljašnjoj površini (Tabla E<sub>5</sub> - 7–8). Boja papusa je slamasta.



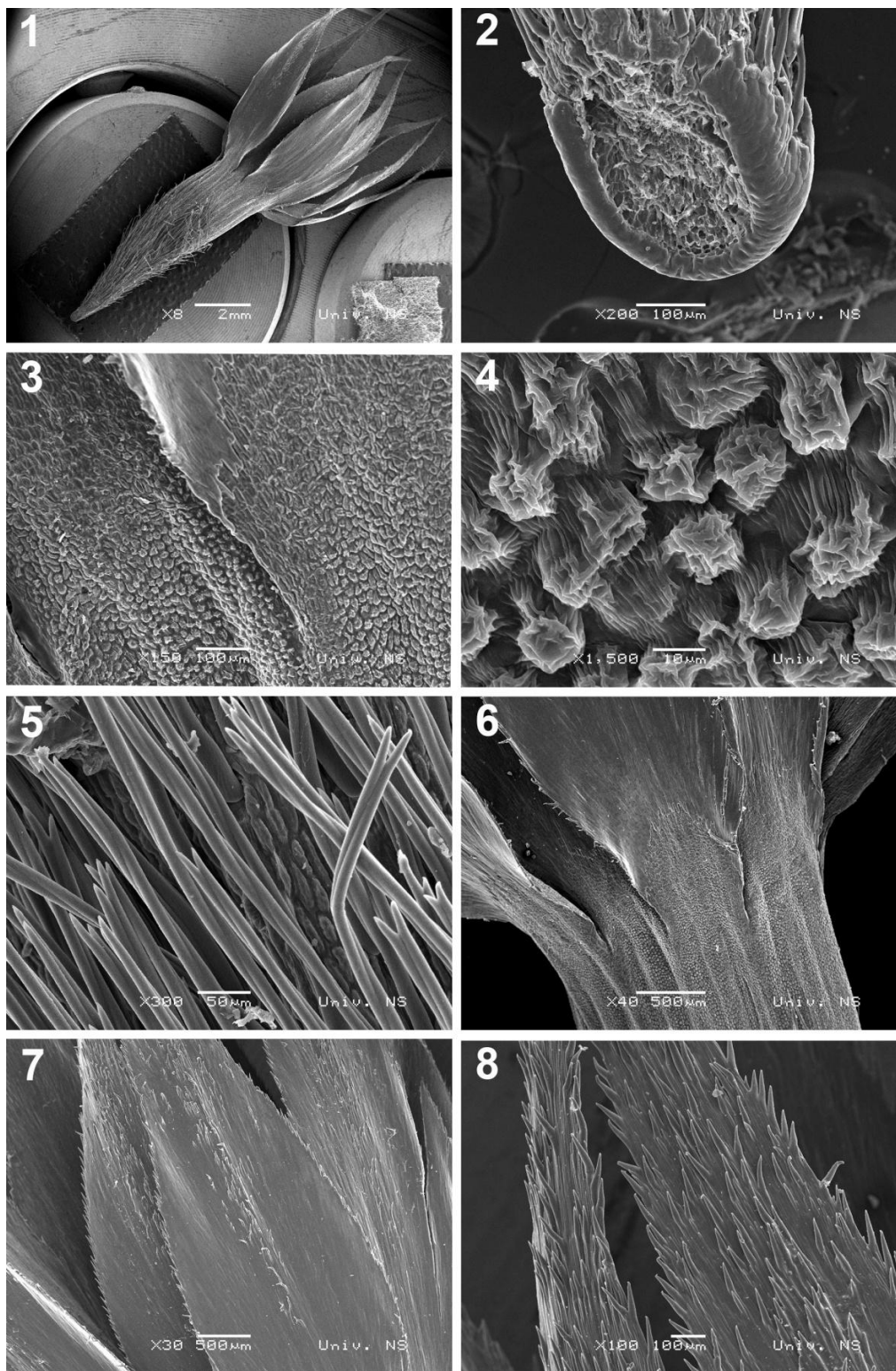


Tabla E<sub>5</sub>. Mikrografije unutrašnje cipsele *Ch. orientalis*. 1 cipsela. 2 Karpopodijum. 3 Papilozno-strijatna površina cipsele. 4 Papile sa strijama. 5 Dvojne trihome. 6 Insercija papusa. 7, 8 Osasto-zašiljen plevičasto ljušpast papus.



Cipsele vrste *X. inapertum* su homomorfne (Tabla E<sub>6</sub> - 1), žućkasto - braonkaste, svilaste, prave, više manje bočno spljoštene, usko obkonične do objajaste, sa više manje izraženim uzdužnim rebrima (Tabla E<sub>6</sub> - 2). Insercija cipsele je adaksijalna (Tabla E<sub>6</sub> - 2-3). Karpopodijum je asimetričan, formira potkovičastu kupu (Tabla E<sub>6</sub> - 2-3). Zidovi ćelija karpopodijuma su jedva vidljivi dajući gladak izgled karpopodijumu (Tabla E<sub>6</sub> - 2-3). Površina cipsele je mrežasta (Tabla E<sub>6</sub> - 4). Brojne izdužene, nežlezdane, dvojne trihome, koje su kratko viljuškasto deljene na vrhu, su prisutne po celoj površini cipsele (Tabla E<sub>6</sub> - 4). Trihome imaju više manje jednake vrhove (Tabla E<sub>6</sub> - 2, 4). Cipsele su bez žlezdanih trihoma na površini. Apikalna ivica perikarpa je redukovana, a kruna perikarpna potpuno odsustvuje (Tabla E<sub>6</sub> - 1, 5). Pampus je osasto-zašiljen, plevičasto ljuspast, homomorfan, jednoredan, trajan (Tabla E<sub>6</sub> - 1, 5), direktno vezan za gornju ivicu cipsele (Tabla E<sub>6</sub> - 1, 5). Pampus je sačinjen od širokih, kožasto - opnastih, šilastih ljuspi, varijabilnih dužina i donekle sraslih u osnovi (Tabla E<sub>6</sub> - 1, 5). Ljuspe su sitno testeraste, bazalno hrapave, sa malim pinulama po celoj površini (Tabla E<sub>6</sub> - 5-7), i na vrhu (Tabla E<sub>6</sub> - 8). Boja pampusa je žućkasto - transparentna.

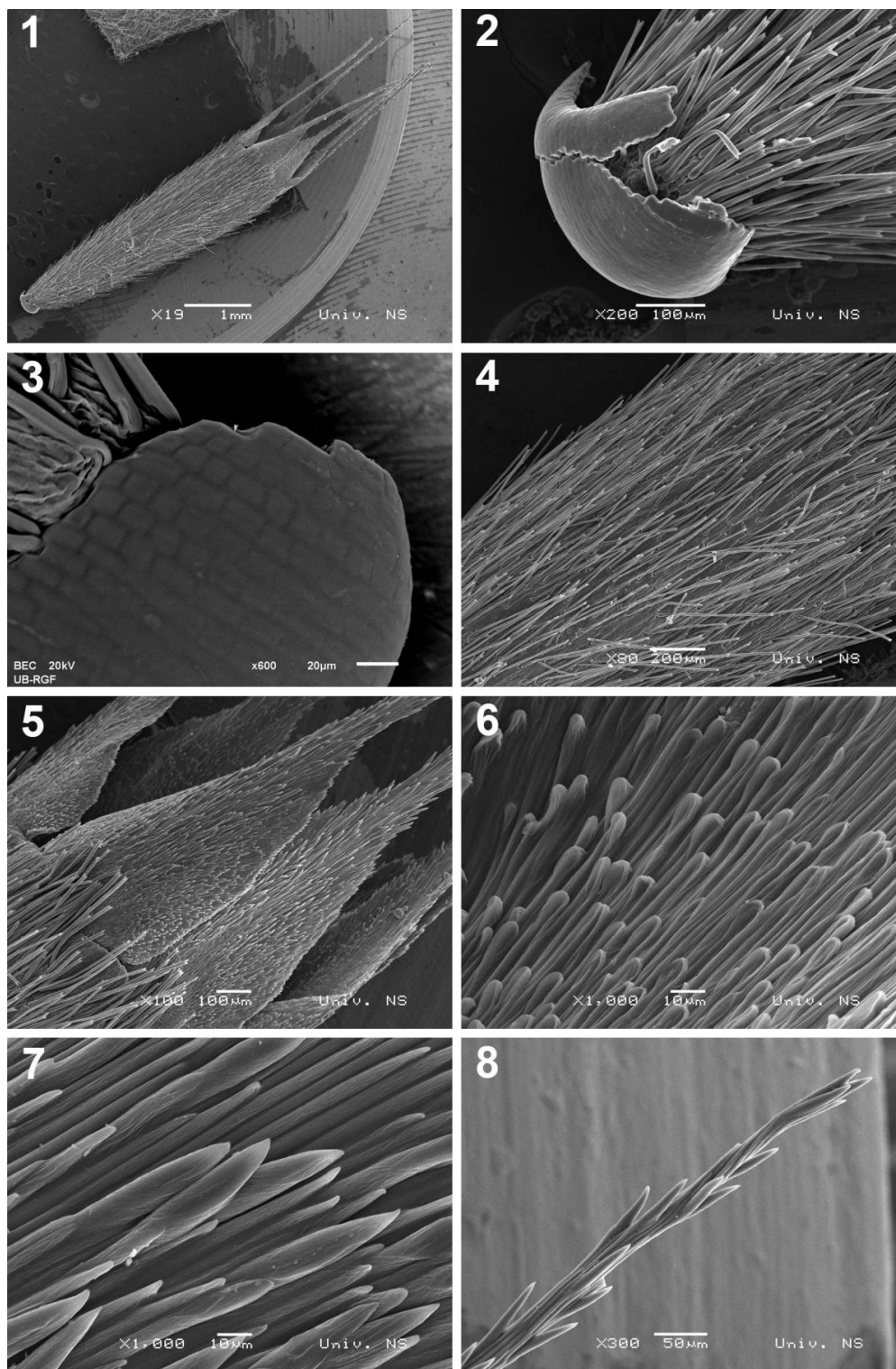


Tabla E<sub>6</sub>. Mikrografije cipsele *X. inapertum*. 1 Cipsela. 2, 3 Karpodijum. 4 Dvojne trihome po mrežastoj površini cipsele. 5 Insercija papusa. 6, 7 Površina ljspi papusa. 8 Vrh ljspe papusa.



Cipsele vrste *X. annuum* su homomorfne (Tabla E<sub>7</sub> - 1), braonkasta, svilaste, više manje prave ili blago savijene, više manje bočno spljoštene, usko obkonične do objajaste, sa više manje izraženim uzdužnim rebrima (Tabla E<sub>7</sub> - 1). Insercija cipsele je adaksijalna (Tabla E<sub>7</sub> - 2), Karpopodijum je asimetričan, formira potkovičastu kupu (Tabla E<sub>7</sub> - 2). Zidovi ćelija karpopodijuma su jedva vidljivi dajući gladak izgled karpopodijumu (Tabla E<sub>7</sub> - 2). Površina cipsele je mrežasta (Tabla E<sub>7</sub> - 2). Brojne izdužene, nežlezdane, dvojne trihome, koje su kratko viljuškasto deljene na vrhu, su prisutne po celoj površini cipsele (Tabla E<sub>7</sub> - 1-3). Trihome imaju više manje jednake vrhove (Tabla E<sub>7</sub> - 3). Cipsele su bez žlezdanih trihoma na površini. Apikalna ivica perikarpa je redukovana, a kruna perikarpa potpuno odsustvuje (Tabla E<sub>7</sub> - 1, 3). Papus je osasto-zašiljen, plevičasto ljuspast, homomorfan, jednoredan, trajan, direktno vezan za gornju ivicu cipsele (Tabla E<sub>7</sub> - 1). Papus je sačinjen od širokih, kožasto - opnastih, šilastih ljuspi (oko 5), varijabilnih dužina i donekle sraslih u osnovi (Tabla E<sub>7</sub> - 1). Ljuspe su sitno testeraste, bazalno hrapave, sa malim pinulama po celoj površini (Tabla E<sub>7</sub> - 4), i na vrhu (Tabla E<sub>7</sub> - 5-6). Boja papusa je žućkasto - transparentna.

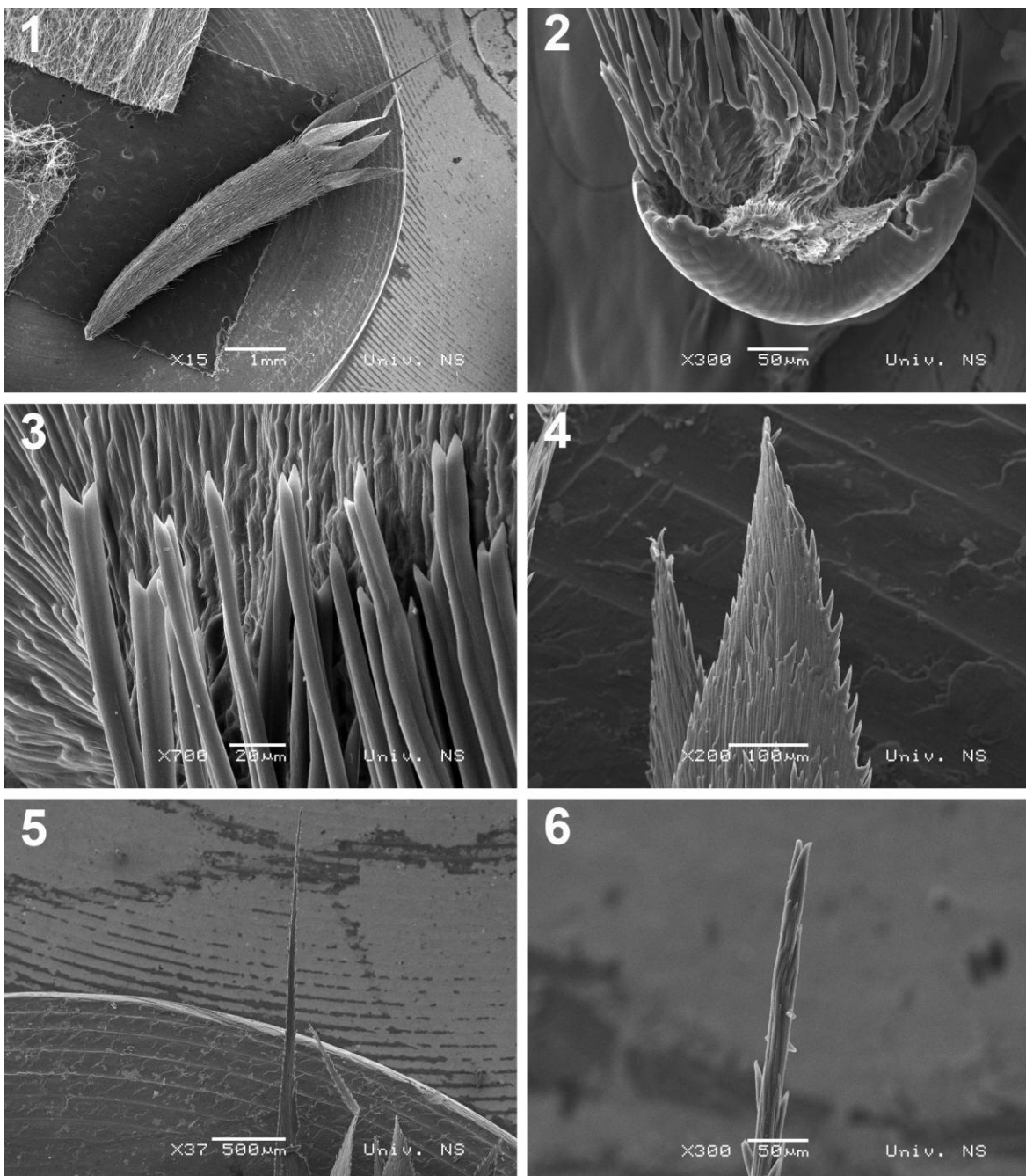


Tabla E<sub>7</sub>. Mikrografije cipsele *X. annuum*. 1 Cipsela. 2 Karpodijum. 2, 3 Dvojne trihome na mrežastoj površini cipsele. 4 Vršni deo ljupe papusa. 5, 6 Vrh ljupe papusa.



Cipsele vrste *X. cylindraceum* su homomorfne (Tabla E<sub>8</sub> - 1). Cipsele su braonkaste, svilaste, prave, više manje bočno spljoštene, usko obkonične do objajaste, sa više manje izraženim uzdužnim rebrima (Tabla E<sub>8</sub> - 1). Inercija cipsele je adaksijalna (Tabla E<sub>8</sub> - 2). Karpopodijum je asimetričan, u obliku potkovičaste kupe (Tabla E<sub>8</sub> - 2). Zidovi ćelija karpopodijuma su jedva vidljivi dajući gladak izgled karpopodijumu (Tabla E<sub>8</sub> - 2). Površina cipsele je mrežasta (Tabla E<sub>8</sub> - 3, 4). Brojne izdužene, nežlezdane, dvojne trihome, koje su kratko viljuškasto deljene na vrhu, su prisutne po celoj površini cipsele (Tabla E<sub>8</sub> - 3). Trihome imaju više manje jednake vrhove (Tabla E<sub>8</sub> - 4). Retke, kratke, dvojne trihome, su prisutne u donjim delovima ljusti papusa (Tabla E<sub>8</sub> - 1). Cipsele su bez žlezdanih trihoma na površini. Apikalna ivica perikarpa je redukovana, a kruna perikarpna potpuno odsustvuje (Tabla E<sub>8</sub> - 5). Paps je više manje plevičasto ljustast, homomorfan, jednoredan, trajan (Tabla E<sub>8</sub> - 1), direktno vezan za gornju ivicu cipsele (Tabla E<sub>8</sub> - 1, 5). Paps je sačinjen od širokih, kožasto-opnastih, šilastih, apikalno pinulatnih ljusti (10-15) (Tabla E<sub>8</sub> - 6-8), varijabilnih dužina i donekle sraslih u osnovi (Tabla E<sub>8</sub> - 1, 5). Boja papusa je od zlatne do žućkaste.

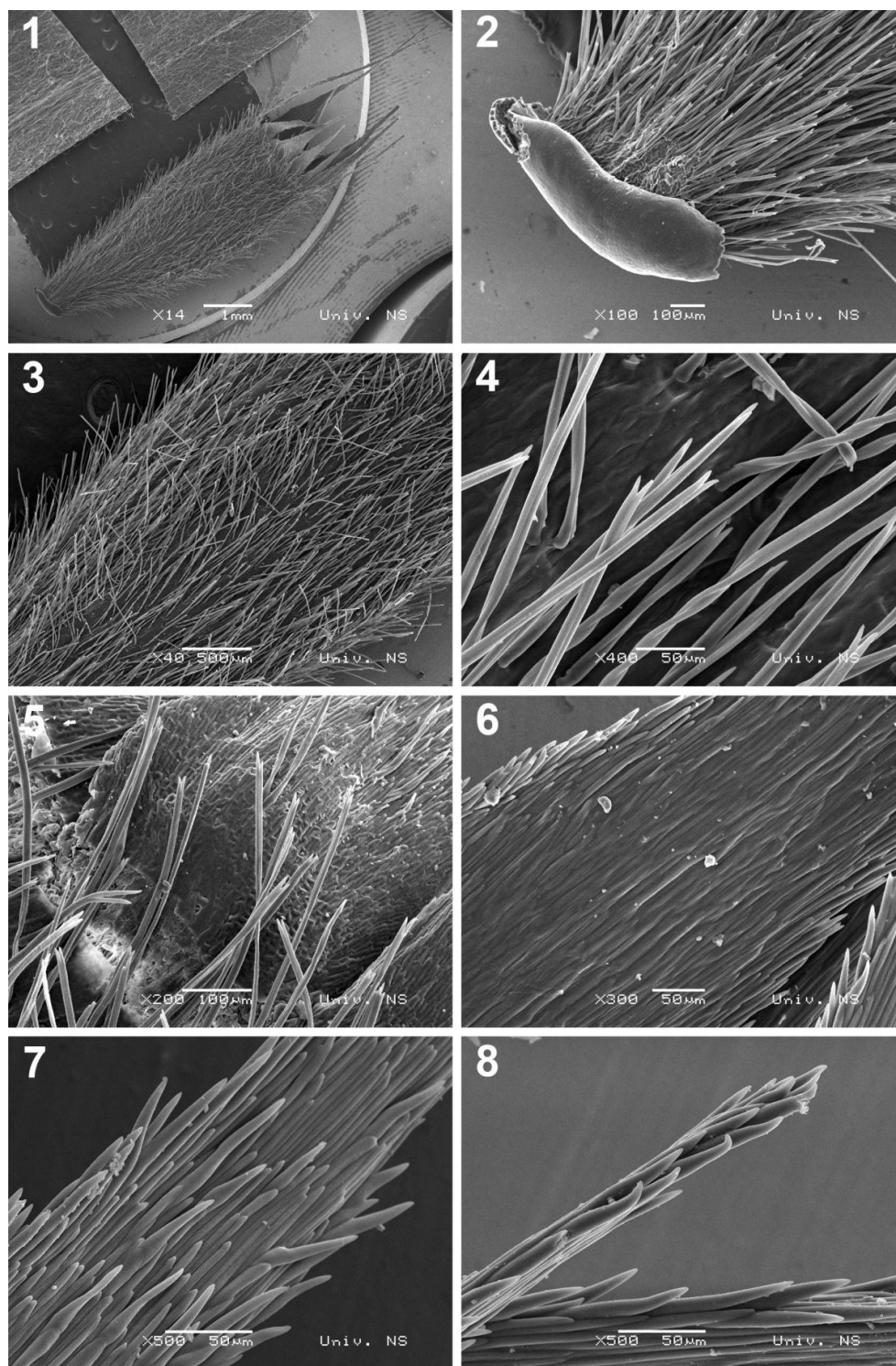


Tabla E<sub>8</sub>. Mikrografije cipsele *X. annuum*. 1 Cipsela. 2 Karpodijum. 3 Dvojne trihome na površini cipsele. 4 Mrežasta površina cipsele. 5 Insercija papusa. 6 Donji deo ljuspe papusa. 7 Srednji deo ljuspe papusa. 8 Površina ljuspi papusa. 8 Vrh ljuspe papusa.



Cipsele vrste *S. pungens* su homomorfne (Tabla E<sub>9</sub> - 1). Cipsele su svetlo braonkaste, svilaste, prave, duguljasto-obkonične, izbrazdane, sa više manje izraženim uzdužnim rebrima (Tabla E<sub>9</sub> - 1). Insercija cipsele je adaksijalna (Tabla E<sub>9</sub> - 2). Karpopodijum je asimetričan, formira potkovičastu kupu (Tabla E<sub>9</sub> - 2). Zidovi ćelija karpopodijuma su jedva vidljivi dajući gladak izgled karpopodijumu (Tabla E<sub>9</sub> - 2). Površina cipsele je mrežasta (Tabla E<sub>9</sub> - 3). Brojne izdužene, biserijatne, nežlezdane, dvojne trihome, koje su kratko viljuškasto deljene na vrhu, su prisutne po celoj površini cipsele (Tabla E<sub>9</sub> - 3). Trihome imaju više manje jednake vrhove (Tabla E<sub>9</sub> - 4). Cipsele su bez žlezdanih trihoma na površini. Apikalna ivica perikarpa je redukovana, a kruna perikarpna potpuno odsustvuje (Tabla E<sub>9</sub> - 1). Papus je osasto - zašiljen, plevičasto - ljuspast, homomorfan, jednoredan, trajan, direktno vezan za gornju ivicu cipsele (Tabla E<sub>9</sub> - 1). Papus je sačinjen od širokih, kožasto - opnastih, šilastih ljuspi koje se šire u svim pravcima, više manje jednakih dužina i delimično sraslih u osnovi (Tabla E<sub>9</sub> - 1). Ljuspe su sitno testeraste, bazalno skoro glatke (Tabla E<sub>9</sub> - 5). apikalno hrapave, barbelatne ili peraste (Tabla E<sub>9</sub> - 7-8). Papus je transparentan sa braon prugom po površini.

Odabrani kvalitativni karakteri stabla, listova, involukralnih brakteja i cipsela istraživanih taksona *Xeranthemum* grupe prikazani su u Tabeli 5.



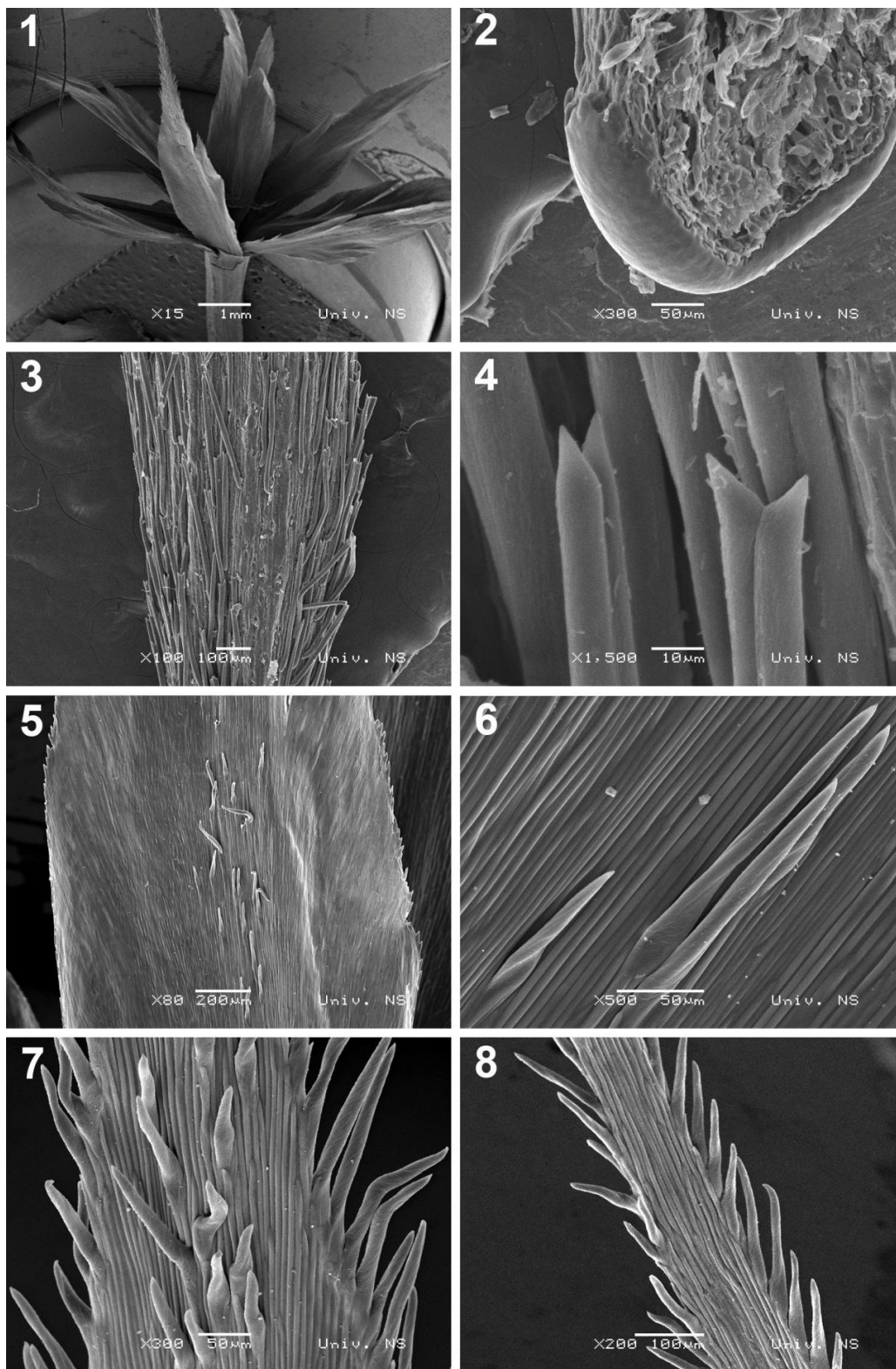


Tabla E<sub>9</sub>. Mikrografije cipsele *S. pungens*. 1 Cipsela. 2 Karpopodijum. 3, 4 Dvojne trihome na mrežastoj površini cipsele. 5, 6 Donji deo ljuske papusa. 7, 8 Gornji deo ljuske papusa.



Milan M. Gavrilović

Tabela 5. Dijagnostički mikromorfološki karakteri stabla, listova, involukranih brakteja i cipsela predstavnika *Xeranthemum* grupe

Lijst (adaksijalna strana)			Stablo	Deo biljke
Izgled	Antiklinalni zidovi	Spoljašnji periklinalni zidovi	Indumentum	Karakter
n.a.	n.a.	n.a.	vermiformne trihome	<i>Shangwua masarica</i>
kao "puzle"	blago izvijugani do ravni	konveksni, glatki	go	<i>Sh. denticulata</i>
kao "puzle"	blago izvijugani do ravni	konveksni, glatki	vermiformne i kapitane trihome	<i>Amphoricarpos exsul</i>
kao "puzle"	blago izvijugani	konveksni, glatki	vermiformne trihome	<i>A. elegans</i>
kao "puzle"	ravni	konveksni, glatki	vermiformne i kapitane trihome	<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>murbeckii</i>
kao "puzle"	ravni	konveksni, glatki	vermiformne trihome	<i>A. autaristus</i> subsp. <i>autariatus</i>
kao "puzle"	ravni	konveksni, glatki	vermiformne trihome	<i>A. autaristus</i> subsp. <i>bertisceus</i>
kao "puzle"	ravni	konveksni, glatki	vermiformne trihome	<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i>
naboran	izvijugani	konveksni, kutikularni nabori	vermiformne i kapitane trihome	<i>Charadinia orientalis</i>
kanalne antiklinalne granice	izvijugani	konveksni, blago naborani	vermiformne i kapitane trihome	<i>Xeranthemum inapertum</i>
konveksne ćelije	blago izvijugani	konveksni, neke ćelije sa naborima	vermiformne trihome	<i>X. annuum</i>
konveksne ćelije	blago izvijugani	konveksni, neke ćelije sa naborima	vermiformne i kapitane trihome	<i>X. cylindraceum</i>
strijatan	izvijugani	konveksni, veoma naborani	vermiformne i kapitane trihome	<i>Siebera pungens</i>


 Tabela 5. Dijagnostički mikromorfološki karakteri stabla, listova, involukranih brakteja i cipsela predstavnika *Xeranthemum* grupe (nastavak)

Involukralna brakteja	List (abaksijalna strana)				Deo biljke	
	Kristalni vedelita	Mukro	Vosak	Površina		Indumentum
odsutni	kratak i zaobljen	prisutan	nepravilno mrežasta	skoro go, vermiformne trihome	n.a.	<i>Shangwuia masarica</i>
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	sporadično raspoređene blizu ivice	vermiformne i kapitane trihome	<i>Sh. denticulata</i>
odsutni	veoma kratak	prisutan	mrežasto-naborana	skoro go, vermiformne trihome na ivici i vrhu	vermiformne i kapitane trihome	<i>Amphoricarpos exsul</i>
odsutni	duguljasto zaobljen	prisutan	mrežasto-naborana	skoro go, vermiformne trihome na ivici i na vrhu	vermiformne trihome	<i>A. elegans</i>
odsutni	kratak i zaobljen, jedva prelazi ivicu	prisutan	mrežasto-naborana	skoro go, vermiformne trihome na ivici i vrhu	vermiformne trihome	<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>murbeckii</i>
odsutni	tupo zaobljen jedva prelazi ivicu	prisutan	naborano-strijata	go	vermiformne trihome	<i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i>
odsutni	duguljasto zaobljen, prelazi ivicu	prisutan	naborano-strijata	go	vermiformne i kapitane trihome	<i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertiseus</i>
odsutni	šiljat, prelazi ivicu	prisutan	naborana, izrazito strijata	go	vermiformne i kapitane trihome	<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i>
prisutni	veoma ušiljen sa dugačkim tnom	prisutan	mrežasta	go	vermiformne i kapitane trihome	<i>Chardinia orientalis</i>
prisutni	veoma ušiljen sa dugačkim tnom	pločice sa jednakim ili nejednakim ivicama	mrežasta	go	vermiformne trihome	<i>Xeranthemum inapertum</i>
prisutni	veoma ušiljen sa dugačkim tnom	prisutan	mrežasta	go	vermiformne trihome	<i>X. annuum</i>
prisutni	kratak i zaobljen	prisutan	mrežasta	u centru vermiformne i kapitane trihome	vermiformne i kapitane trihome	<i>X. cylindraceum</i>
prisutni	dugačak, uspravan, oštar, šilast	prisutan	mrežasta	prilegle vermiformne trihome u centru	vermiformne trihome	<i>Sieberta pungens</i>



Tabela 5. Dijagnostički mikromorfološki karakteri stabla, listova, involukranih brakteja i cipsela predstavnika *Xeranthemum* grupe (nastavak)

Papus	Cipsela	Insercija	Površina	Boja	Indumentum	Deo biljke
Struktura	Karpodijum					Karakter
perasto-čekinjasti, homomorfan, jednoredan i trajan	asimetričan, gladak, formira potkovičastu kupu	adaksijalna	nepravilno talasasto mrežasta	braonkasta	odsutan	<i>Shangwua masarica</i>
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<i>Sh. denticulata</i>
barbelatno-osasto zašiljen, homomorfan, jednoredan, trajan	asimetričan, gladak, formira potkovičastu kupu	adaksijalna	nepravilno talasasto mrežasta	žućkasto-braonkasta	svilast, neleždane, dvojne trihome	<i>Amphoricarpus exsul</i>
barbelatno-osasto zašiljen, homomorfan, jednoredan, trajan	asimetričan, gladak, formira potkovičastu kupu	adaksijalna	naborano-mrežasta	žućkasto-braonkasta	svilast, neleždane, dvojne trihome	<i>A. elegans</i>
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>murbeckii</i>
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i>
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertisceus</i>
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i>
osasto-zašiljen, plevičasto ljuspast, homomorfan, jednoredan, trajan	asimetričan, gladak, formira potkovičastu kupu	adaksijalna	papilozno-strijatna	boja slonovače do žućkaste	svilast, neleždane, dvojne trihome	<i>Chardinia orientalis</i>
osasto-zašiljen, plevičasto ljuspast, homomorfan, jednoredan, trajan	asimetričan, gladak, formira potkovičastu kupu	adaksijalna	mrežasta	žućkasto-braonkasta	svilast, neleždane, dvojne trihome	<i>Xeranthemum inapertum</i>
osasto-zašiljen, plevičasto ljuspast, homomorfan, jednoredan, trajan	asimetričan, gladak, formira potkovičastu kupu	adaksijalna	mrežasta	žućkasto-braonkasta	svilast, neleždane, dvojne trihome	<i>X. annuum</i>
plevičasto-ljuspast, homomorfan, jednoredan, trajan	asimetričan, gladak, formira potkovičastu kupu	adaksijalna	mrežasta	braonkaste	svilast, neleždane, dvojne trihome	<i>X. cylindraceum</i>
osasto-zašiljen, plevičasto ljuspast, homomorfan, jednoredan, trajan	asimetričan, gladak, formira potkovičastu kupu	adaksijalna	mrežasta	braonkaste	svilast, neleždane, dvojne trihome	<i>Sieberta pungens</i>

Tabela 5. Dijagnostički mikromorfološki karakteri stabla, listova, involukranih brakteja i cipsele predstavnika *Xeranthemum* grupe (nastavak)

Deo biljke	Karakter		Boja	Insercija	
Papus	Elementi papusa				
	peraste čekinje, više manje srasle pri osnovi	<i>Shangwua masarica</i>	od slamnožute do bronkaste	direktno vezan za gornju ivicu cipsele	
	n.a.	<i>Sh. denticulata</i>	n.a.	n.a.	
	šilaste, bazalno glatke, apikalno barbelatne čekinje; unutrašnja cipsele sa mnogo više čekinja, spoljašnja cipsele sa više malih pinula na površini	<i>Amphoricarpos exsul</i>	žučkasto do bela	direktno vezan za gornju ivicu cipsele	
	šilaste, bazalno glatke i apikalno barbelatne čekinje, sa sporadično raspoređenim pinulama. čekinje više manje srasle pri osnovi i jednakih dužina	<i>A. elegans</i>	žučkasto do bela	direktno vezan za gornju ivicu cipsele	
	n.a.	<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>murbeckii</i>	n.a.	n.a.	
	n.a.	<i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i>	n.a.	n.a.	
	n.a.	<i>A. autariatus</i> subsp. <i>berrisecus</i>	n.a.	n.a.	
	n.a.	<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i>	n.a.	n.a.	
	široke, kožasto-opnaste, šilaste, sitno testeraste ljuspe, bazalno glatke, sa malim pinulama koje nastaju u uskom centralnom delu i nastavljaju se do vrha, apikalno sa pinulama, više manje srasle pri osnovi i jednakih dužina	<i>Chardinia orientalis</i>	slamasta	direktno vezan za gornju ivicu cipsele	
	široke, kožasto-opnaste, šilaste, sitno testeraste, bazalno hrapave ljuspe, apikalno sa pinulama, varijabilnih dužina, više manje srasle pri osnovi i jednakih dužina	<i>Xeranthemum inapertum</i>	žučkasto-transparentna	direktno vezan za gornju ivicu cipsele	
	široke, kožasto-opnaste, šilaste, apikalno sa pinulama, varijabilnih dužina, više manje srasle pri osnovi i jednakih dužina	<i>X. annuum</i>	žučkasto-transparentna	direktno vezan za gornju ivicu cipsele	
	široke, kožasto-opnaste, šilaste, apikalno pinulatne ljuspe, više manje srasle pri osnovi i varijabilnih dužina	<i>X. cylindraceum</i>	zlatna do žučkasta	direktno vezan za gornju ivicu cipsele	
	široke, kožasto-opnaste, šilaste, sitno testeraste, bazalno skoro glatke ljuspe, apikalno hrapave, barbelatne ili peraste ljuspe, više manje srasle pri osnovi i jednakih dužina	<i>Siebera pungens</i>	transparentan sa braon prugom po površini	direktno vezan za gornju ivicu cipsele	

n.a. - nije analizirano



### **4.3. Anatomija *Xeranthemum* grupe**

#### **4.3.1. Anatomska analiza balkanskih taksona roda *Amphoricarpos***

Anatomska analiza balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* je po prvi put prikazana u ovom istraživanju.

##### **4.3.1.1. Anatomske karakteristike korena**

Poprečni preseki korena istraživanih taksona prikazani su na Tabli F. Svi istraživani taksoni su višegodišnje zeljaste biljke, koje formiraju i adventivne korenove. Oblik poprečnog preseka adventivnog korena je zaobljen (Tabla F1–4). Adventivni korenovi imaju tipičnu građu: rizodermis je na površini i kora, ispod njega, koja se sastoji od parenhima i predstavlja dominantan deo poprečnog preseka korena (Tabla F1–4). Takođe, uočava se i dobro razvijen egzodermis, prvi sloj kore. Čelije parenhima kore su bogate skrobnim zrnima (Tabla F1–4). U centru mladih korenova uočavaju se parenhimske ćelije okružene ksilemom (Tabla F2–3), dok se u centru starijih korenova uočavaju sklerenhimska vlakna, okružena ksilemom (Tabla F1–4). Zidovi parenhimskih ćelija zadebljavaju (lignifikuju se) u starijim korenovima. U kasnijoj fazi, korenovi pokazuju sekundarnu građu. Korenovi nemaju sekretorne kanale (Tabla F1–4).

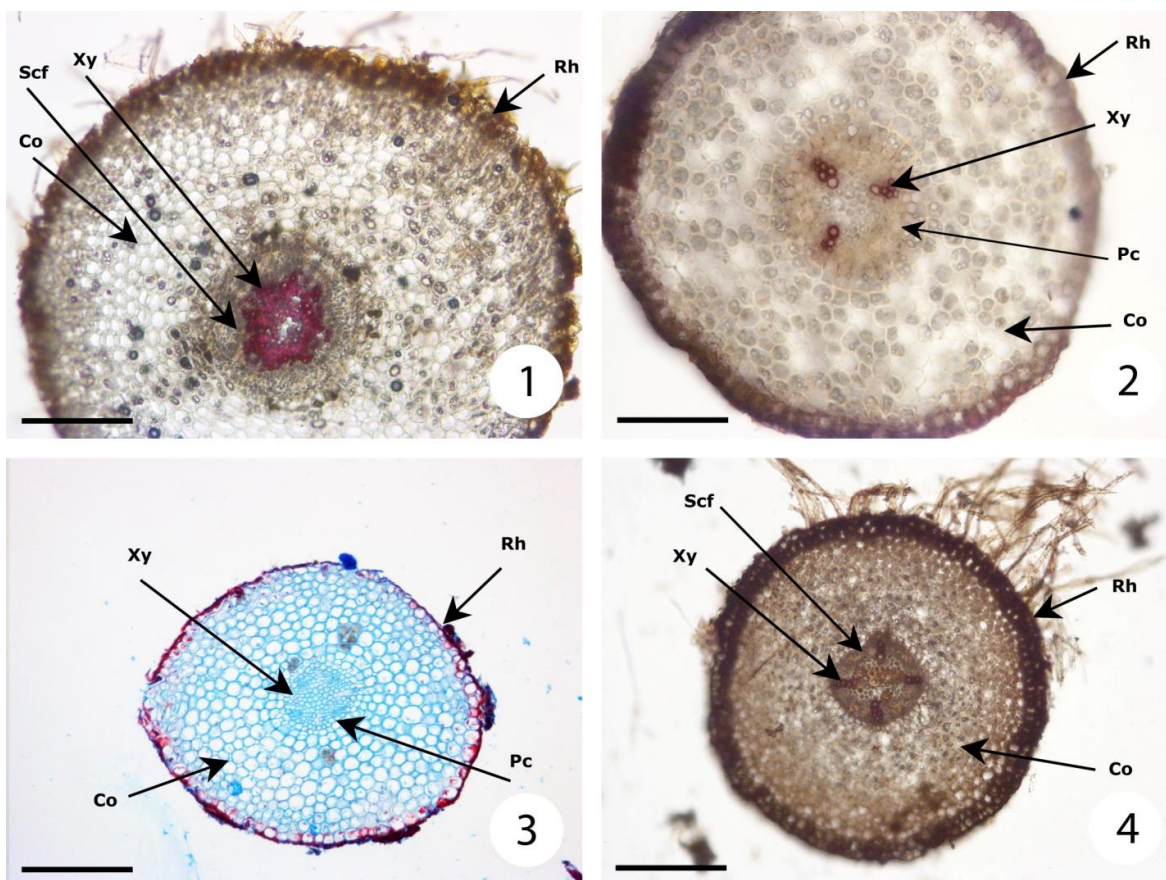


Tabla F. Poprečni preseći adventivnih korenova vrsta *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (1), *A. autariatus* subsp. *autariatus* (2), *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (3) and *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (4). Skraćenice: Co = kora; Pc = ćelije parenhima; Rh = rizodermis; Scf = sklerenhimska vlakna; Xy = ksilem. Bar = 200  $\mu$ m.



#### 4.3.1.2. Anatomske karakteristike rizoma

Poprečni preseći rizoma istraživanih taksona prikazani su na Tabli G. Na poprečnom preseku, rizomi imaju više ili manje okrugao oblik (Tabla G5, 7, 9), ili su nepravilnog oblika (Tabla G11). Na poprečnim preseccima rizoma uočavaju se sekundarna tkiva (Tabla G5, 7, 9, 11). Na površini je dobro razvijenim periderm, a ispod njega se uočavaju uske zone parenhima kore (Tabla G6, 8, 10, 12). U centralnom cilindru uočava se dobro razvijen ksilem, isprekidan širokim parenhimskim zracima (Tabla G6, 8, 10, 12). Rizomi pokazuju ekscentrični rast (neravnomerni rast prstenova ksilema) (Tabla G11). Vaskularni zraci su homocelularni i uglavnom multiserijatni. U centralnom regionu je srž, izgrađena od veoma krupnih parenhimskih ćelija (Tabla G5, 7, 9, 11). Rizomi nemaju sekretorne kanale (Tabla G5–12).



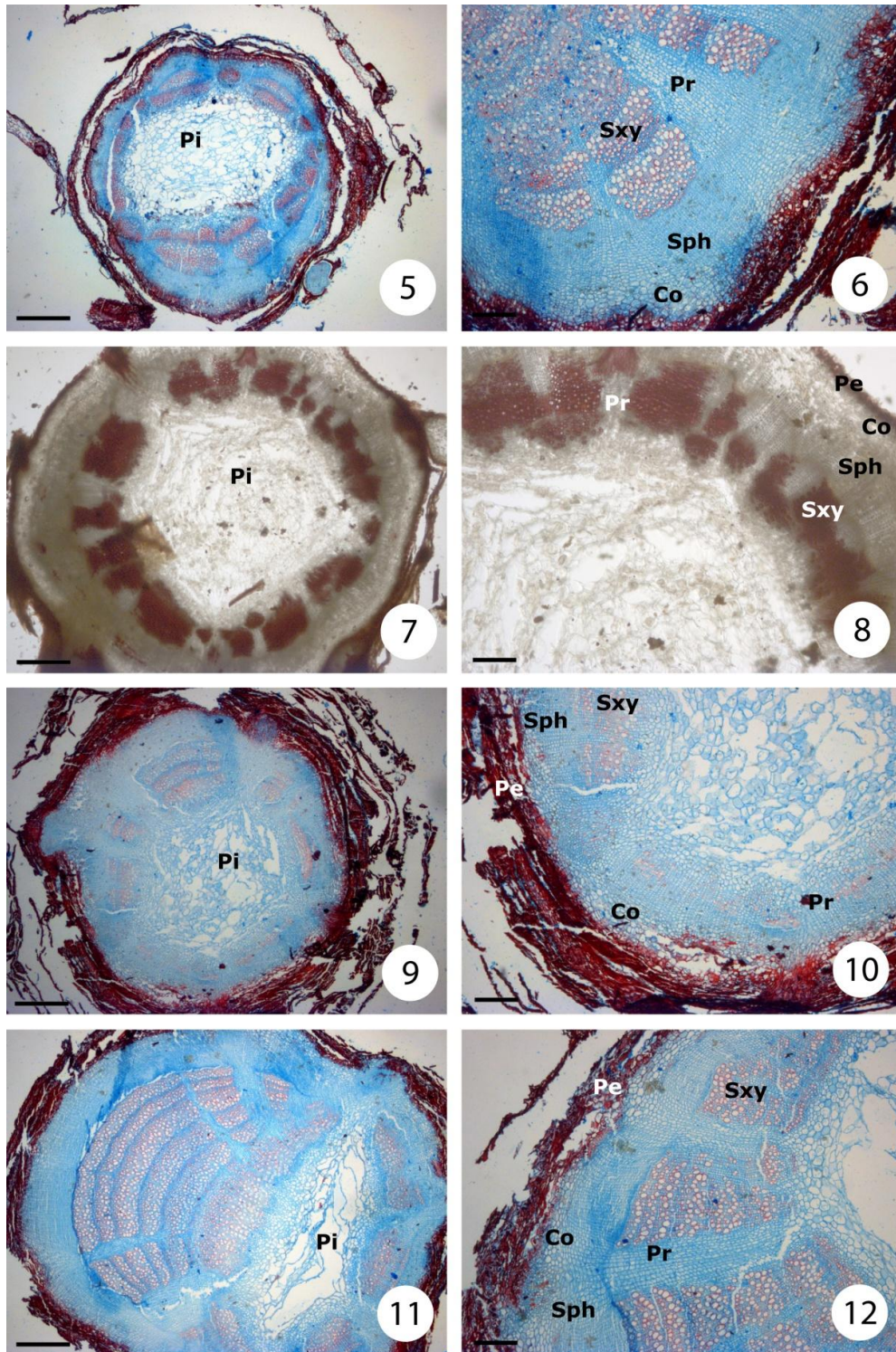


Tabla G. Poprečni preseći rizoma *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (5, 6), *A. autariatus* subsp. *autariatus* (7, 8), *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (9, 10) i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (11, 12). Skraćenice: Co = kora; Pe = periderm; Pi = srž; Pr = parenhimski zrak; Sph = sekundarni floem; Sxy = sekundarni ksilem. Bar = 500 µm (slike 5, 7, 9 i 11); 200 µm (slike 6, 8, 10 i 12).



#### 4.3.1.3. Anatomske karakteristike lista

Poprečni preseki listova istraživanih taksona prikazani su na Tabli H. Na poprečnom preseku lista, glavni nerv je u obliku srca sa dva rebra sa strane (Tabla H13, 15, 17, 19). Adaksijalni epidermis je jednoslojan i prekriven debelom kutikulom (Tabla H14, 16, 18, 20). Čelije adaksijalnog epidermisa su vidno veće u poređenju sa ćelijama abaksijalnog epidermisa (Tabla H14, 16, 18, 20).

Kristalne druze nepravilnog oblika od kalcijum oksalata (CaOx kristali) mogu se uočiti u ćelijama adaksijalnog i abaksijalnog epidermisa listova (Tabla I21–22). Ovi kristali su posebno vidljivi unutar ćelija adaksijalnog epidermisa (Tabla I22). Oni su takođe uočeni u nekim ćelijama mezofila (Tabla I21).

Epidermalne ćelije adaksijalnog epidermisa su nepravilno poligonalnog oblika (Tabla J23–26). Spoljašnji periklinalni zidovi ćelija su konveksni i glatki (Tabla J23–26). Antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa su ravni (Tabla J23–26).

Listovi su amfistomatični (Tabla H14, 16, 18, 20). Izdignute stome se uočavaju, pretežno na abaksijalnoj strani (Tabla H14, 16, 18, 20) dok je njihovo prisustvo na adaksijalnoj strani izuzetno retko (Tabla H14). Lisna ploča ima dorziventralnu građu (Tabla H14, 16, 18, 20). Ispod adaksijalnog epidermisa nalazi se dvoslojno palisadno tkivo, izgrađeno od velikih ćelija bogatih hloroplastima i sunderasto tkivo sagrađeno od nekoliko slojeva poligonalnih ćelija između kojih su veliki međućelijski prostori (Tabla H14, 16, 18, 20). Kolateralni zatvoreni provodni snopići, okruženi parenhimskim tkivom, raspoređeni u nizu, uočavaju se centralnom delu lisne ploče (Tabla H14, 16, 18, 20). U glavnom nervu prisutan je jedan provodni snopić, ili jedan veliki i dva mala provodna snopića, sa okolnim parenhimskim omotačem koji se proteže do oba epidermisa (Tabla H13, 15, 17, 19). Na adaksijalnoj strani uočava se subepidermalni kolenhim, dok se na abaksijalnoj strani kolenhim smenjuje sa hlorenhimom (Tabla H13, 15, 17, 19). Listovi nemaju sekretorne kanale (Tabla H13–20).

Kovrdžave, nežlezdane trihome pokrivaju obe površine lista, ali mnogo su više zastupljene na abaksijalnoj strani, gde formiraju baršunasti indumentum (Tabla K27–28). Ove trihome su vermiforme (lanatne). Glandularne trihome, koje se vide kao žlezdane



tačke, takođe se nalaze na obe površine lista, ali mnogo više na abaksijalnoj strani (Tabla K27–28). Glandularne trihome su biserijatnog tipa (Tabla K29–31).

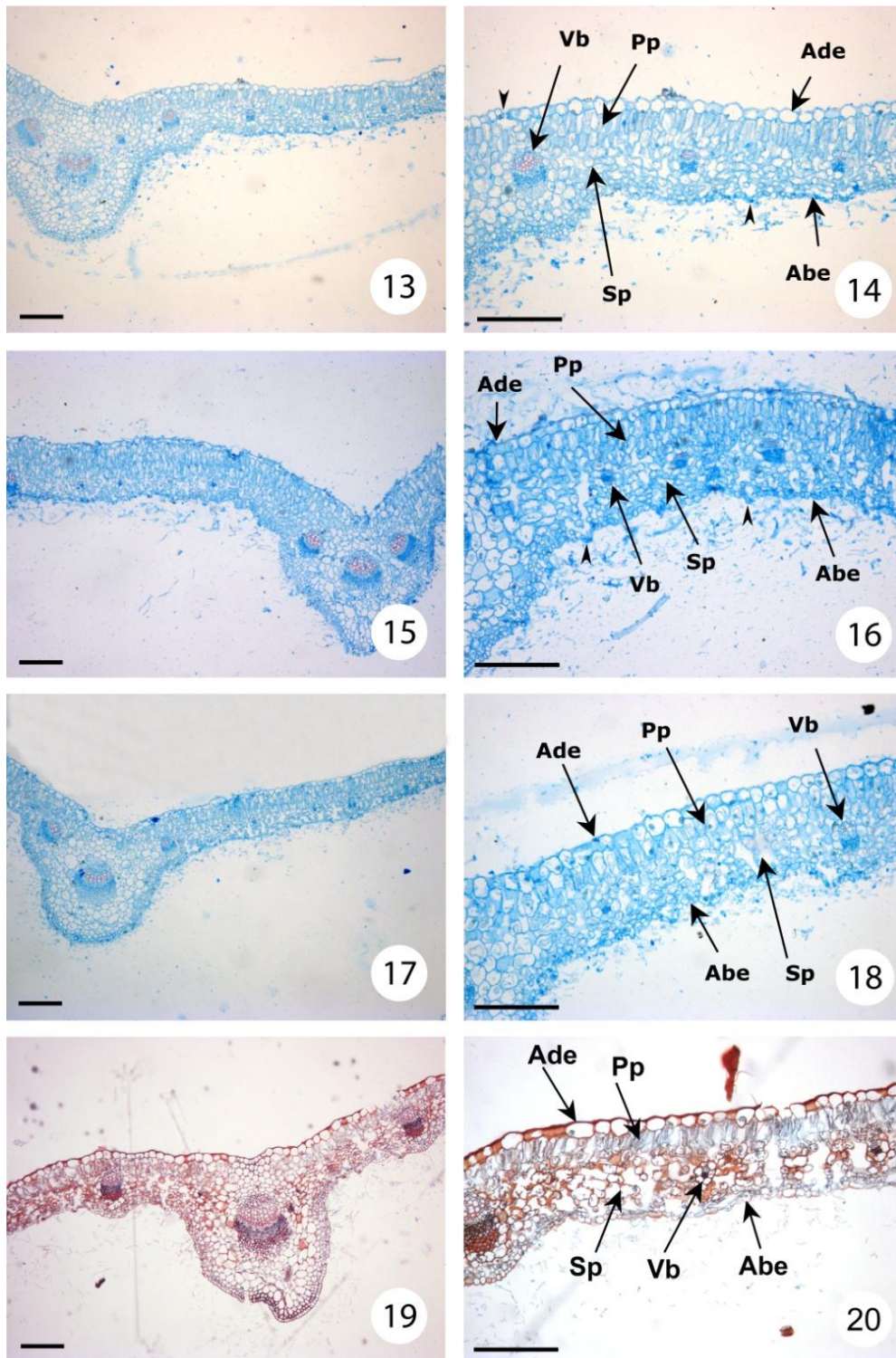


Tabla H. Poprečni presecci listova *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (13, 14), *A. autariatus* subsp. *autariatus* (15, 16), *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (17, 18) i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (19, 20). Skraćenice: Abe = abaksijalni epidermis; Ade = adaksijalni epidermis; Pp = palisadni parenhim; Sp = sunderasti parenhim; Vb = provodni snopić; Glava strelice: stoma. Bar = 200  $\mu$ m

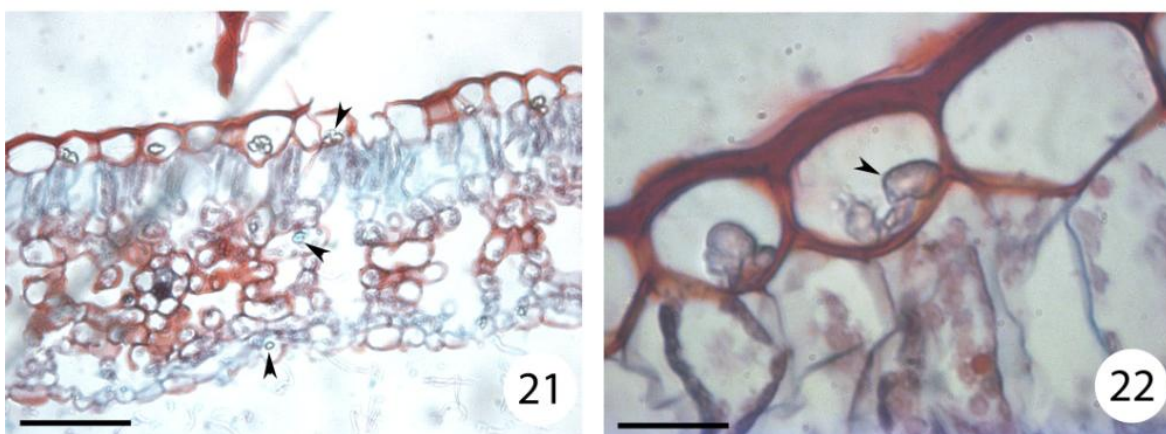


Tabla I. Poprečni presek lista *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*. Strelice označavaju kristalne druze. Bar = 100  $\mu$ m.

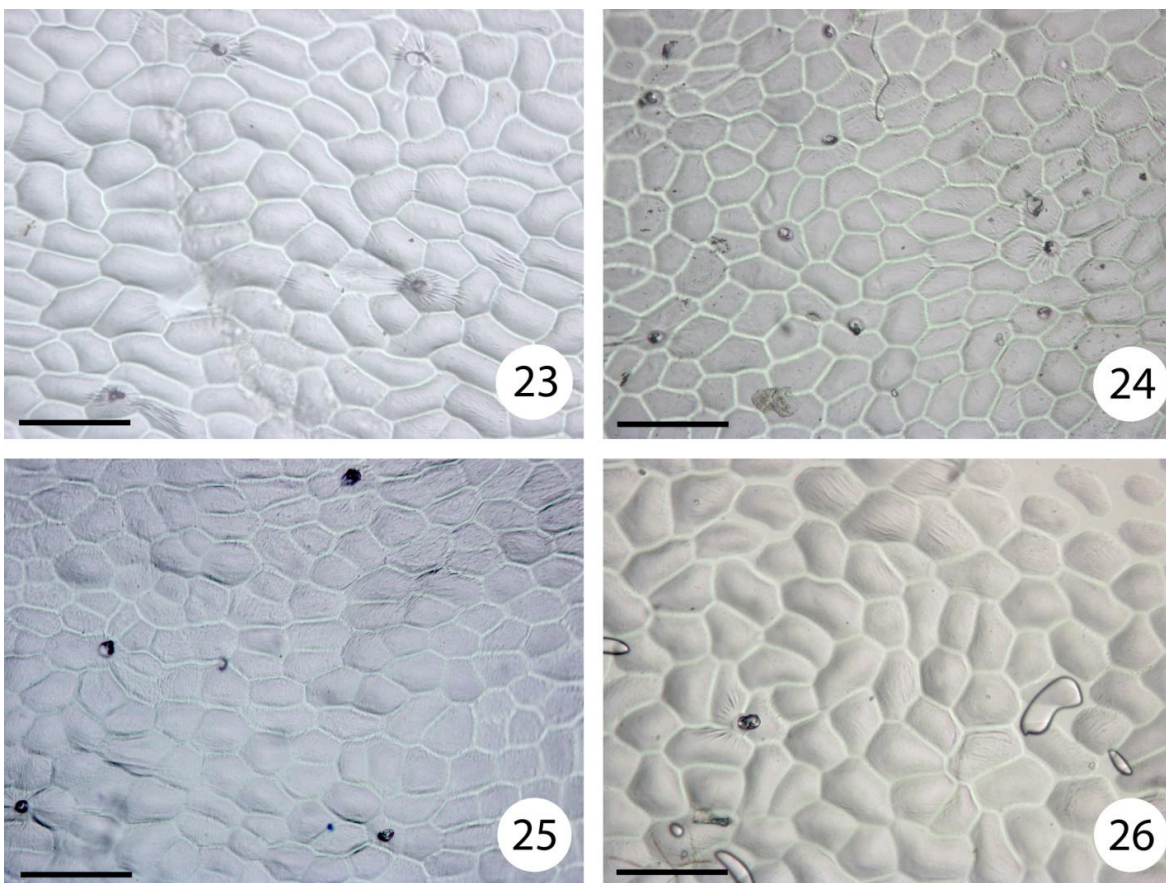


Tabla J. Mikrografije adaksijlanog epidermisa *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (23), *A. autariatus* subsp. *autariatus* (24), *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (25) and *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (26). Bar = 100  $\mu$ m.

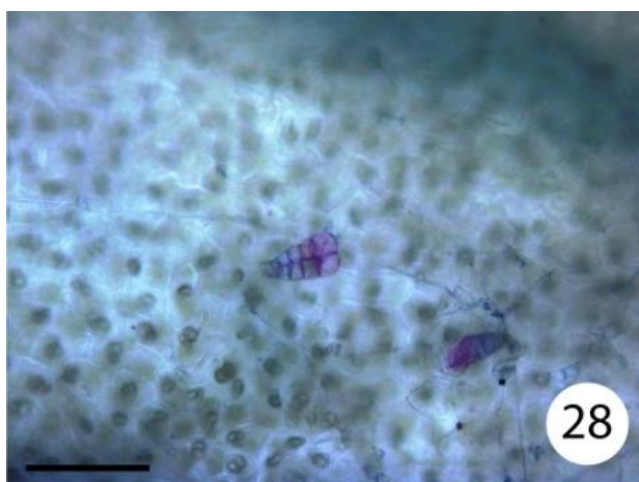
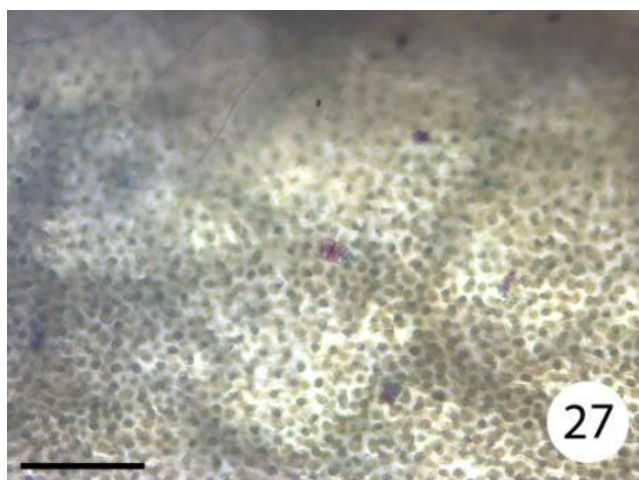


Tabla K. Adaksijalni epidermis *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. Kristalne druze i biserijatne trihome. Bar = 200  $\mu\text{m}$  na 29; 100  $\mu\text{m}$  na 30; 50  $\mu\text{m}$  na 31.



#### 4.3.1.4. Anatomske karakteristike drške cvasti

Poprečni preseki drške cvasti istraživanih taksona prikazani su na Tabli L. Poprečni presek drške cvasti ima nepravilni poligonalni oblik (Tabla L32, 34, 36, 38). Na površini se nalazi jednoslojni epidermis izgrađen od ovalnih do izodijametričnih ćelija (Tabla L33, 35, 37, 39). Ispod epidermisa nalazi se kora izgrađena od kolenhima i hlolenhima, koji su naizmenično raspoređeni. Izražena rebra u sebi sadrže kolenhim, dok se hlolenhim nalazi između rebara (Tabla L33, 35, 37, 39). Provodni snopići su kolateralni i ciklično organizovani (Tabla L32, 34, 36, 38). Između njih je parenhimsko tkivo (Tabla L33, 35, 37, 39). Jako lignifikovano tkivo sklerenhima okružuje svaki provodni snopić. Nekoliko provodnih snopića ("kortikalni" provodni snopići) nalaze se izvan kruga, blizu kore (Tabla L33, 34, 37, 39). Jasno vidljiv sloj endodermisa, koji sadrži zrnca skroba, odvaja koru od centralnog cilindra (Tabla L39). Na poprečnom preseku u centralnom delu drške cvasti nalazi se srž izgrađena od velikih parenhimskih ćelija (Tabla L33, 35, 37, 39). U drškama cvasti nisu uočeni sekretorni kanali (Tabla L30–37).

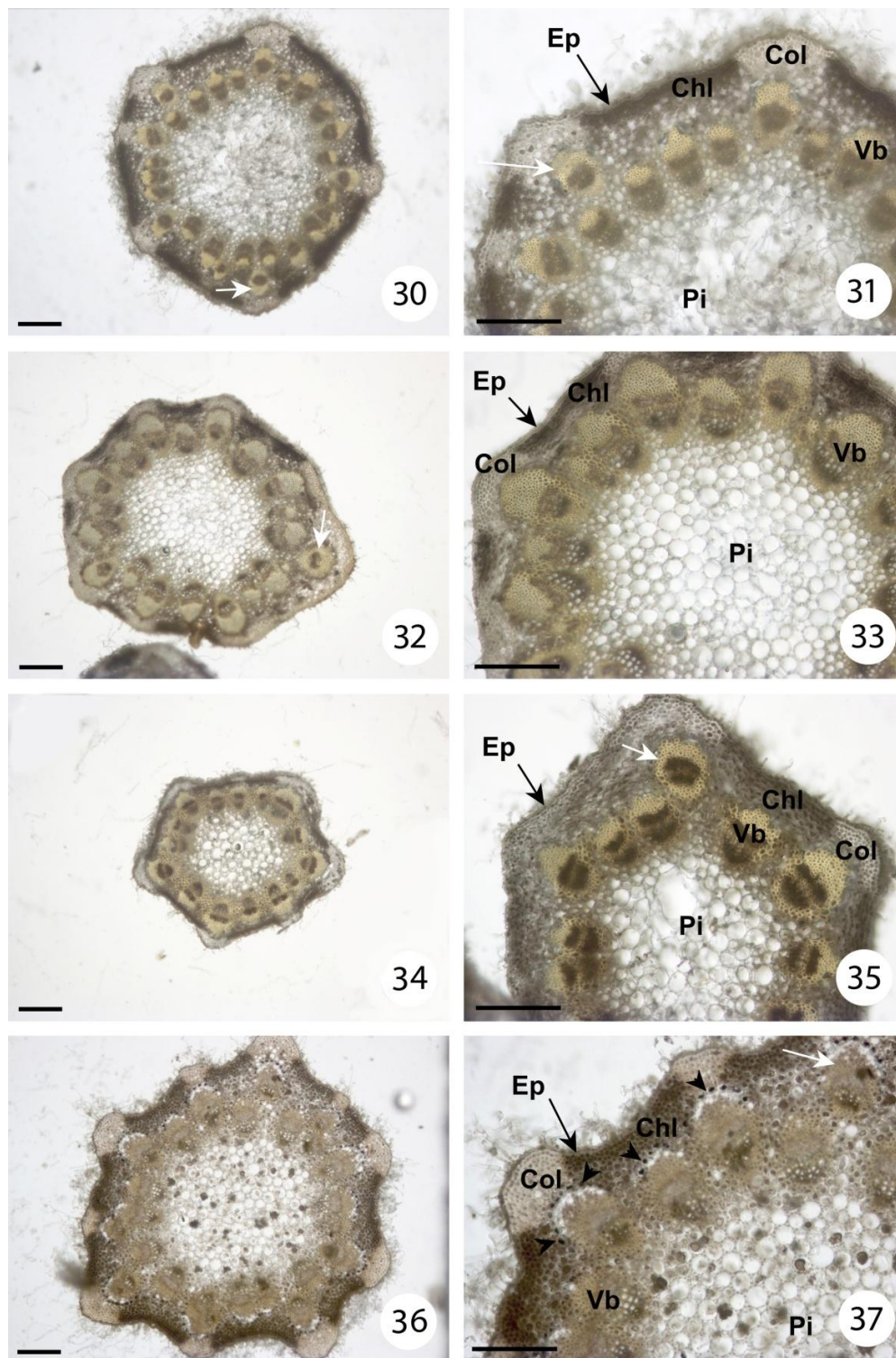


Tabla L. Poprečni preseki drške cvasti *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (32, 33), *A. autariatus* subsp. *autariatus* (34, 35), *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (36, 37) and *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (38, 39). Skraćenice: Chl = hlorenhim; Col = kolenhim; Ep = epidermis; Pi = srž; Vb = provodni snopići; Bela strelica: “kortikalni” provodni snopić; Crna strelica: endodermis. Bar = 200  $\mu$ m.





#### 4.3.1.5. Anatomske karakteristike cvasti

Poprečni i uzdužni preseki cvasti istraživanih taksona prikazani su na Tabli M. Poprečni i uzdužni preseki cvetova pokazuju različite faze razvoja cvetova i plodova (Tabla M 38–45). Involukralna brakteja ima jednoslojan epidermis na površini, ispod koga se nalazi (ili odsustvuje) jednoslojni hipodermis, i veoma razvijeno višćelijsko tkivo sklerenhima (Tabla M39, 41, 43). Ispod sklerenhima prisutno je parenhimsko tkivo sa provodnim snopićima. Brakteje receptakuluma ili palje imaju sličnu anatomiju kao i involukralne brakteje (Tabla M39, 41, 43). U ranim fazama razvoja cvetova, uočavaju se prašnici sa polenovim zrnima (Tabla M46). Plodnik je podcvetan, bikarpelatan, sinkarpan i unilokularan (Tabla M39, 43, 44, 45). Semeni zametak je anatropan, unitegmičan i tenuinucelatan sa bazalnom placentacijom (Tabla M44). Spoljašnji i unutrašnji epidermis perikarpa je jednoslojan, dok se u mezofilu uočavaju dva regiona (Tabla M41).

Taksoni roda *Amphoricarpos* se odlikuju heterokarpijom, odnosno, može se uočiti nezrela unutrašnja cipsela, koja nastaje iz centralnih dvopolnih cvetova (Tabla M39, 41, 43) i nezrela spoljašnja cipsela, koja nastaje iz perifernih ženskih cvetova (Tabla M43, 45). Nezreli plod sadrži sloj perikarpa, koji je sastavljen od jednoslojnog epidermisa, grupe sklerenhimskih vlakana i parenhimskih ćelija (Tabla M41), i sloj teste, koji je sastavljen od epidermisa teste sa lignifikovanim ćelijama i ostacima ćelija (Tabla M41). Ćelije parenhima perikarpa imaju više ili manje istu građu u celom perikarpu i u zreloom stanju između njih su bogati međućelijski prostori (Tabla M41). Sloj fitomelanina nije uočen. Endosperm, koji okružuje embrion, sastoji se od jednog do tri sloja ćelija (Tabla M40, 41). Zreli embrion je aksijalan i zauzima celu komoru (Tabla M38, 41). Osa embriona je ravna, a plumula je slabo diferencirana (Tabla M38). Uočavaju se dva plano-konveksna kotiledona (Tabla M38).

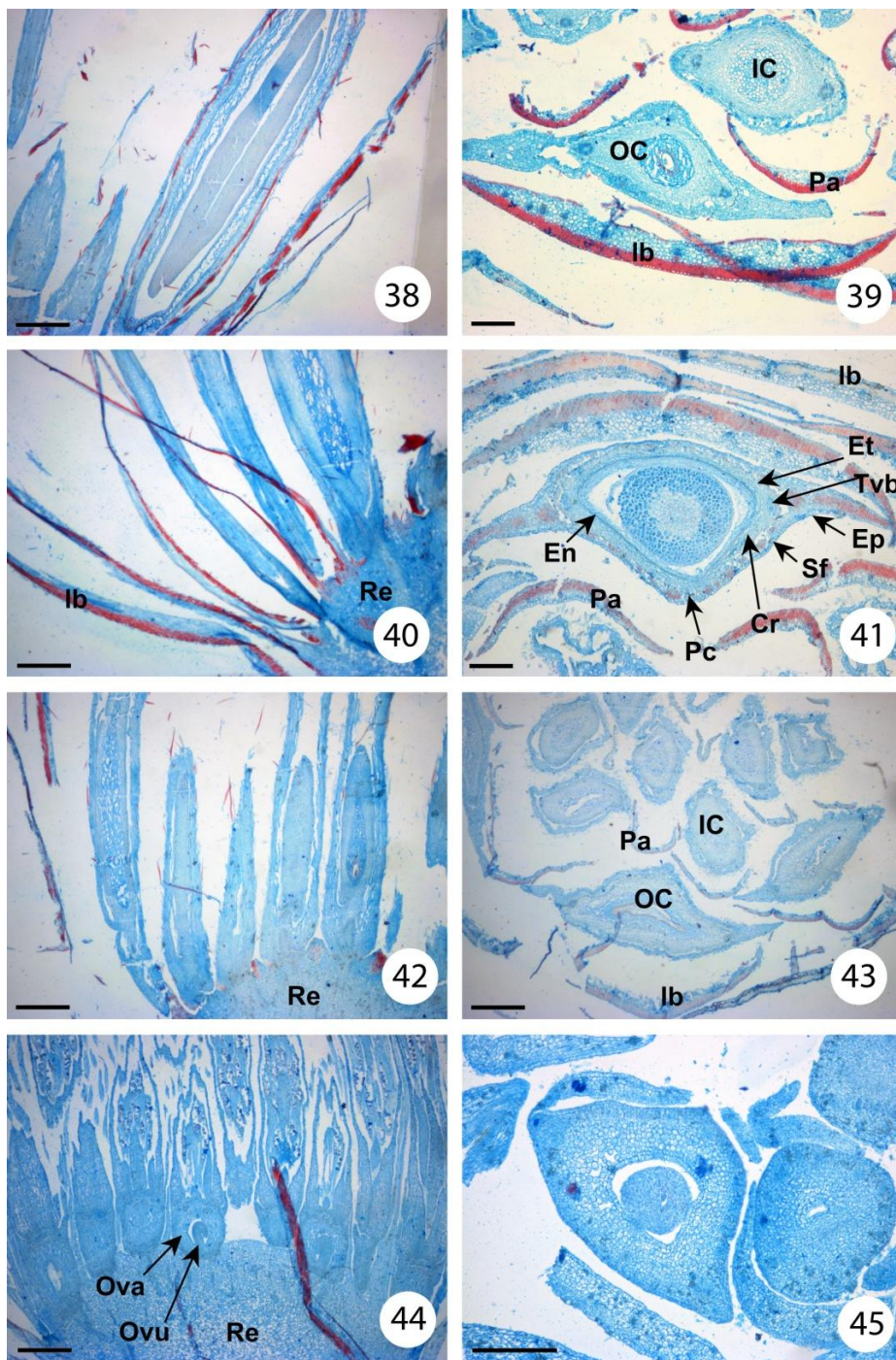


Tabla M. Poprečni (39, 40, 43, 45) i uzdužni preseći cvasti (39, 40, 42, 44) *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (38, 39), *A. autariatus* subsp. *autariatus* (40, 41), *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (42, 43) i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (44, 45). Skraćenice: Cr = ostaci ćelija; En = endosperm; Ep = epidermis perikarpa; Et = epidermis teste; Ib = involukralna brakteja; IC = unutrašnja cipsela; OC = spoljanja cipsela; Ova = plodnik; Ovu = semeni zametak; Pa = palea; Pc = ćelije parenhima; Re = receptakulum; Sf = sklerenhimska vlakna; Tvb = provodni snopić teste. Bar = 500 µm slike 38, 40, 42 i 44; 200 µm na 39, 41, 43 i 45.



### 4.3.2. Anatomska analiza vrsta roda *Xeranthemum*

Anatomska analiza vrsta roda *Xeranthemum* iz Srbije je po prvi put prikazana u ovom istraživanju.

#### 4.3.2.1. Anatomske karakteristike korena

Poprečni preseki korena istraživanih vrsta prikazani su na Tabli N. Iako su ove vrste jednogodišnje, sekundarna tkiva su uočena na poprečnim presecima obe istraživane vrste [posebno dobro razvijeni ksilem (Tabla N1–4)]. Na površini korena obe vrste prisutan je višeslojni egzodermis (Tabla N1–4). Ispod egzodermisa, nalazi se redukovana kora (zbog prisustva sekundarnih tkiva korena) (Tabla N1–4). Takođe, floem kao i sklerenhimska vlakna se uočavaju ispod kore. Dominantni deo poprečnog preseka korena čini sekundarni ksilem izgrađen od traheja i traheida (Tabla N1–4). Korenovi nemaju sekretorne kanale (Tabla N1–4).

Značajni kvantitativni karakteri su prosečna debljina egzodermisa i prosečni prečnik glavnog korena i ksilema. Debljina egzodermisa za *X. annuum* je 198.0  $\mu\text{m}$  za glavni koren i 92.0  $\mu\text{m}$  za bočni koren, dok su kod *X. cylindraceum* ove vrednosti 294.9  $\mu\text{m}$  i 131.2  $\mu\text{m}$ . Prečnik glavnog korena kao i prečnik ksilema se razlikovao između istraživanih vrsta, 1390.5  $\mu\text{m}$  i 831.7  $\mu\text{m}$  za *X. annuum*, odnosno 1930  $\mu\text{m}$  i 1212.1  $\mu\text{m}$  za *X. cylindraceum* (Tabela 6).

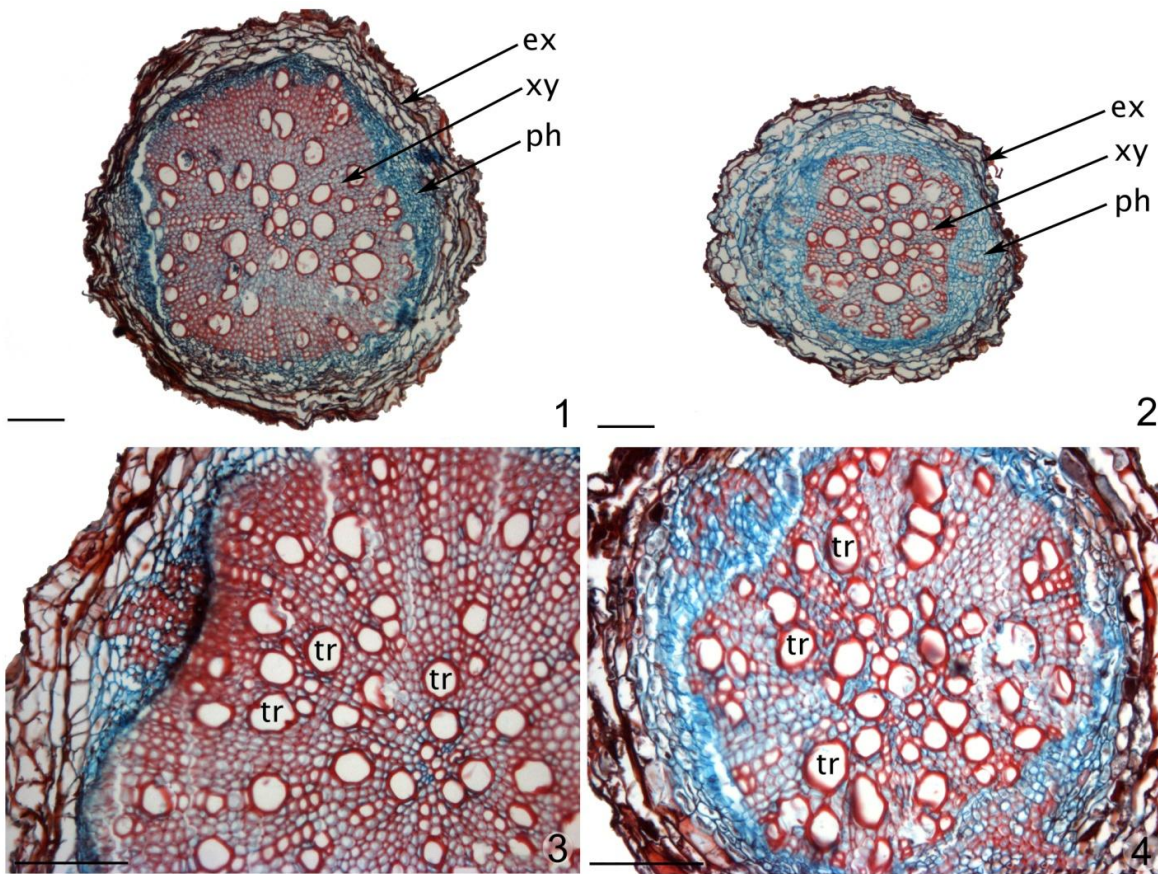


Tabla N. Poprečni presecci korena *X. annuum* (1, 3) i *X. cylindraceum* (2, 4). Ex = egzodermis; Ph = floem; Xy = ksilem; Tr = traheje. Bar = 100  $\mu$ m,

Tabela 6. Anatomske karakteristike korena vrsta roda *Xeranthemum*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

	<i>X. annuum</i>	<i>X. cylindraceum</i>
<b>Glavni koren</b>		
Debljina egzodermisa ( $\mu\text{m}$ )	198.0 $\pm$ 64.5	294.9 $\pm$ 57.5
Prečnik korena ( $\mu\text{m}$ )	1390.5 $\pm$ 477.6	1930.1 $\pm$ 673.8
Prečnik ksilema ( $\mu\text{m}$ )	831.7 $\pm$ 320.6	1212.1 $\pm$ 346.2
Prečnik traheja ( $\mu\text{m}$ )*	41.6 $\pm$ 4.6	43.1 $\pm$ 6.9
<b>Bočni koren</b>		
Debljina egzodermisa ( $\mu\text{m}$ )	92.0 $\pm$ 28.5	131.2 $\pm$ 26.0
Prečnik korena ( $\mu\text{m}$ )	526.1 $\pm$ 180.1	570.0 $\pm$ 216.9
Prečnik ksilema ( $\mu\text{m}$ )	342.2 $\pm$ 143.4	341.1 $\pm$ 185.3
Prečnik traheja ( $\mu\text{m}$ )*	33.30 $\pm$ 9.5	28.50 $\pm$ 6.2

\* Mereno je pet najvećih traheja.



#### 4.3.2.2. Anatomske karakteristike stabla

Poprečni preseki stabla istraživanih vrsta prikazani su na Tabli O. Na poprečnom preseku mladog stabla vrste *X. annuum* uočava se pet izraženih rebara (Tabla O5). Kasnije, oblik poprečnog preseka stabljike postaje manje ili više okrugao ili poligonalan (Tabla O7). Nasuprot tome, poprečni presek mladog stabla *X. cylindraceum* je pentagonalni (Tabla O6), koji takođe, kasnije, postaje više pravilan i zaobljen (Tabla O8).

Jednoslojni epidermis, sastavljen je od ovalnih izodijametričnih ćelija, prekriven debelom kutikulom, prisutan je na površinama stabala (Tabla O9- 10). Kod obe istraživane vrste, na površini stabla, prisutne su brojne višećelijske nežlezdane, jednoreodne, kovrdžave trihome. Trihome su izgrađene od jedne ili dve ćelije koje formiraju bazalni deo, u kome se može primetiti sadržaj ćelija, i jedne transparentne, izdužene, upletene vršne ćelije (Tabla O11). Žlezdane trihome pronađene kod *X. annuum* su biserijatne (Tabla O11), dok su kod vrste *X. cylindraceum* pronađene kapitatne sesilne trihome sa sekretornim rezervoarom koji pokriva skoro čitavu trihomu (Tabla O12).

Kora stabla je izgrađena od kolenhima i hllorenhima, koji su naizmenično raspoređeni. Kod *X. annuum* prisutno je do 8 slojeva kore, nasuprot 3 – 4 sloja kod *X. cylindraceum* (Tabla O1–2). Izražena rebra sadrže kolenhim, dok je hllorenhim prisutan između rebara (Tabla O1 - 2, 6). Ćelije hllorenhima su raspoređene u 2 – 4 reda. Samo kod vrste *X. cylindraceum* uočeno je prisustvo “kortikalnih” provodnih snopića (Tabla O1). U starijim stablima jasno se uočava sloj endodermisa koji razdvaja koru od centralnog cilindra (Tabla O6). Medularni provodni snopići su raspoređeni u jednom krugu (Tabla O - 3–4). Sklerifikacija centralnog cilindra se uočava u obliku tkiva sklerenhima i dobro razvijenog ksilema koji zajedno formiraju debeli prsten (Tabla O3–4). U centralnom cilindru uočeno je 10 – 12 kolateralnih provodnih snopića kod *X. annuum* (Tabla O3) i 10 – 15 kod *X. cylindraceum* (Tabla O4). Svaki provodni snopić se sastoji od manje razvijenog floema i dobro razvijenog ksilema. Sklerenhimska lignifikovana vlakna su iznad floema, a u nekim slučajevima sklerenhim u potpunosti obavija provodne snopiće (Tabla O4–5). Štaviše, parenhimske ćelije, u peridermalnoj zoni, između snopića, su sa zadebljalim zidovima



(Tabla O4–6). Velike parenhimske ćelije su prisutne u centralnom regionu stabla (Tabla O4–5). U stablima nisu uočeni sekretorni kanali (Tabla O5–10).

Odabrani gore pomenuti kvalitativni karakteri i njihova stanja kod obe istraživane vrste prikazani su u Tabeli 9. Među rezultatima merenja ističu se prosečan prečnik stabla, koji je 1709.6  $\mu\text{m}$  kod *X. annuum* i 1316.9  $\mu\text{m}$  kod *X. cylindraceum* (Tabela 7).

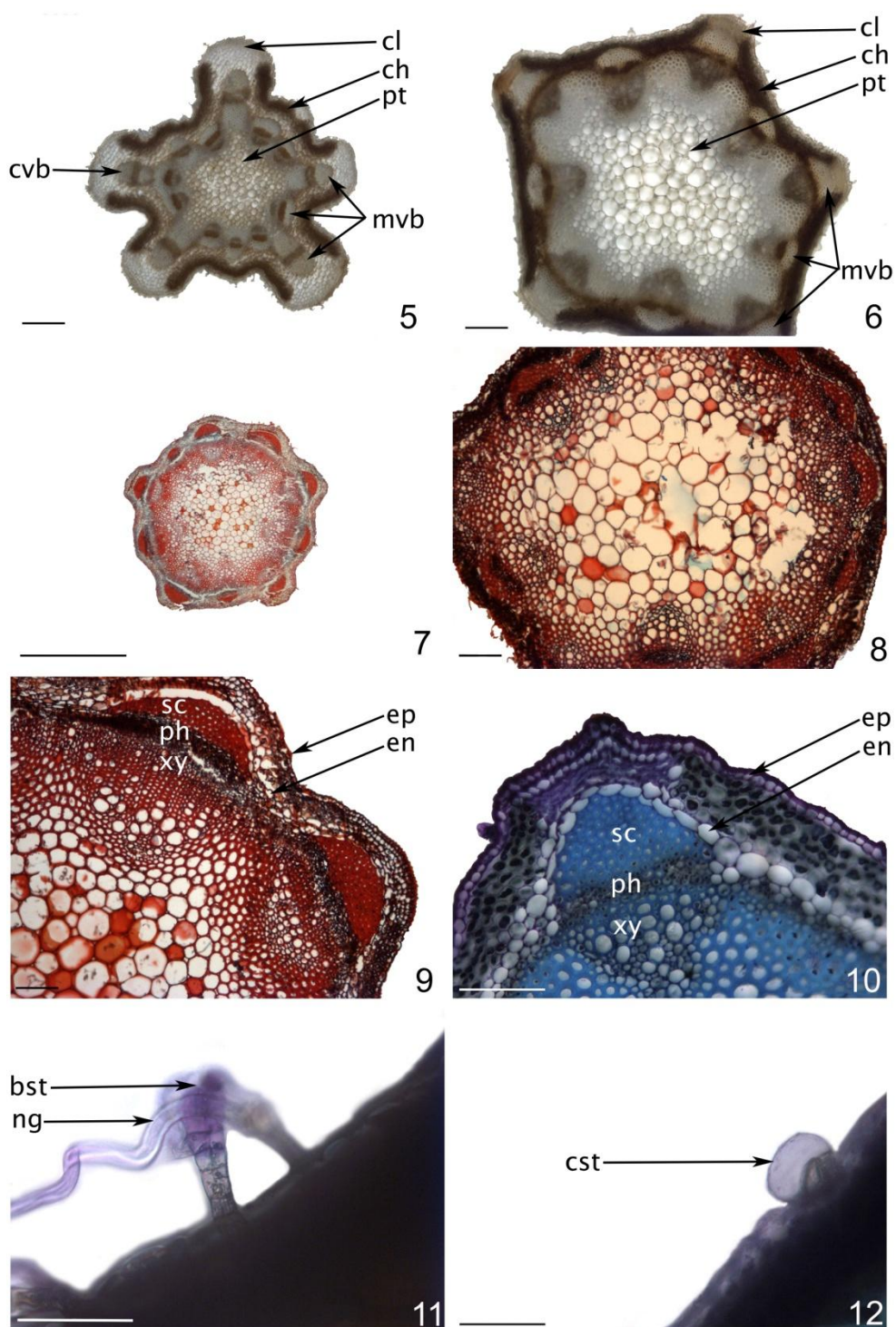


Tabla O. Poprečni preseći stabla *X. annuum* (5, 7, 9, 11) i *X. cylindraceum* (6, 8, 10, 12). Cl = kolenhim; Ch = hlolenhim; Pt = srž; Cvb = kortikalni provodni snopić; Mvb = medularni provodni snopić; Ep = epidermis; En = endodermis; Sc = sklerenhim; Ph = floem; Xy = ksilem; Ng = nežlezdane trihome; Bst = biserijatne trihome; Cst = kapitatne sesilne žlezdane trihome. Bar = 1000  $\mu$ m na 7; 200  $\mu$ m na 5 i 6; 100  $\mu$ m na 8, 9 i 10; 50  $\mu$ m na 11 i 12.





#### 4.3.2.3. Anatomske karakteristike drške cvasti

Poprečni preseći drške cvasti istraživanih vrsta prikazani su na Tabli P. Anatomija drške cvasti je slična anatomiji stabla. Poprečni presek drške cvasti *X. annuum* je poligonalnog oblika, sa više izraženijim rebrima (Tabla P13), dok je oblik kod *X. cylindraceum* pentagonalan (Tabla P14). Nekoliko manjih “kortikalnih” provodnih snopića prisutni su samo kod vrste *X. annuum* (Tabla O13). Zabeležen je varijabilan broj medularnih provodnih snopića, raspoređenih u krugu, 15 – 30 kod *X. annuum* i 10 – 12 kod *X. cylindraceum* (Tabela 7). Drške cvasti nemaju sekretorne kanale (Tabla O13- 14).

Odabrani gore navedeni kvalitativni karakteri i njihova stanja kod obe istraživane vrste prikazani su u Tabeli 9. Srednja vrednost prečnika drške cvasti kod *X. annuum* je gotovo dvostruko veća nego kod *X. cylindraceum* (1813.3  $\mu\text{m}$ , odnosno 913.9  $\mu\text{m}$ ). Prosečna debljina kore između rebara razlikuje se između istraživanih vrsta, 130.5 mm odnosno 71.5 mm, kao i prosečna debljina kore ispod rebara, 106.2 odnosno 58.3 mm (Tabela 7).

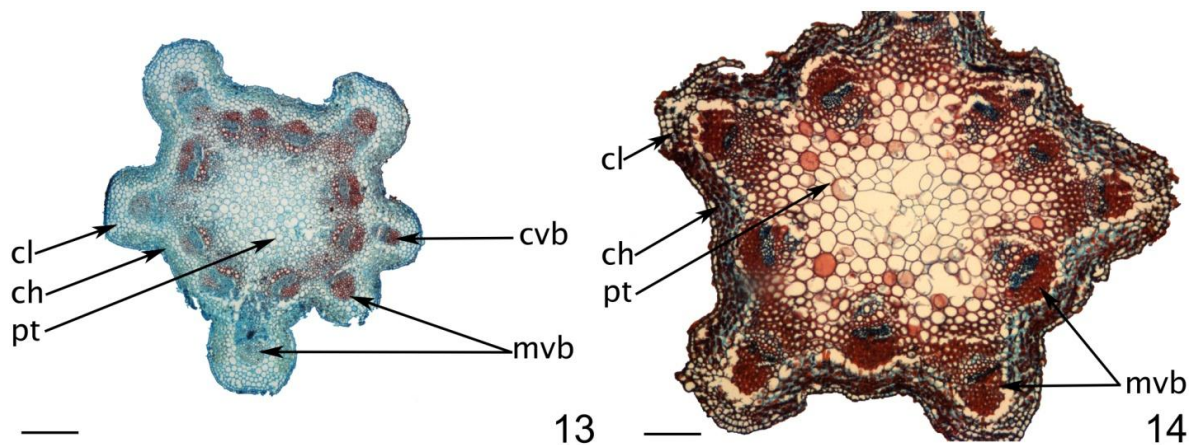


Tabla P. Poprečni preseći drške cvasti *X. annuum* (13) i *X. cylindraceum* (14). Cl = kolenhim; Ch = hlorenhim; Pt = srž; Cvb = “kortikalni” provodni snopić; Mvb = medularni provodni snopić. Bar = 200  $\mu\text{m}$  na 13; 100  $\mu\text{m}$  na 14.



Tabela 7. Anatomske karakteristike stabla i drške cvasti vrsta roda *Xeranthemum*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

	<i>X. annuum</i>	<i>X. cylindraceum</i>
<b>Stablo</b>		
Br. provodnih snopića	10 – 12	10 – 15
Prečnik traheja ( $\mu\text{m}$ )*	$31.70 \pm 4.3$	$22.60 \pm 4.1$
Prečnik stabla ( $\mu\text{m}$ )	$1709.6 \pm 162.0$	$1316.9 \pm 289.9$
Debljina kore ispod rebara ( $\mu\text{m}$ )	$56.5 \pm 14.80$	$46.7 \pm 19.0$
Debljina kore ispod rebara ( $\mu\text{m}$ )	$70.7 \pm 14.20$	$64.6 \pm 17.1$
<b>Drška cvasti</b>		
Br. provodnih snopića	15 – 30	10 – 12
Prečnik traheja ( $\mu\text{m}$ )*	$14.0 \pm 4.1$	$10.6 \pm 1.2$
Prešnik drške cvasti ( $\mu\text{m}$ )	$1813.3 \pm 513.5$	$913.9 \pm 133.0$
Debljina kore ispod rebara ( $\mu\text{m}$ )	$106.2 \pm 38.7$	$58.3 \pm 13.2$
Debljina kore ispod rebara ( $\mu\text{m}$ )	$130.5 \pm 64.0$	$71.5 \pm 18.9$

\* Mereno je pet najvećih traheja.



#### 4.3.2.4. Anatomske karakteristike lista

Poprečni preseći lista i otisaka epidermisa listova prikazani su na Tabli Q i R. Kod obe istraživane vrste, ćelije adaksijalnog epidermisa su vidno veće u odnosu na ćelije abaksijalnog epidermisa (Tabla Q15–18). To se uočava i u rezultatima merenja debljine adaksijalnog i abaksijalnog epidermisa. Prosečna debljina adaksijalnog epidermisa kod *X. annuum* 17.8 mm, a 12.6 mm kod *X. cylindraceum*, dok su te vrednosti za abaksijalni epidermis, 10.3 mm odnosno 8.0 mm. Abaksijalni epidermis je takođe jednoslojan i prekriven tanjom kutikulom u odnosu na adaksijalni epidermis. Ćelije epidermisa oba proučavana taksona su poligonalne i nepravilnog oblika sa izvijuganim antiklinalnim ćelijskim zidovima i rebrastim zadebljanjima (Tabla R23–26).

Listovi su amfistomatični, sa anomocitnim tipom stoma (Tabla R23–26). Broj epidermskih ćelija oko stoma je 4 – 6 (Tabla R23–26). Gusto raspoređene nežlezdane trihome, opisane ranije za stablo, uočene su sa obe strane listova obe istraživane vrste, ali više na adaksijalnoj strani (Tabla Q19). Retke glandularne trihome uočene su na površini listova obe vrste, ali različite morfologije, kao i na površini stabla. Glandularne trihome pronađene kod *X. annuum* su biserijatne (Tabla Q21), u poređenju sa kapitatnim sesilnim trihomima kod *X. cylindraceum*, lociranim u udubljenjima epidermisa (Tabla Q22).

Kod obe istraživane vrste liska ima dorziventralnu građu (Tabla Q15–18). Ispod adaksijalnog epidermisa, nalazi se palisadno tkivo, izgrađeno od velikih ćelija sa hloroplastima, raspoređenih u jednom sloju. Ispod palisadnog tkiva prisutno je sunderasto tkivo, sastavljeno od nekoliko slojeva poligonalnih ćelija, koje imaju manje hloroplasta, ali su sa velikim međućelijskim prostorima. Na poprečnim presecima obe istraživane vrste glavni nerv ima srcast oblik (Tabla Q15–16). Jedan provodni snopić se uočava u glavnom nervu, sa okolnim parenhimskim omotačem koji se prostire do oba epidermisa (Tabla Q15–16). Subepidermsko tkivo kolenhima se uočava na adaksijalnoj strani, dok se na abaksijalnoj strani smenjuje sa hlorenhimom (Tabla Q15–16). Sa obe strane glavnog rebra, i sa desne i sa leve strane lisne ploče, uočavaju se kolateralno zatvoreni provodni snopići, okruženi parenhimskim tkivom (Tabla Q17–18). Dobro razvijen sklerenhim okružuje provodne snopiće. Listovi nemaju sekretorne kanale (Tabla Q15–18).



Odabrani gore navedeni kvalitativni karakteri i njihova stanja kod obe istraživane vrste prikazani su u Tabeli 9. Prosečna debljina mladog lista između provodnih snopića je 137.7 mm kod *X. annuum* i 119.1 mm kod *X. cylindraceum*, dok je prosečna debljina u nivou glavnog nerva starijeg lista 317.7 mm kod *X. annuum* i 380.0 mm kod *X. cylindraceum* (Tabela 8).

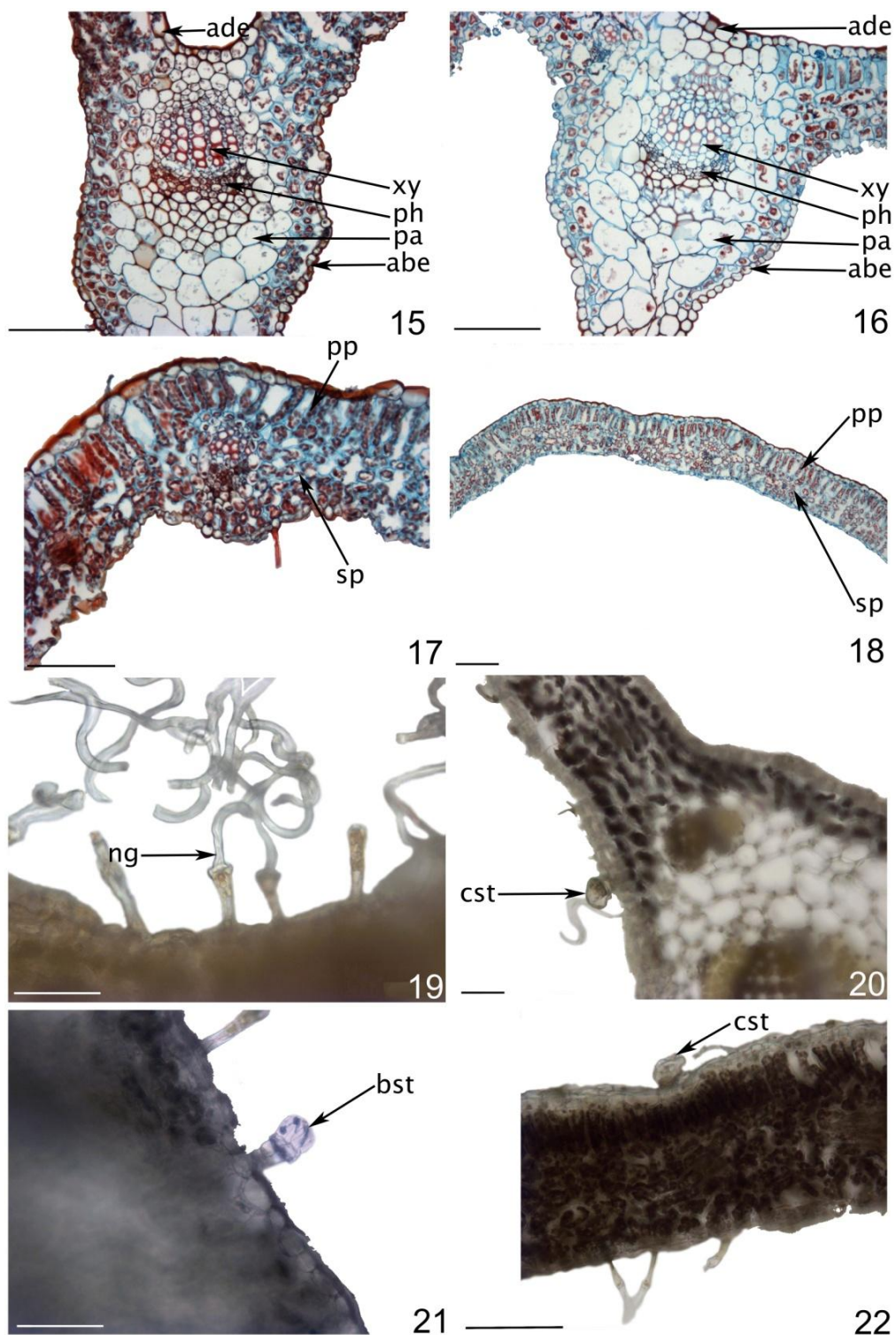


Tabla Q. Poprečni presecci listova *X. annuum* (15, 17, 19, 21) i *X. cylindraceum* (16, 18, 20, 22). Ade = adaksijalni epidermis; Ph = floem; Xy = ksilem; Pa = parenhim; Abe = abaksijalni epidermis; Pp = palisadni parenhim; Sp = sunderasti parenhim; Ng = nežlezdana trihoma; Bst = biserijatna trihoma; Cst = kapitatno sesilna žlezdana trihoma. Bar = 100  $\mu$ m na 15, 16, 17, 18 i 22; 50  $\mu$ m na 19, 20 i 21.

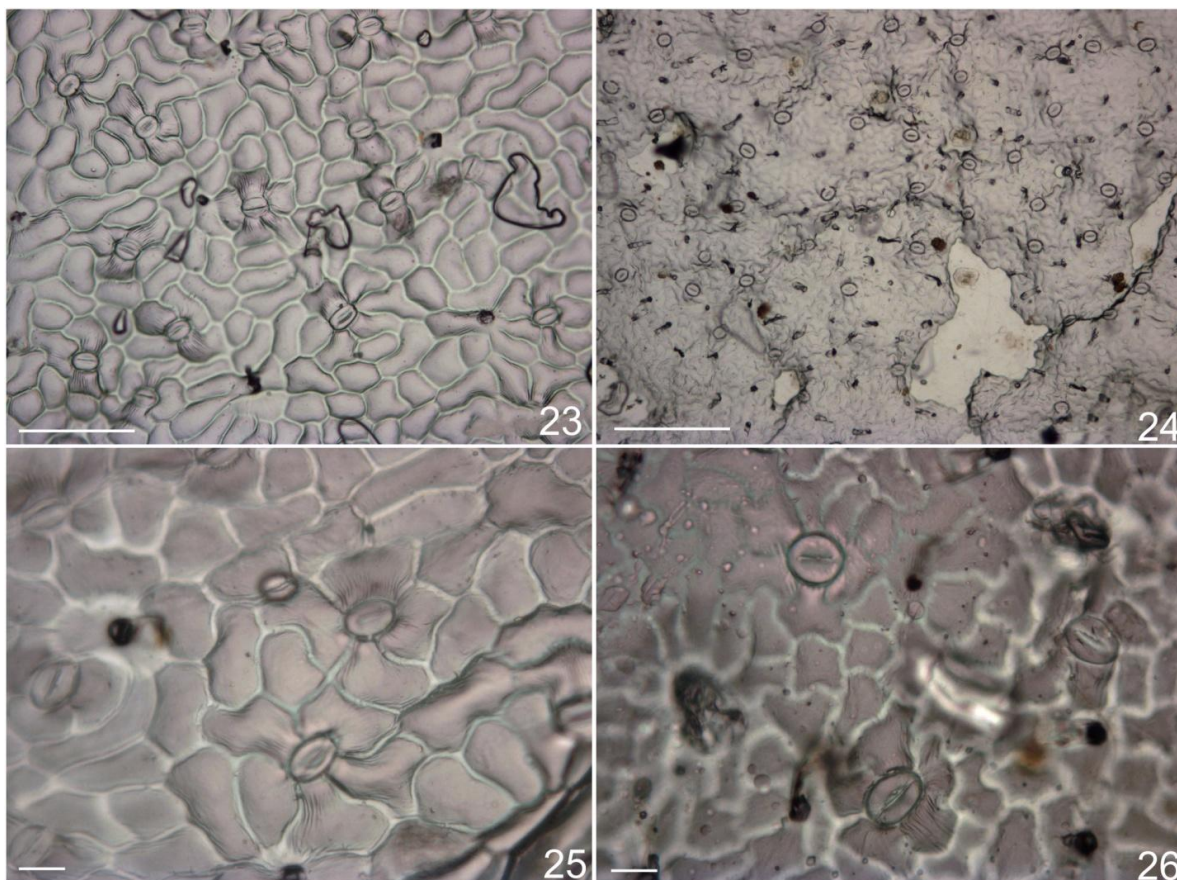


Tabla R. Adaksijalni epidermis *X. annuum* (23, 25) i *X. cylindraceum* (24, 26). Bar = 200  $\mu\text{m}$  na 24; 100  $\mu\text{m}$  na 23; 20  $\mu\text{m}$  na 25 i 26.

Tabela 8. Anatomske karakteristike lista vrsta roda *Xeranthemum*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

	<i>X. annuum</i>	<i>X. cylindraceum</i>
<b>Debljina mladog lista (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Između nerava	137.7 $\pm$ 60.1	119.1 $\pm$ 11.8
U zoni srednjeg nerva	299.0 $\pm$ 21.6	297.5 $\pm$ 55.0
Adaksijalni epidermis	17.8 $\pm$ 8.0	12.6 $\pm$ 3.0
Palisadno tkivo	42.7 $\pm$ 18.5	40.6 $\pm$ 5.5
Sunderasto tkivo	66.8 $\pm$ 35.0	57.9 $\pm$ 11.3
Abaksijalni epidermis	10.3 $\pm$ 4.5	8.0 $\pm$ 2.4
<b>Debljina starijeg lista (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Između nerava	126.9 $\pm$ 24.4	124.5 $\pm$ 14.0
U zoni srednjeg nerva	317.7 $\pm$ 115.5	380.0 $\pm$ 78.8
Adaksijalni epidermis	17.3 $\pm$ 4.7	12.7 $\pm$ 2.8
Palisadno tkivo	41.9 $\pm$ 9.9	43.9 $\pm$ 7.2
Sunderasto tkivo	57.9 $\pm$ 16.0	60.2 $\pm$ 13.5
Abaksijalni epidermis	9.7 $\pm$ 3.2	7.7 $\pm$ 2.0



#### 4.3.2.5. Anatomske karakteristike cvasti

Poprečni i uzdužni preseki cvasti prikazani su na Tabli S. Na površini involukralnih brakteja obe istraživane vrste uočavaju se kristali (Tabla S27–28). Na centralnom delu involukralne brakteje kod *X. cylindraceum* može se uočiti indumentum, dok su kristali prisutni više na periferiji (Tabla S28). Ispod jednoslojnog epidermisa uočava se jednoslojni hipodermis i dobro razvijen višeslojni sklerenhim (Tabla S27–28). Ispod sklerenhima prisutno je rastresito parenhimsko tkivo sa provodnim snopićima.

Na poprečnim presecima cvasti, mogu se uočiti i cvetovi u različitim stadijumima razvićakoji su okruženi braktejama, odnosno paljama. Anatomija palja je slična anatomiji involukralnih brakteja osim što se na površini palja ne nalaze kristali (Tabla S29–30). U ranim fazama razvoja cvetova, samo se meristematsko tkivo uočava, a kroz različite faze razvoja pojedinačnih cvetova uočava se formiranje prašnika i polena (Tabla S30). Otvaranje antera je lateralno (Tabla S30). Krunica se sastoji od jednoslojnog epidermisa i mezofila koji sadrži parenhim sa kolateralnim provodnim snopićima. Na uzdužnim presecima cvasti kod obe istraživane vrste uočava se podcvetan plodnik. Semeni zametak je anatropan sa bazalnom placentacijom (Tabla S31–32). Embrion, parenhimski zid perikarpa, kao i polenova zrna u anteri prašnika se jasno uočavaju (Tabla S31–32).



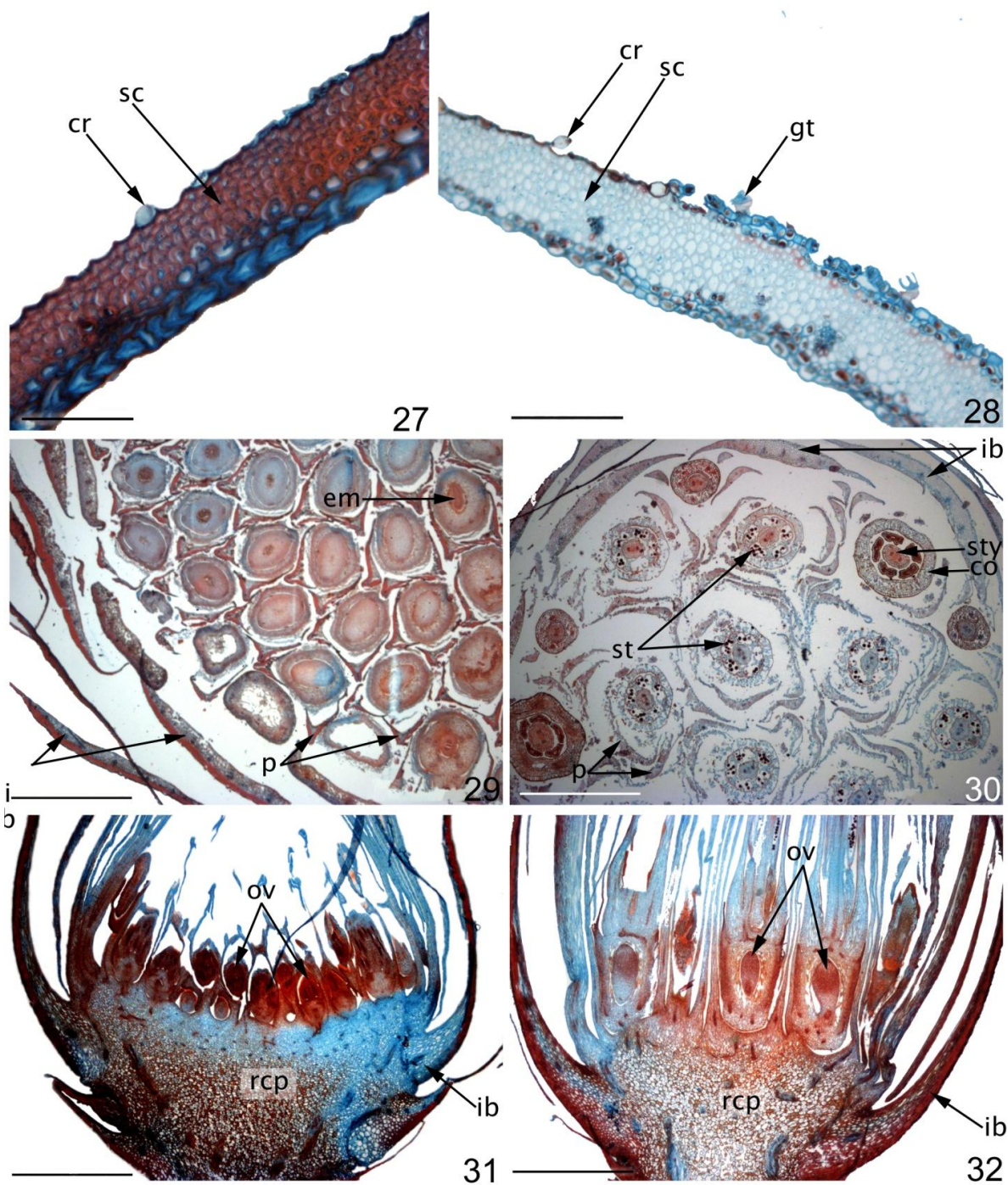


Tabla S. Poprečni (27, 28, 29, 30) i uzdužni presecci cvasti (31, 32) *X. annuum* (27, 29, 31) i *X. cylindraceum* (28, 30, 32). Cr = kristal; Sc = sklerenhim; Gt = žlezdana trihoma; Ib = involukralna brakteja; P = palea; Em = embrion; St = prašnik; Sty = stubić; Co = krunica; Ov = semeni zametak; Rcp = receptakulum. Bar = 1000 µm na 29, 30, 31 i 32; 100 µm na 28; 50 µm na 27.

Tabela 9. Dijagnostički kvalitativni karakteri lista, stabla i drške cvasti vrsta roda *Xeranthemum*.

		<i>X. annuum</i>	<i>X. cylindraceum</i>
<b>List</b>			
Struktura lista	Dorziventralna	+	+
Antiklinalni zidovi ćelija epidermisa	Izvijugani	+	+
Anomocitne stome		+	+
Nežlezdane trihome	Vermiformne	+	+
Žlezdane trihome	Biserijatne	+	-
	Kapitatne	-	+
	sesilne		
Palisadno tkivo	Kompaktno	+	+
Omotač snopića se prostire do epidermisa		+	+
Raspored tkiva ksilema u glavnom nervu	Regularan	+	+
Istaknuti glavni nerv		+	+
<b>Stablo i drška cvasti</b>			
Oblik poprečnog preseka mladog stabla i drške cvasti	Pentagonalan	-	+
	Sa pet rebara	+	-
Oblik poprečnog preseka starijeg stabla i drške cvasti	Poligonalan	+	+
Epidermske ćelije	Izodijametrične	+	+
Nežlezdane trihome	Vermiformne	+	+
Žlezdane trihome	Biserijatne	+	-
	Kapitatne	-	+
	sesilne		
Kolenhim	U rebrima	+	+
Hlorenhim	Kompaktan	+	+
Prisustvo "kortikalnih" snopića		+	-

+ = prisustvo; - = odsustvo



#### 4.4. Fitohemija *Xeranthemum* grupe

##### 4.4.1. Masne kiseline iz cipsela balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*

Sastav masnih kiselina cipsela četiri balkanska taksona roda *Amphoricarpos* prvi put je urađen u ovom istraživanju.

GC- FID analizom detektovano je ukupno osam masnih kiselina (Tabela 10). Od osam masnih kiselina šest je identifikovano, od palmitinske (C16:0) do stearinske (C18:0) masne kiseline. Dominantna masna kiselina kod svih istraživanih taksona je linolna, sa najvećim procentom (57.67%) kod obodnih cipsela taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* i najmanjim kod centralnih cipsela *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (31.8%).

Kod obodnih cipsela *A. neumayrianus* subsp. *neumayerianus* detektovano je sedam masnih kiselina, a identifikovano šest (96.95%). Dominantna masna kiselina je linolna (54.26%). Masna kiselina sa najmanjim procentom je margarinska (1.20%). U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline (81.77%): mononezasićene sa 25.62% i polinezasićene sa 56.15% od ukupnih masnih kiselina. Tako da zasićene masne kiseline imaju udela od 15.18% (U/S index je 5.38). 18:3/18:2 (linolenska/linolna) odnos je 0.03. GC - FID hromatogram profila masnih kiselina obodnih cipsela dat je u Prilogu 1. Kod centralnih cipsela ove vrste detektovano je šest masnih kiselina, od kojih je pet identifikovano (97.14%). Dominantna masna kiselina je linolna (41.10%). Masna kiselina sa najmanjim procentom (2.86%) je neidentifikovana. U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline (82.71%): mononezasićene sa 38.67% i polinezasićene sa 44.04% od ukupnih masnih kiselina. Dakle zasićene masne kiseline imaju udela od 14.43% (U/S index je 5.73). 18:3/18:2 (linolenska/linolna) odnos je 0.07. GC - FID hromatogram profila masnih kiselina centralnih cipsela dat je u Prilogu 2.

Kod obodnih cipsela *A. neumayrianus* subsp. *murbeckii* detektovano je šest masnih kiselina, od kojih je pet identifikovano (94.04%). Dominantna masna kiselina je linolna (39.51%). Masna kiselina sa najmanjim procentom je linolenska (2.44%). U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline (78.12%): mononezasićene sa 36.17% i polinezasićene sa 41.59% od ukupnih masnih kiselina. Dakle zasićene masne kiseline imaju



udela od 15.92% (U/S index je 4.90). 18:3/18:2 (linolenska/linolna) odnos je 0.06. GC - FID hromatogram profila masnih kiselina obodnih cipsela dat je u Prilogu 3. U centralnim cipselama ovog taksona detektovano je šest masnih kiselina, od kojih je pet identifikovano (95.58%). Dominantna masna kiselina je linolna (42.78%). Masna kiselina sa najmanjim procentom je linolenska (2.94%). U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline (85.22%): mononezasićene sa 39.50 i polinezasićene sa 45.72% od ukupnih masnih kiselina. Dakle zasićene masne kiseline imaju udela od 10.36% (U/S index je 8.22). 18:3/18:2 (linolenska/linolna) odnos je 0.07. GC - FID hromatogram profila masnih kiselina centralnih cipsela prikazan je u Prilogu 4.

Kod obodnih cipsela *A. autariatus* subsp. *bertisceus* detektovano je šest masnih kiselina, od kojih je pet identifikovano (93.95%). Dominantna masna kiselina je linolna (41.60%). Masna kiselina sa najmanjim procentom je linolenska (2.50%). U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline (81.29%): mononezasićene sa 37.19% i polinezasićene sa 44.1% od ukupnih masnih kiselina. Zasićene masne kiseline imaju udela od 12.66% (U/S index je 6.42). 18:3/18:2 (linolenska/linolna) odnos je 0.06. GC - FID hromatogram profila masnih kiselina obodnih cipsela dat je u Prilogu 5. U centralnim cipselama ove vrste detektovano je pet masnih kiselina, od kojih je četiri identifikovano (88.52%). Dominantna masna kiselina je linolna (31.80%). Masna kiselina sa najmanjim procentom je neidentifikovana (11.48%). U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline (62.43%): mononezasićene sa 30.63% i polinezasićene sa 31.80% od ukupnih masnih kiselina. Tako da zasićene masne kiseline imaju udela od 26.09% (U/S index je 2.39). GC - FID hromatogram profila masnih kiselina centralnih cipsela prikazan je u Prilogu 6.

Kod obodnih cipsela *A. autariatus* subsp. *autariatus* detektovano je osam masnih kiselina, od kojih je šest identifikovano (97.47%). Dominantna masna kiselina je linolna (57.67%). Masna kiselina sa najmanjim procentom je margarinska (0.64%). U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline (85.33%): mononezasićene sa 25.65% i polinezasićene sa 59.68% od ukupnih masnih kiselina. Zasićene masne kiseline imaju udela od 12.13% (U/S index je 7.03). 18:3/18:2 (linolenska/linolna) odnos je 0.03. GC - FID hromatogram profila masnih kiselina obodnih cipsela dat je u Prilogu 7. U



centralnim cipselama ove vrste detektovano je šest masnih kiselina, od kojih je pet identifikovano (95.22%). Dominantna masna kiselina je linolna (57.20%). Masna kiselina sa najmanjim procentom je linolenska (1.96%). U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline (81.58%): mononezasićene sa 22.42% i polinezasićene sa 59.16% od ukupnih masnih kiselina. Zasićene masne kiseline imaju udela od 13.64% (U/S index je 5.98). 18:3/18:2 (linolenska/linolna) odnos je 0.03. GC - FID hromatogram profila masnih kiselina centralnih cipsela dat je u Prilogu 8.



Tabela 10. Sastav masnih kiselina cipsela Balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Sistematsko ime	Trivijalno ime	<i>A. neumayrianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i>		<i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>murbeckii</i>		<i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertisceus</i>		<i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i>	
		obodne <sup>b</sup>	centralne <sup>b</sup>	obodne <sup>b</sup>	centralne <sup>b</sup>	obodne <sup>b</sup>	centralne <sup>b</sup>	obodne <sup>b</sup>	centralne <sup>b</sup>
Ni <sup>a</sup>		0.00	2.86 $\pm$ 0.08	5.96 $\pm$ 0.03	4.42 $\pm$ 0.23	6.05 $\pm$ 0.48	11.48 $\pm$ 0.37	1.21 $\pm$ 0.08	4.78 $\pm$ 0.15
Ni <sup>a</sup>		3.05 $\pm$ 0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.32 $\pm$ 0.08	0.00
heksadekanoinska kiselina (C16:0)	palmitinska kiselina	10.14 $\pm$ 0.12	10.16 $\pm$ 0.05	11.33 $\pm$ 0.14	7.21 $\pm$ 0.1	9.08 $\pm$ 0.03	19.98 $\pm$ 0.11	8.28 $\pm$ 0.02	9.89 $\pm$ 0.05
heptadekanoinska kiselina (C16:0)	margarinska kiselina	1.20 $\pm$ 0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64 $\pm$ 0.03	0.00
(9Z,12Z)-9,12-oktadekanoinska kiselina (C18:2)	linolna kiselina	54.26 $\pm$ 0.27	41.10 $\pm$ 0.17	39.51 $\pm$ 0.37	42.78 $\pm$ 0.03	41.60 $\pm$ 0.20	31.80 $\pm$ 0.10	57.67 $\pm$ 0.02	57.20 $\pm$ 0.22
((9Z)-oktadek-9-enoinska kiselina (C18:1)	oleinska kiselina	25.62 $\pm$ 0.05	38.67 $\pm$ 0.13	36.17 $\pm$ 0.11	39.50 $\pm$ 0.04	37.19 $\pm$ 0.18	30.63 $\pm$ 0.27	25.65 $\pm$ 0.06	22.42 $\pm$ 0.03
all-cis-6,9,12-oktadekatrienoinska kiselina (C18:3)	linolenska kiselina	1.89 $\pm$ 0.4	2.94 $\pm$ 0.25	2.44 $\pm$ 0.58	2.94 $\pm$ 0.20	2.50 $\pm$ 0.12	0.00	2.01 $\pm$ 0.08	1.96 $\pm$ 0.17
oktadekanoinska kiselina (C18:0)	stearinska kiselina	3.84 $\pm$ 0.04	4.27 $\pm$ 0.04	4.58 $\pm$ 0.07	3.16 $\pm$ 0.06	3.58 $\pm$ 0.06	6.11 $\pm$ 0.10	3.21 $\pm$ 0.05	3.75 $\pm$ 0.06
Ukupno		100	100	99.99	100	100	100	99.99	100

<sup>a</sup>Nije identifikovano, <sup>b</sup> relativne količine masnih kiselina (%) određenih pomoću GC- FID analize.



#### 4.4.2. Masne kiseline iz cipsela vrste *Xeranthemum cylindraceum*

Sastav masnih kiselina cipsela vrste *X. cylindraceum* je po prvi put prikazan u ovom istraživanju.

GC - FID analizom detektovano je ukupno 12 masnih kiselina (99.99%) (Tabela 11). Od 12 masnih kiselina devet je identifikovano (88.57%), od palmitoleinske (C16:1) do behenske (C22:0) masne kiseline. Dominantna masna kiselina je oleinska (55.24%). Ostale masne kiseline sa visokim procentom su linolna (16.48%) i palmitinska (8.88%). Masna kiselina sa najmanjim procentom je palmitoleinska (0.30%). U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline (75.02%): mononezasićene sa 55.97% i polinezasićene sa 19.05% od ukupnih masnih kiselina. Zasićene masne kiseline imaju udela od 13.55% (U/S index je 5.53). 18:3/18:2 (linolenska/linolna) odnos je 0.156. GC - FID hromatogram profila masnih kiselina cipsela dat je u Prilogu 9.

Tabela 11. Sastav masnih kiselina cipsela *Xeranthemum cylindraceum*. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Sistematsko ime	Trivijalno ime	Količina masnih kiselina [%] <sup>b</sup>
Ni <sup>a</sup>	-	1.30 $\pm$ 0.10
(9Z)-heksadek-9-enoinska kiselina (C16:1)	palmitoleinska kiselina	0.30 $\pm$ 0.01
heksadekanoinska kiselina (C16:0)	palmitinska kiselina	8.88 $\pm$ 0.02
Ni <sup>a</sup>	-	7.72 $\pm$ 0.03
Ni <sup>a</sup>	-	2.40 $\pm$ 0.06
(9Z,12Z)-9,12-oktadekadienoinska kiselina (C18:2)	linolna kiselina	16.48 $\pm$ 0.03
(9Z)-oktadek-9-enoinska kiselina (C18:1)	oleinska kiselina	55.24 $\pm$ 0.07
all-cis-6,9,12-oktadekatrienoinska kiselina (C18:3)	linolenska kiselina	2.57 $\pm$ 0.10
oktadekaoinska kiselina (C18:0)	stearinska kiselina	3.33 $\pm$ 0.02
(n-9)-cis-11-eikozenoinska kiselina (C20:1)	eikozenoinska kiselina	0.43 $\pm$ 0.01
eikozanoinska kiselina (C20:0)	arahidinska kiselina	0.97 $\pm$ 0.04
dokozanoinska kiselina (C22:0)	behenska kiselina	0.37 $\pm$ 0.01
Ukupno		99.99

<sup>a</sup>Nije identifikovano; <sup>b</sup> relativne količine masnih kiselina određenih pomoću GC-FID analize





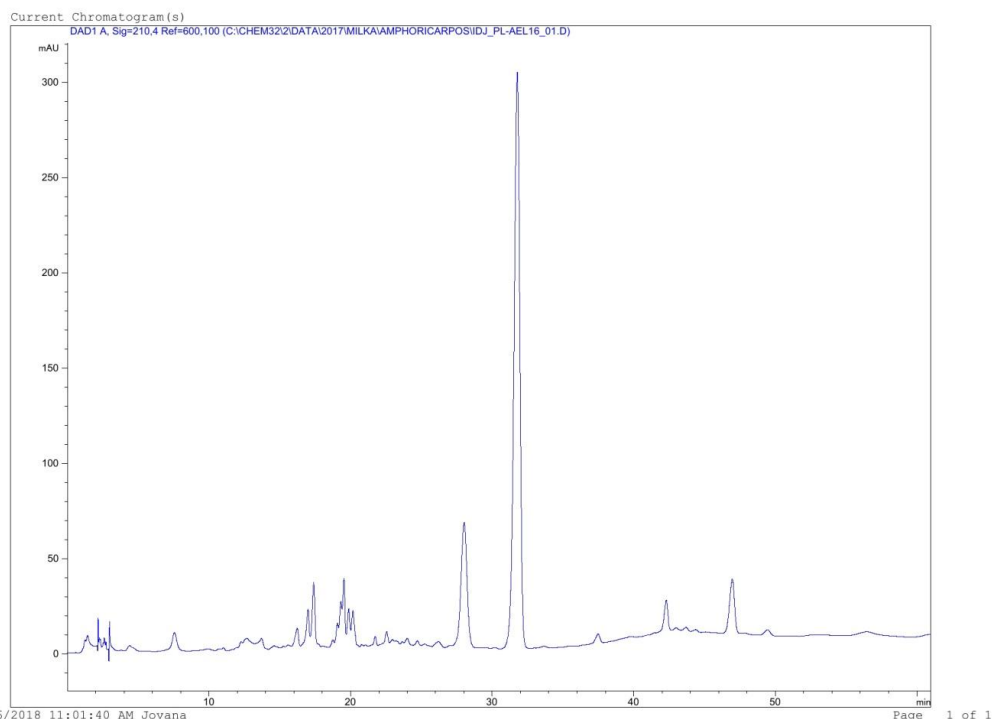
#### 4.4.3. Identifikacija i karakterizacija 3-deoksiamforikarpolida vrste *Amphoricarpos elegans*

Prisustvo dominantnog seskviterpenskog laktona u vrsti *A. elegans* je po prvi put prikazano u ovom istraživanju.

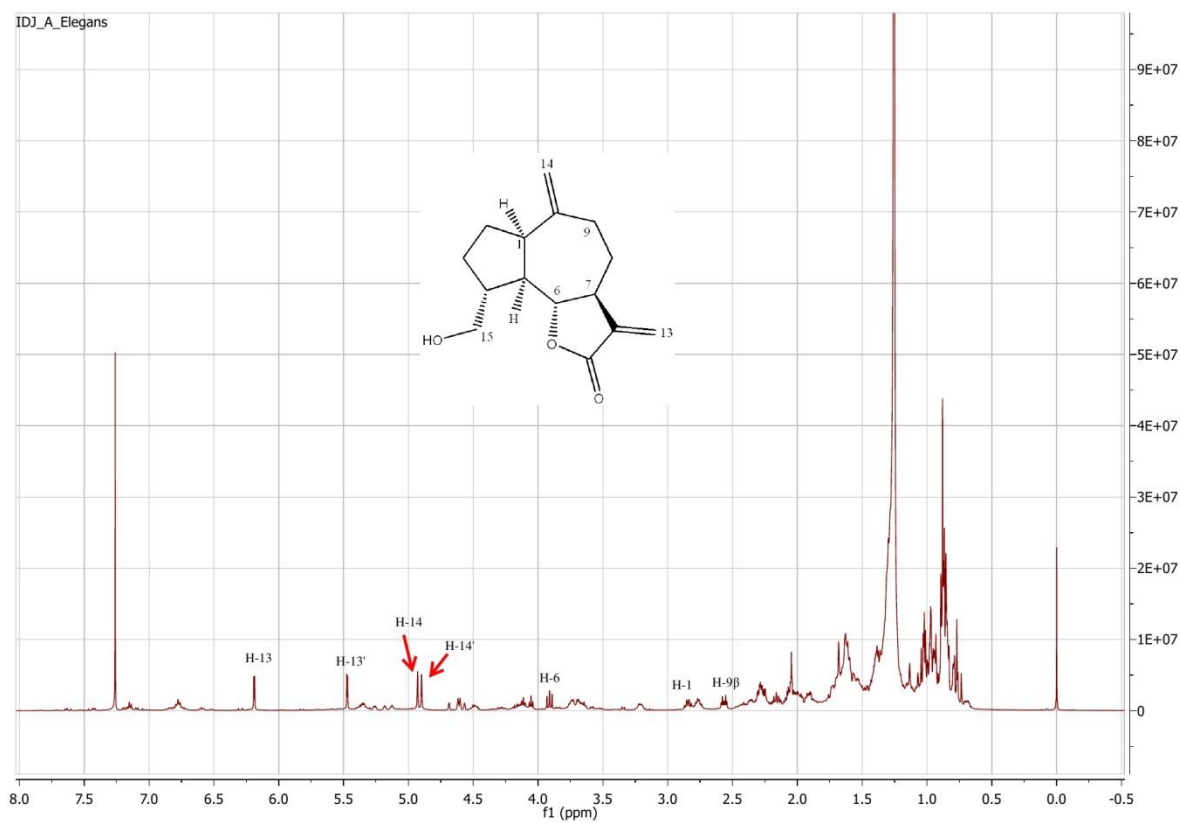
U HPLC hromatogramu ekstrakta vrste *Amphoricarpos elegans* jedan pik je dominantan (Slika 24). Nakon poređenja sa hromatogramima i retencionim karakteristikama prethodno izolovanih i karakterisanih amforikarpolida iz balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*, utvrđeno je da dominantni pik odgovara jedinjenju 3-deoksiamforikarpolidu (Djordjević i sar. 2004).

$^1\text{H}$  NMR spektar ekstrakta vrste *A. elegans* (Slika 25) potvrdio je HPLC rezultate. Signali od H-14, H-14', H-13, H-13', H-6, H-1 i H-9 $\beta$  su u saglasnosti sa prethodno izolovanim i karakterisanim jedinjenjem iz balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* (Djordjević i sar. 2004).

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



Slika 24. HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta vrste *Amphoricarpos elegans*



Slika 25.  $^1\text{H}$  NMR spektar metanolnog ekstrakta vrste *Amphoricarpos elegans*



#### 4.4.4. Fenolni profili taksona roda *Amphoricarpos*

Sastav fenolnih jedinjenja iz listova četiri balkanska taksona roda *Amphoricarpos* po prvi put je urađen je u ovom istraživanju.

Orbitrap masenom spektrometrijom detektovano je i identifikovano ukupno 30 fenolnih jedinjenja (Tabela 12). Od toga, 11 jedinjenja pripada grupi fenolnih kiselina i derivata, sedam jedinjenja pripada grupi flavonoidnih-glikozida, 11 jedinjenja pripada grupi flavona, a jedno jedinjenje pripada grupi flavanona.

U uzorcima intaktnih listova ukupno je detektovano i identifikovano 16 fenolnih jedinjenja i to: četiri iz grupe fenolnih kiselina i derivata, jedno jedinjenje iz grupe flavonoidnih-glikozida, deset jedinjenja iz grupe flavona i jedno jedinjenje iz grupe flavanona. Od 16 identifikovanih jedinjenja osam jedinjenja se nalaze u tragovima. U uzorcima samlevenih listova sva jedinjenja su identifikovana, ali se 22 jedinjenja nalaze u tragovima.

Dominantno jedinjenje u uzorcima intaktnih listova svih istraživanih taksona je hrizoeriol sa najvećom detektovanom količinom (8.276 mg/L) kod taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*. Dominantno jedinjenje u uzorcima samlevenih listova svih istraživanih taksona je 5-*O*-kafeoilhinska kiselina sa najvećom detektovanom količinom (6.715 mg/L) kod taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*. Izuzetak je takson *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* kod koga je dominantno jedinjenje hrizoeriol (4.216 mg/L).

U uzorku intaktnih listova taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* identifikovano je 13 fenolnih jedinjenja, od toga četiri iz grupe fenolnih kiselina i derivata, jedno iz grupe flavonoidnih-glikozida, sedam iz grupe flavona i jedno iz grupe flavanona. Od 13 fenolnih jedinjenja pet se nalazi u tragovima. Dominantno jedinjenje je hrizoeriol (1.633 mg/L). Drugo dominantno jedinjenje je akacetin (0.169 mg/L).

U uzorku intaktnih listova taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* identifikovano je 13 fenolnih jedinjenja, od toga četiri iz grupe fenolnih kiselina i derivata, jedno iz grupe flavonoidnih-glikozida, sedam iz grupe flavona i jedno iz grupe flavanona.



Od 13 fenolnih jedinjenja pet se nalazi u tragovima. Dominantno jedinjenje je hrizoeriol (8.276 mg/L). Drugo dominantno jedinjenje je naringenin (1.050 mg/L).

U uzorku intaktnih listova taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* identifikovano je 13 fenolnih jedinjenja, od toga četiri iz grupe fenolnih kiselina i derivata, jedno iz grupe flavonoidnih-glikozida i osam iz grupe flavona. Jedinjenje iz grupe flavanona nije pronađeno. Od 13 fenolnih jedinjenja sedam se nalazi u tragovima. Dominantno jedinjenje je hrizoeriol (0.828 mg/L). Drugo dominantno jedinjenje je *p*-kumarinska kiselina (0.529 mg/L).

U uzorku intaktnih listova taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* identifikovano je 15 fenolnih jedinjenja, od toga četiri iz grupe fenolnih kiselina i derivata, jedno iz grupe flavonoidnih-glikozida, deset iz grupe flavona i jedno iz grupe flavanona. Od 15 fenolnih jedinjenja osam se nalazi u tragovima. Dominantno jedinjenje je hrizoeriol (5.384 mg/L). Drugo dominantno jedinjenje je akacetin (0.853 mg/L).

U uzorku samlevenih listova taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* identifikovano je 27 fenolnih jedinjenja, od toga 11 iz grupe fenolnih kiselina i derivata, sedam iz grupe flavonoidnih-glikozida, osam iz grupe flavona i jedno iz grupe flavanona. Od 27 fenolnih jedinjenja 19 se nalazi u tragovima. Dominantno jedinjenje je 5-*O*-kafeoilhinska kiselina (6.566 mg/L). Drugo dominantno jedinjenje je hrizoeriol (1.864 mg/L).

U uzorku samlevenih listova taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* identifikovano je 27 fenolnih jedinjenja, od toga 11 iz grupe fenolnih kiselina i derivata, sedam iz grupe flavonoidnih-glikozida, osam iz grupe flavona i jedno iz grupe flavanona. Od 27 fenolnih jedinjenja 19 se nalazi u tragovima. Dominantno jedinjenje je 5-*O*-kafeoilhinska kiselina (6.715 mg/L). Drugo dominantno jedinjenje je hrizoeriol (4.500 mg/L).

U uzorku samlevenih listova taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* identifikovana su 22 fenolna jedinjenja, od toga devet iz grupe fenolnih kiselina i derivata, pet iz grupe flavonoidnih-glikozida i osam iz grupe flavona. Jedinjenje iz grupe flavanona nije pronađeno. Od 22 fenolna jedinjenja 16 se nalazi u tragovima. Dominantno jedinjenje je 5-*O*-kafeoilhinska kiselina (2.866 mg/L). Drugo dominantno jedinjenje je *p*-kumarinska kiselina (0.848 mg/L).



U uzorku samlevenih listova taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* identifikovano je 25 fenolnih jedinjenja, od toga devet iz grupe fenolnih kiselina i derivata, četiri iz grupe flavonoidnih-glikozida, 11 iz grupe flavona i jedno iz grupe flavanona. Od 25 fenolnih jedinjenja 17 se nalazi u tragovima. Dominantno jedinjenje je hrizoeriol (4.216 mg/L). Drugo dominantno jedinjenje je 5-*O*-kafeoilhinska kiselina (3.585 mg/L).

Poređenjem uzorka intaktnih i samlevenih listova uočava se razlika u fenolnom profilu kod svih istraživanih taksona. Kod taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* u uzorcima intaktnih listova identifikovano je 13 fenolnih jedinjenja, dok je u uzorku samlevenih listova identifikovano 27 jedinjenja. To se odnosi na jedinjenja koja se nalaze u tragovima u uzorku samlevenih listova. Kod oba uzorka količina osam istih jedinjenja je određena. Dominantno jedinjenje se razlikuje: hrizoeriol kod intaktnih listova, a 5-*O*-kafeoilhinska kiselina kod samlevenih listova.

Kod taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* u uzorcima intaktnih listova identifikovano je 13 fenolnih jedinjenja, dok je u uzorku samlevenih listova identifikovano 26 jedinjenja. Takođe, razlika je u identifikaciji jedinjenja koja se nalaze u tragovima u uzorku samlevenih listova. Kod oba uzorka količina osam istih jedinjenja je određena. Dominantno jedinjenje se razlikuje: hrizoeriol kod intaktnih listova, a 5-*O*-kafeoilhinska kiselina kod samlevenih listova.

Kod taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* u uzorcima intaktnih listova identifikovano je 13 fenolnih jedinjenja, dok su u uzorku samlevenih listova identifikovana 22 jedinjenja. Takođe, razlika je u identifikaciji jedinjenja koja se nalaze u tragovima u uzorku samlevenih listova. Kod oba uzorka količina šest istih jedinjenja je određena. Dominantno jedinjenje se razlikuje: hrizoeriol kod intaktnih listova, a 5-*O*-kafeoilhinska kiselina kod samlevenih listova.

Kod taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* u uzorcima intaktnih listova identifikovano je 15 fenolnih jedinjenja, dok je u uzorku samlevenih listova identifikovano 25 jedinjenja. Takođe, razlika je u identifikaciji jedinjenja koja se nalaze u tragovima u uzorku samlevenih listova. Kod oba uzorka količina osam istih jedinjenja je određena. Dominantno jedinjenje u oba uzorka je isto: hrizoeriol.

Tabela 12. Fenolna jedinjenja identifikovana u ekstraktima listova balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*

Takson		AAA*	ANM*	AAB*	ANN*	AAA**	ANM**	AAB**	ANN**
Br.	Naziv jedinjenja	mg/L							
<i>Fenolne kiseline i derivati</i>									
1	3- <i>O</i> -kafeoilhinska kiselina	–	–	–	–	+	+	+	+
2	5- <i>O</i> -kafeoilhinska kiselina (hlorogena kiselina) <sup>a</sup>	0,062	0,172	0,069	0,208	6,566	6,715	2,866	3,585
3	Heksozid kumarinske kiseline	–	–	–	–	+	+	+	+
4	<i>p</i> -hidroskibenzoeva kiselina <sup>a</sup>	0,068	0,062	0,058	0,147	0,145	0,094	0,157	0,285
5	<i>cis</i> -5- <i>O</i> -kafeoilhinska kiselina	–	–	–	–	+	+	+	+
6	Izomer 1 dikafeoilhinske kiseline	–	–	–	–	+	+	–	–
7	Kafena kiselina <sup>a</sup>	0,087	0,095	0,086	0,088	0,093	0,098	0,174	0,099
8	5- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroilhinska kiselina	–	–	–	–	+	+	+	+
9	<i>cis</i> -5- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroilhinska kiselina	–	–	–	–	+	+	+	+
10	<i>p</i> -kumarinska kiselina <sup>a</sup>	0,140	0,383	0,529	0,251	0,261	0,316	0,848	0,159
11	Izomer 2 dikafeoilhinske kiseline	–	–	–	–	+	+	–	–
<i>Flavonoidni-glikozidi</i>									
12	Luteolin 6- <i>C</i> -pentozid-8- <i>C</i> -heksozid	–	–	–	–	+	+	–	–
13	Apigenin 6- <i>C</i> -heksozid-8- <i>C</i> -pentozid	–	–	–	–	+	+	+	+
14	Luteolin 6- <i>C</i> -heksozid	–	–	–	–	+	+	+	+
15	Luteolin 7- <i>O</i> -rutinozid	–	–	–	–	+	+	+	–
16	Apigenin 8- <i>C</i> -glukozid	–	–	–	–	+	+	+	+
17	Tetrahidroski-monometoksi-flavon <i>O</i> -rutinozid	–	–	–	–	+	+	–	–
18	Hrizoeriol 7- <i>O</i> -rutinozid	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Flavoni</i>									
19	Dihidroksi-monometoksi-flavon	–	–	–	–	+	+	+	+
20	Dihidroksi-dimetoksi-flavon <i>O</i> -heksozid	+	+	+	+	+	+	+	+
21	Izomer 1 dihidroksi-dimetoksi-flavona	+	+	+	+	+	+	+	+
22	Tetrahidroksi-monometoksi-flavon	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Apigenin <sup>a</sup>	0,041	0,259	–	0,085	0,076	0,068	–	0,064
24	Hrizoeriol <sup>a</sup>	1,633	8,276	0,828	5,384	1,864	4,500	0,667	4,216
25	Izomer 1 trihidroski-dimetoksi-flavona	–	–	–	+	–	–	–	+
26	Izomer 2 trihidroski-dimetoksi-flavona	–	–	+	+	–	–	–	+

Tabela 12. Fenolna jedinjenja identifikovana u ekstraktima listova balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* (nastavak)

<i>Flavoni</i>									
27	Akacetin <sup>a</sup>	0,169	0,255	0,172	0,853	0,158	0,082	0,127	0,745
28	Izomer 2 dihidroski-dimetoksi-flavona	+	+	+	+	+	+	+	+
29	Izomer 3 trihidroski-dimetoksi-flavona	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>Flavanoni</i>									
30	Naringenin <sup>a</sup>	0,033	1,050	-	0,061	0,044	0,303	-	0,036

<sup>a</sup>Identifikovano na osnovu dostupnog standarda; \*intaktni listovi; \*\* samleveni listovi. AAA - *Amphoricarpos autariatus* subsp. *autariatus*; ANM - *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*; AAB - *A. autariatus* subsp. *bertisceus*; ANN - *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*. + = prisustvo jedinjenja u tragovima; - = odsustvo jedinjenja u tragovima.



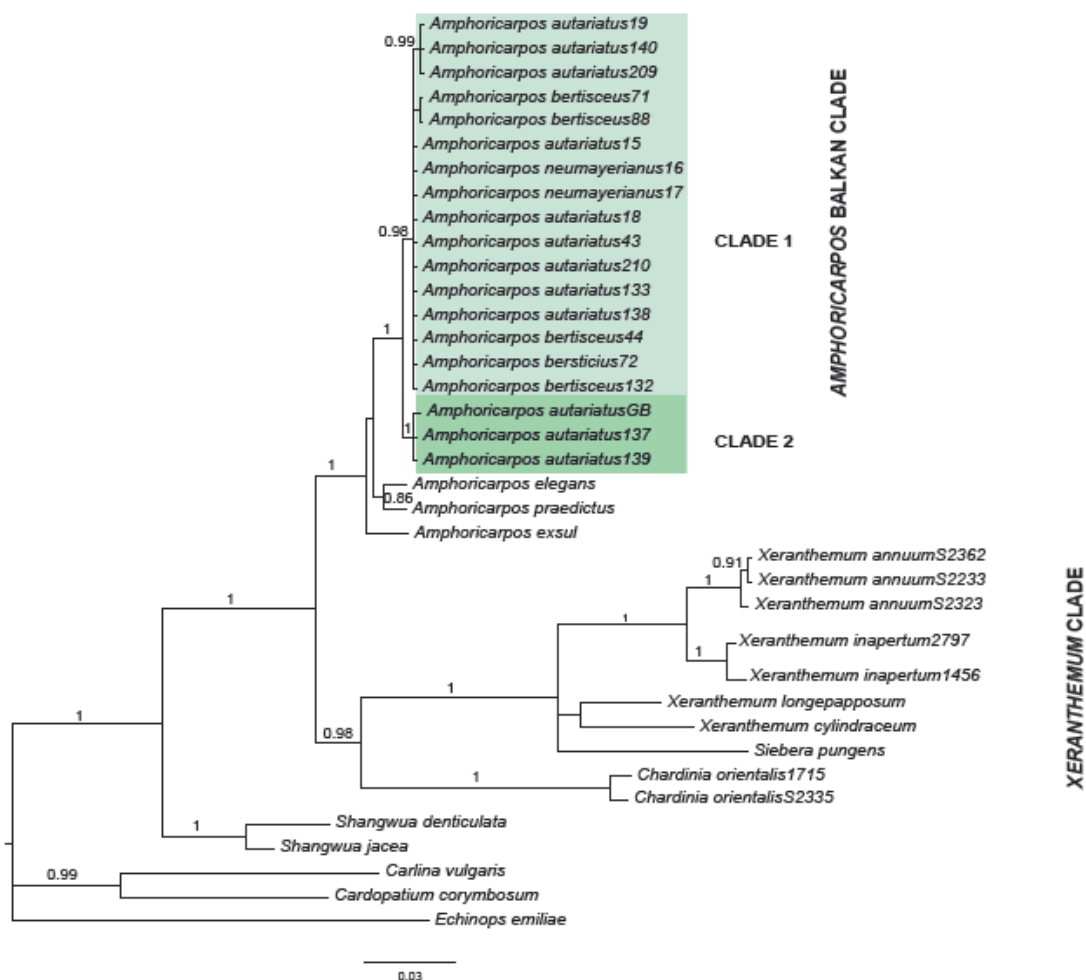
#### 4.5. Molekularne i filogenetske analize *Xeranthemum* grupe

Skrining 12 plastidnih markera kod jedinki iz reprezentativnih populacija balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* pokazao je da samo *trnS* marker pruža odgovarajuće informacije (Prilog 10) i daje sličnu topologiju kao i podaci jedarnih markera, ali sa veoma malom podrškom. Ipak, uzeti su u obzir i jedarni markeri i kombinovani rezultati jedarnih i plastidnih markera.

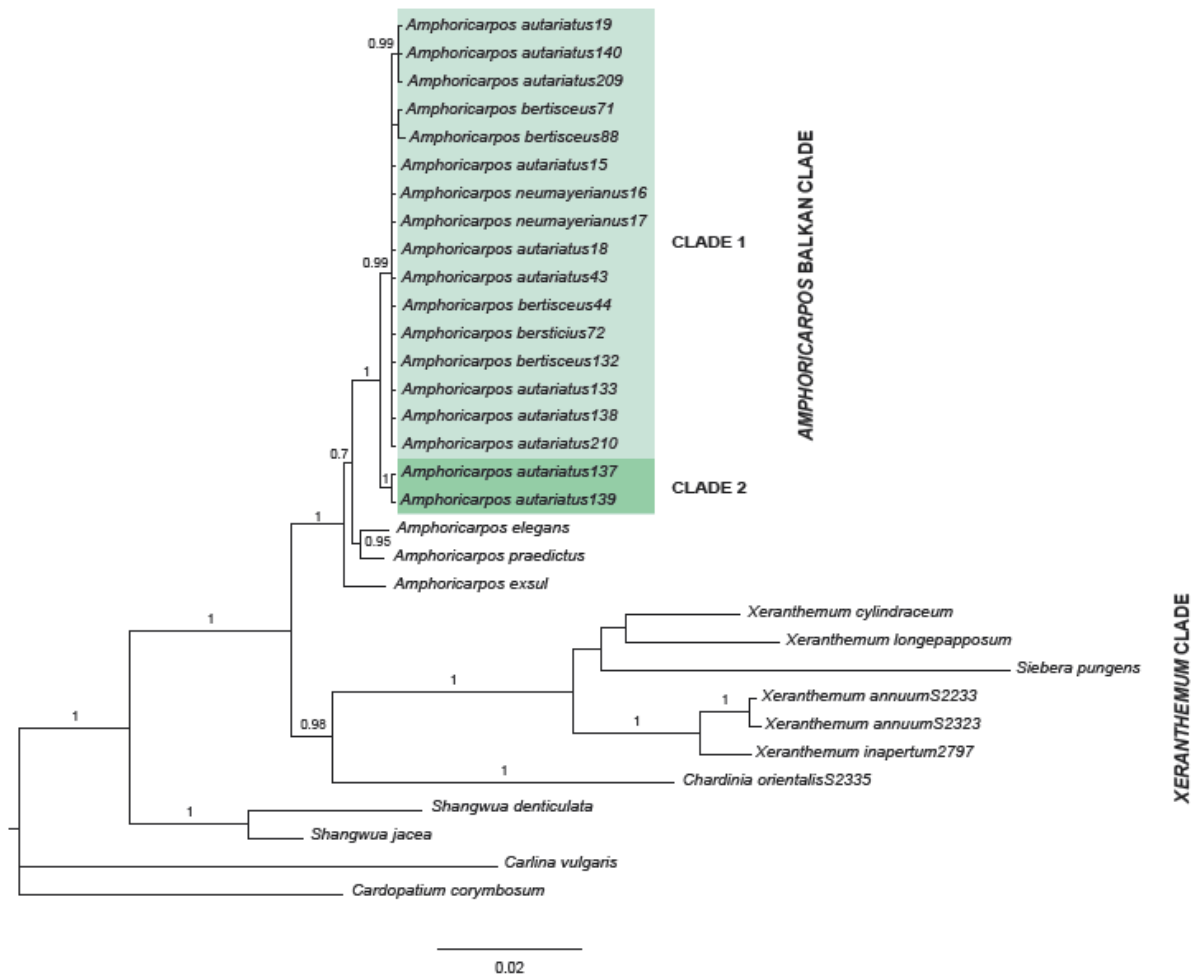
Obe analize, sa veoma visokom podrškom (PP=1 za obe analize, Slike 26 i 27) su pokazale da je rod *Amphoricarpos* monofiletski i sestrinski je kladi koju obrazuju rodovi *Chardinia*, *Siebera* i *Xeranthemum* (*Xeranthemum* klada, Slika 26) koji sadrže samo jednogodišnje predstavnike. *Shangwua* je sestrinska obema kladama, kao što su i sugerisali Herrando-Moraira i sar. (2019).

U okviru roda *Amphoricarpos* rezolucija se pokazala niskom u svakoj od analiza. Bez obzira na to, ITS i kombinovana filogenija su dali značajne rezultate (Slike 26 i 27). Na početku, turske i kavkaske vrste (*A. elegans*, *A. exsul* i *A. praedictus*) su sestrinske kladi koju formiraju balkanski predstavnici roda (balkanska klada, Slike 26 i 27). *A. elegans* i *A. praedictus* formiraju kladu sa umerenom podrškom na osnovu analize kombinovanih podataka (PP=0.95, Slika 27). Balkanske vrste su podeljene u dve dobro podržane klade: jedna koju formiraju bosansko-hercegovačke populacije *A. autariatus* (Klada 2 Slike 26 i 27), odnosno *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*, sa veoma dobrom podrškom (PP=1 u odnosu na oba tipa podataka). Ova klada je sestrinska kladi koju čine predstavnici ostalih populacija (Klada 1 na Slikama 26 i 27), takođe sa visokom podrškom (PP=0.98 i PP=0.99). U okviru ove klade, populacije različitih taksona se mešaju. Jedino podklada koju formiraju tri populacije vrste *A. autariatus* (19 - kanjon Drage, 140 - Trsa, 209 - kanjon Sutjeske) je podržana (PP=0.99 za oba tipa podataka). Filogenija na osnovu plastidnih markera (Prilog 10) pokazala je sličnu topologiju, ali je podrška za unutrašnje klade veoma mala.





Slika 26. Bajesova analiza (Bayesian inference BI) filogenetskih odnosa *Xeranthemum* grupe na osnovu ITS markeri. Posteriorne verovatnoće izvedene iz BI analize su naznačene na granama. Brojevi pored taksona na podkladama označavaju populacije iz kojih su uzimani uzorci za analizu (19 - kanjon Drage; 140 - Mratinje; 209 - kanjon Sutjeske; 71 - Grebaja; 88 - Visitor; 15 - Sinjajevina; 16 - Orjenske lokve, 17 - Lovćen, 18 - Đurđevića Tara; 43 - Maganik; 210 - kanjon Tare; 133 - Dobrilovina; 138 - Crvena greda; 44 - Komovi; 72 - Mali Kotao; 132 - Buni Jezerce; 137 - Čvrstica i 139 - Prenj). Dati lokaliteti su označeni sa + u koloni Molek. (Tabela 2).



Slika 27. Bajesova analiza (Bayesian inference BI) filogenetskih odnosa *Xeranthemum* grupe na osnovu kombinovanih podataka (ITS markeri + plastidni markeri). Posteriorne verovatnoće izvedene iz BI analize su naznačene na granama. Brojevi pored taksona na podkladama označavaju populacije iz kojih su uzimani uzorci za analizu (19 - kanjon Drage; 140 - Mratinje; 209 - kanjon Sutjeske; 71 - Grebaja; 88 - Visitor; 15 - Sinjajevina; 16 - Orjenske lokve, 17 - Lovćen, 18 - Đurđevića Tara; 43 - Maganik; 210 - kanjon Tare; 133 - Dobrilovina; 138 - Crvena greda; 44 - Komovi; 72 - Mali Kotao; 132 - Buni Jezercec; 137 - Čvrstica i 139 - Prenj). Dati lokaliteti su označeni sa + u koloni Molek. (Tabela 2).



#### 4.6. Biološka aktivnost

Antimikrobna i antioksidativna aktivnost ekstrakata listova taksona roda *Amphoricarpos* po prvi put je urađena u ovom istraživanju.

##### 4.6.1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata listova balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*

Rezultati *in vitro* antibakterijske aktivnosti suvog dietil-etarskog, 80% metanolnog i 50% acetonskog ekstrakta listova istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* na osam bakterijskih vrsta prikazani su u Tabeli 13. Inhibitorna aktivnost zabeležena je pri koncentraciji od 0.007 – 0.20 mg/mL, dok je baktericidni efekat zabeležen pri koncentraciji od 0.015 – 0.25 mg/mL. Najosetljiviji bakterijski sojevi bili su *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*, dok su *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas areuginosa* bili najotporniji na testirane ekstrakte. Oba komercijalna antibiotika pokazala su manju aktivnost od testiranih ekstrakata. Streptomycin je pokazao MIC od 0.04 – 0.26 mg/mL i MBC od 0.09 – 0.52 mg/mL, dok je ampicilin pokazao MIC od 0.25 – 0.74 mg/mL i MBCs od 0.37 – 1.24 mg/mL. Među ispitivanim taksonima, u odnosu na rastvarače, najveća antibakterijska aktivnost mogla bi biti predstavljena na sledeći način: među metanolnim ekstraktima najbolju aktivnost je pokazao ekstrakt taksona *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, među dietil - etarskim ekstraktima najbolju aktivnost je pokazao ekstrakt taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus*, dok je među 50% acetonskim ekstraktima najbolju aktivnost pokazao ekstrakt taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus*. Antibakterijski potencijal testiranih ekstrakata mogao bi se predstaviti na sledeći način: 1 > 3 > 6 > 8 > 7 > 4 > 9 > 2 (Tabeli 13). Najveći i najniži antibakterijski potencijal utvrđen je za metanolni odnosno dietil-etarski ekstrakt taksona *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*.

Rezultati *in vitro* antifungalne aktivnosti suvog dietil-etarskog, 80% metanolnog i 50% acetonskog ekstrakta listova istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* na osam fungalnih vrsta prikazani su u Tabeli 14. Sve mikromicete su bile osetljive na testirane



ekstrakte. Ekstrakti su inhibirali sve mikromicete na koncentracijama od 0.001 - 0.4 mg/mL (MIC) i potpuno zaustavili rast (MFC) na 0.02 – 08 mg/mL. Najosetljivija vrsta je bila *Trichoderma viride*, dok je *Candida albicans* bila najotpornija na ekstrakte. Komercijalni antimikotici - bifonazol (MIC 0.10 – 0.20 mg/mL; MFC 0.20 – 0.25 mg/mL) i ketokonazol (MIC 0.15 – 2.50 mg/mL; MFC 0.20 – 3.50 mg/mL) bili su, generalno, manje aktivni od ekstrakta 1, 3, 5, 6. Ekstrakti 2, 4, 7, 8 i 9 su pokazali manju antifungalnu aktivnost od komercijalnih antimikotika sa izuzetkom u slučaju *T. viride* i vrsta roda *Penicillium*, gde su ekstrakti 2, 4, 7, 8 i 9 pokazali veću inhibitornu aktivnost. Ekstrakt 2 takođe je imao veći efekat od ketokonazola protiv svih gljiva osim *C. albicans* i *Aspergillus ochraceus*. Najbolja antifungalna aktivnost može se predstaviti na sledeći način: za metanolni ekstrakt najbolju aktivnost je pokazao ekstrakt taksona *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, za dietil-etarski ekstrakt najbolju aktivnost je pokazao ekstrakt taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus*, dok su za acetonski ekstrakt najbolju aktivnost pokazali ekstrakti i *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. Antifungalni potencijal se može predstaviti na sledeći način: 5 > 1 > 6 > 3 > 2 > 7 > 9 > 4 > 8 (Tabeli 14). Najveći i najniži antifungalni efekat imali su dietil-etarski odnosno acetonski ekstrakt taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus*.



Tabela 13. Minimalne inhibitorne (MIC) i baktericidne (MBC) koncentracije različitih ekstrakata listova taksona roda *Amphoricarpus*, mg/mL

BACTERIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Streptomycin	Ampicillin
	ANMeOH	AAAMeOH	AABMeOH	ANEt <sub>2</sub> O	AAAEt <sub>2</sub> O	AABEt <sub>2</sub> O	ANAcet	AAAacet	AABAcet	MIC	MIC
	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MBC	MBC
	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC		
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.007±0.0001 <sup>a</sup>	0.125±0.060 <sup>f</sup>	0.045±0.000 <sup>ad</sup>	0.060±0.003 <sup>d</sup>	0.070±0.003 <sup>e</sup>	0.015±0.002 <sup>b</sup>	0.0625±0.003 <sup>de</sup>	0.0625±0.000 <sup>de</sup>	0.125±0.030 <sup>f</sup>	0.040±0.003 <sup>c</sup>	0.250±0.010 <sup>g</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	0.060±0.002 <sup>b</sup>	0.250±0.030 <sup>e</sup>	0.060±0.003 <sup>b</sup>	0.125±0.060 <sup>d</sup>	0.150±0.000 <sup>d</sup>	0.030±0.001 <sup>a</sup>	0.125±0.030 <sup>d</sup>	0.125±0.030 <sup>d</sup>	0.250±0.030 <sup>e</sup>	0.090±0.0001 <sup>c</sup>	0.370±0.030 <sup>f</sup>
<i>Micrococcus flavus</i>	0.007±0.000 <sup>a</sup>	0.125±0.010 <sup>f</sup>	0.015±0.002 <sup>b</sup>	0.060±0.003 <sup>d</sup>	0.070±0.003 <sup>de</sup>	0.015±0.003 <sup>b</sup>	0.0625±0.0060 <sup>d</sup>	0.030±0.006 <sup>c</sup>	0.062±0.000 <sup>d</sup>	0.090±0.003 <sup>e</sup>	0.250±0.060 <sup>g</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.015±0.002 <sup>a</sup>	0.250±0.020 <sup>f</sup>	0.030±0.006 <sup>b</sup>	0.125±0.030 <sup>d</sup>	0.150±0.030 <sup>de</sup>	0.030±0.006 <sup>b</sup>	0.125±0.030 <sup>d</sup>	0.0625±0.003 <sup>c</sup>	0.125±0.030 <sup>d</sup>	0.170±0.000 <sup>e</sup>	0.370±0.030 <sup>g</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.015±0.002 <sup>a</sup>	0.125±0.030 <sup>f</sup>	0.060±0.000 <sup>d</sup>	0.200±0.010 <sup>h</sup>	0.030±0.006 <sup>b</sup>	0.045±0.006 <sup>c</sup>	0.0625±0.003 <sup>d</sup>	0.080±0.003 <sup>e</sup>	0.125±0.060 <sup>f</sup>	0.170±0.030 <sup>g</sup>	0.250±0.020 <sup>i</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.060±0.003 <sup>a</sup>	0.250±0.060 <sup>c</sup>	0.125±0.010 <sup>b</sup>	0.250±0.030 <sup>c</sup>	0.060±0.003 <sup>a</sup>	0.060±0.003 <sup>a</sup>	0.125±0.060 <sup>b</sup>	0.125±0.060 <sup>b</sup>	0.250±0.030 <sup>c</sup>	0.340±0.060 <sup>d</sup>	0.370±0.000 <sup>e</sup>
<i>Escherichia coli</i>	0.060±0.006 <sup>c</sup>	0.125±0.060 <sup>d</sup>	0.060±0.006 <sup>e</sup>	0.030±0.000 <sup>a</sup>	0.060±0.002 <sup>c</sup>	0.045±0.000 <sup>b</sup>	0.0625±0.002 <sup>c</sup>	0.030±0.003 <sup>a</sup>	0.030±0.003 <sup>a</sup>	0.170±0.020 <sup>e</sup>	0.370±0.060 <sup>f</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.125±0.010 <sup>b</sup>	0.250±0.000 <sup>c</sup>	0.125±0.000 <sup>b</sup>	0.060±0.003 <sup>a</sup>	0.125±0.020 <sup>b</sup>	0.060±0.006 <sup>a</sup>	0.125±0.060 <sup>b</sup>	0.125±0.030 <sup>b</sup>	0.125±0.060 <sup>b</sup>	0.340±0.020 <sup>d</sup>	0.490±0.060 <sup>e</sup>
	0.007±0.0006 <sup>a</sup>	0.125±0.060 <sup>f</sup>	0.015±0.003 <sup>b</sup>	0.060±0.006 <sup>e</sup>	0.035±0.003 <sup>c</sup>	0.045±0.003 <sup>d</sup>	0.0625±0.002 <sup>e</sup>	0.0625±0.003 <sup>e</sup>	0.125±0.000	0.170±0.010 <sup>g</sup>	0.740±0.010 <sup>h</sup>
	0.030±0.003 <sup>a</sup>	0.250±0.060 <sup>e</sup>	0.030±0.006 <sup>a</sup>	0.125±0.010 <sup>d</sup>	0.070±0.003 <sup>c</sup>	0.060±0.000 <sup>b</sup>	0.125±0.000 <sup>d</sup>	0.125±0.030 <sup>d</sup>	0.250±0.060 <sup>e</sup>	0.340±0.060 <sup>f</sup>	1.240±0.300 <sup>g</sup>
	0.070±0.000 <sup>d</sup>	0.125±0.030 <sup>e</sup>	0.015±0.003 <sup>a</sup>	0.030±0.003 <sup>b</sup>	0.035±0.000 <sup>b</sup>	0.015±0.003 <sup>a</sup>	0.0625±0.0030 <sup>c</sup>	0.0625±0.003 <sup>c</sup>	0.125±0.010 <sup>e</sup>	0.170±0.030 <sup>f</sup>	0.370±0.040 <sup>g</sup>
	0.080±0.003 <sup>d</sup>	0.250±0.010 <sup>f</sup>	0.030±0.003 <sup>a</sup>	0.060±0.002 <sup>b</sup>	0.070±0.003 <sup>c</sup>	0.030±0.006 <sup>a</sup>	0.125±0.060 <sup>e</sup>	0.125±0.060 <sup>e</sup>	0.250±0.000 <sup>f</sup>	0.340±0.000 <sup>g</sup>	0.490±0.060 <sup>h</sup>
	0.030±0.006 <sup>a</sup>	0.125±0.020 <sup>e</sup>	0.045±0.006 <sup>b</sup>	0.125±0.010 <sup>e</sup>	0.045±0.006 <sup>b</sup>	0.045±0.003 <sup>b</sup>	0.0625±0.003 <sup>c</sup>	0.080±0.009 <sup>d</sup>	0.125±0.060 <sup>e</sup>	0.170±0.010 <sup>f</sup>	0.250±0.060 <sup>g</sup>
	0.125±0.030 <sup>b</sup>	0.250±0.030 <sup>c</sup>	0.060±0.003 <sup>a</sup>	0.250±0.020 <sup>c</sup>	0.060±0.006 <sup>a</sup>	0.060±0.003 <sup>a</sup>	0.125±0.000 <sup>b</sup>	0.125±0.030 <sup>b</sup>	0.250±0.010 <sup>c</sup>	0.340±0.060 <sup>d</sup>	0.490±0.000 <sup>e</sup>
	0.030±0.000 <sup>a</sup>	0.125±0.060 <sup>e</sup>	0.030±0.006 <sup>a</sup>	0.125±0.030 <sup>e</sup>	0.030±0.006 <sup>a</sup>	0.045±0.002 <sup>b</sup>	0.0625±0.003 <sup>c</sup>	0.080±0.006 <sup>d</sup>	0.125±0.060 <sup>e</sup>	0.260±0.060 <sup>f</sup>	0.370±0.000 <sup>g</sup>
	0.0625±0.006 <sup>a</sup>	0.250±0.060 <sup>c</sup>	0.060±0.009 <sup>a</sup>	0.250±0.060 <sup>c</sup>	0.060±0.000 <sup>a</sup>	0.060±0.000 <sup>a</sup>	0.125±0.030 <sup>b</sup>	0.125±0.030 <sup>b</sup>	0.250±0.060 <sup>c</sup>	0.520±0.010 <sup>d</sup>	0.740±0.090 <sup>e</sup>

U svakom redu različita slova ukazuju na značajnu razliku (p<0.05).

ANMeOH - suvi 80% metanolni ekstrakt *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*; AAAMeOH - suvi 80% metanolni ekstrakt *A. autariatus* subsp. *autariatus*; AABMeOH - suvi 80% metanolni ekstrakt *A. aautariatus* subsp. *bertisicus*; ANEt<sub>2</sub>O - suvi dietil etarski ekstrakt *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*; AAAEt<sub>2</sub>O - suvi dietil etarski ekstrakt *A. autariatus* subsp. *autariatus*; AABEt<sub>2</sub>O - suvi dietil etarski ekstrakt *A. autariatus* subsp. *bertisicus*; ANAcet - suvi 50% acetonski ekstrakt *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*; AAAacet - suvi 50% acetonski ekstrakt *A. autariatus* subsp. *autariatus*; AABAcet - suvi 50% acetonski ekstrakt *A. autariatus* subsp. *bertisicus*;

MIC i MBC (mg/mL), srednja vrednost dva merenja

Streptomycin je korišćen kao štok rastvor 0.1 mg mL<sup>-1</sup>

Ampicilin je korišćen kao štok rastvor 0.1 mg mL<sup>-1</sup>



Tabela 14. Minimalne inhibitorne (MIC) i fungicidne (MFC) koncentracije različitih ekstrakata listova taksona roda *Amphoricarpos*, mg/mL

FUNGI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Bifonazol MIC MFC	Ketokonazol MIC MFC
	ANMeOH	AAAMeOH	AABMeOH	ANEt <sub>2</sub> O	AAAEt <sub>2</sub> O	AABEt <sub>2</sub> O	ANAcet	AAAacet	AABAcet		
	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC		
	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.025±0.003 <sup>a</sup>	0.200±0.030 <sup>d</sup>	0.10±0.003 <sup>c</sup>	0.200±0.000 <sup>d</sup>	0.050±0.006 <sup>b</sup>	0.025±0.0030 <sup>a</sup>	0.200±0.030 <sup>d</sup>	0.400±0.000 <sup>f</sup>	0.300±0.030 <sup>e</sup>	0.150±0.030 <sup>cd</sup>	0.200±0.000 <sup>d</sup>
<i>Aspergillus versicolor</i>	0.006±0.0002 <sup>a</sup>	0.100±0.006 <sup>c</sup>	0.05±0.006 <sup>d</sup>	0.400±0.030 <sup>h</sup>	0.0125±0.002 <sup>b</sup>	0.025±0.0020 <sup>c</sup>	0.200±0.000 <sup>f</sup>	0.100±0.030 <sup>e</sup>	0.300±0.020 <sup>e</sup>	0.100±0.010 <sup>e</sup>	0.200±0.006 <sup>f</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	0.025±0.000 <sup>a</sup>	0.200±0.000 <sup>d</sup>	0.10±0.003 <sup>c</sup>	0.800±0.060 <sup>g</sup>	0.025±0.003 <sup>a</sup>	0.050±0.0000 <sup>b</sup>	0.400±0.020 <sup>e</sup>	0.400±0.020 <sup>e</sup>	0.400±0.010 <sup>e</sup>	0.200±0.000 <sup>d</sup>	0.500±0.030 <sup>f</sup>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.030±0.0003 <sup>c</sup>	0.200±0.003 <sup>e</sup>	0.025±0.000 <sup>b</sup>	0.400±0.060 <sup>f</sup>	0.030±0.006 <sup>c</sup>	0.0125±0.003 <sup>a</sup>	0.400±0.030 <sup>f</sup>	0.400±0.060 <sup>f</sup>	0.400±0.000 <sup>f</sup>	0.150±0.000 <sup>d</sup>	0.150±0.060 <sup>d</sup>
<i>Trichoderma viride</i>	0.060±0.0003 <sup>c</sup>	0.400±0.060 <sup>e</sup>	0.05±0.003 <sup>b</sup>	0.800±0.030 <sup>f</sup>	0.060±0.003 <sup>c</sup>	0.025±0.006 <sup>a</sup>	0.800±0.060 <sup>f</sup>	0.800±0.030 <sup>f</sup>	0.800±0.060 <sup>f</sup>	0.200±0.000 <sup>d</sup>	0.200±0.030 <sup>d</sup>
<i>Penicillium funiculosum</i>	0.025±0.006 <sup>b</sup>	0.200±0.030 <sup>e</sup>	0.05±0.002 <sup>c</sup>	0.400±0.010 <sup>g</sup>	0.006±0.0001 <sup>a</sup>	0.050±0.003 <sup>c</sup>	0.300±0.060 <sup>f</sup>	0.400±0.000 <sup>g</sup>	0.400±0.060 <sup>g</sup>	0.150±0.060 <sup>d</sup>	0.200±0.060 <sup>e</sup>
<i>Penicillium ochrochloron</i>	0.050±0.002 <sup>a</sup>	0.400±0.010 <sup>d</sup>	0.10±0.090 <sup>b</sup>	0.800±0.000 <sup>f</sup>	0.050±0.003 <sup>a</sup>	0.100±0.060 <sup>b</sup>	0.400±0.030 <sup>d</sup>	0.800±0.010 <sup>f</sup>	0.800±0.060 <sup>f</sup>	0.200±0.060 <sup>c</sup>	0.500±0.003 <sup>e</sup>
<i>Candida albicans</i>	0.020±0.003 <sup>b</sup>	0.050±0.000 <sup>c</sup>	0.025±0.003 <sup>bc</sup>	0.100±0.030 <sup>d</sup>	0.001±0.000 <sup>a</sup>	0.025±0.003 <sup>bc</sup>	0.050±0.000 <sup>c</sup>	0.100±0.010 <sup>d</sup>	0.050±0.003 <sup>c</sup>	0.150±0.030 <sup>e</sup>	1.000±0.090 <sup>f</sup>
<i>Penicillium</i>	0.030±0.002 <sup>b</sup>	0.200±0.003 <sup>d</sup>	0.05±0.001 <sup>c</sup>	0.200±0.030 <sup>d</sup>	0.020±0.000 <sup>a</sup>	0.050±0.000 <sup>c</sup>	0.200±0.000 <sup>d</sup>	0.400±0.000 <sup>e</sup>	0.800±0.030 <sup>f</sup>	0.200±0.000 <sup>d</sup>	1.000±0.060 <sup>g</sup>
<i>Aspergillus</i>	0.020±0.003 <sup>a</sup>	0.100±0.001 <sup>c</sup>	0.05±0.000 <sup>b</sup>	0.100±0.010 <sup>c</sup>	0.025±0.006 <sup>a</sup>	0.025±0.003 <sup>a</sup>	0.200±0.010 <sup>d</sup>	0.200±0.030 <sup>d</sup>	0.100±0.000 <sup>c</sup>	0.200±0.010 <sup>d</sup>	0.200±0.030 <sup>d</sup>
<i>Aspergillus</i>	0.030±0.000 <sup>a</sup>	0.200±0.006 <sup>d</sup>	0.10±0.010 <sup>c</sup>	0.200±0.000 <sup>d</sup>	0.050±0.003 <sup>b</sup>	0.050±0.003 <sup>b</sup>	0.400±0.020 <sup>e</sup>	0.400±0.000 <sup>e</sup>	0.200±0.030 <sup>d</sup>	0.250±0.006 <sup>de</sup>	0.500±0.000 <sup>f</sup>
<i>Aspergillus</i>	0.006±0.0006 <sup>a</sup>	0.100±0.000 <sup>d</sup>	0.05±0.003 <sup>c</sup>	0.200±0.060 <sup>e</sup>	0.006±0.0003 <sup>a</sup>	0.025±0.000 <sup>b</sup>	0.400±0.060 <sup>f</sup>	0.200±0.060 <sup>e</sup>	0.200±0.030 <sup>e</sup>	0.200±0.030 <sup>e</sup>	2.500±0.100 <sup>g</sup>
<i>Aspergillus</i>	0.050±0.003	0.200±0.030	0.10±0.030	0.400±0.060	0.050±0.006	0.050±0.003	0.800±0.030	0.400±0.030	0.400±0.060	0.250±0.001	3.500±0.300
<i>Candida</i>	0.025±0.000 <sup>a</sup>	0.400±0.060 <sup>f</sup>	0.10±0.010 <sup>d</sup>	0.400±0.000 <sup>f</sup>	0.050±0.003 <sup>c</sup>	0.030±0.001 <sup>b</sup>	0.200±0.000 <sup>e</sup>	0.200±0.030 <sup>e</sup>	0.200±0.000 <sup>e</sup>	0.100±0.000 <sup>d</sup>	0.200±0.003 <sup>e</sup>
<i>Candida</i>	0.050±0.003 <sup>a</sup>	0.800±0.060 <sup>f</sup>	0.20±0.000 <sup>c</sup>	0.800±0.000 <sup>f</sup>	0.100±0.010 <sup>b</sup>	0.050±0.006 <sup>a</sup>	0.400±0.000 <sup>e</sup>	0.400±0.010 <sup>e</sup>	0.400±0.000 <sup>e</sup>	0.200±0.000 <sup>c</sup>	0.300±0.006 <sup>d</sup>

U svakom redu različita slova ukazuju na značajnu razliku (p<0.05).

ANMeOH - suvi 80% metanolni ekstrakt *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*; AAAMeOH - suvi 80% metanolni ekstrakt *A. autariatus* subsp. *autariatus*; AABMeOH - suvi 80% metanolni ekstrakt *A. aautariatus* subsp. *bertisceus*; ANEt<sub>2</sub>O - suvi dietil etarski ekstrakt *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*; AAAEt<sub>2</sub>O - suvi dietil etarski ekstrakt *A. autariatus* subsp. *autariatus*; AABEt<sub>2</sub>O - suvi dietil etarski ekstrakt *A. autariatus* subsp. *bertisceus*; ANAcet - suvi 50% acetonski ekstrakt *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*; AAAacet - suvi 50% acetonski ekstrakt *A. autariatus* subsp. *autariatus*; AABAcet - suvi 50% acetonski ekstrakt *A. autariatus* subsp. *bertisceus*;

MIC i MFC (mg/mL), srednja vrednost dva merenja

Bifonazol je korišćen kao štok rastvor 0.1 mg mL<sup>-1</sup>

Ketokonazol je korišćen kao štok rastvor 0.1 mg mL<sup>-1</sup>



#### **4.6.2. Antioksidativna aktivnost i ukupan sadržaj fenola i flavonoida ekstrakata listova balkanskih taksona roda *Amphoricarpos***

Rezultati ukupnog sadržaja fenola u testiranim ekstraktima dati su u Tabeli 15. Ukupan sadržaj fenola je izražen kao ekvivalenti galne kiseline u rasponu od  $11.90 \pm 0.19$  do  $67.23 \pm 0.70$  mg GA/g. Visoke koncentracije fenolnih jedinjenja su detektovane u metanolnim ekstraktima svih testiranih taksona, zatim u tečnim metanolnim i vodenim ekstraktima. Najveći ukupni sadržaj fenola bio je u metanolnom ekstraktu *A. autariatus* subsp. *autariatus* ( $67.23 \pm 0.70$  mg GA/g). Sadržaj flavonoida u metanolnim i vodenim ekstraktima istraživanih taksona izražen je u ekvivalentima rutina (Tabela 16). Koncentracije flavonoida u testiranom metanolnom ekstraktu i tečnom metanolnom i vodenom ekstraktu kretale su se od  $9.79 \pm 0.43$  do  $88.69 \pm 1.33$  mg RU/g. Visoke koncentracije flavonoida utvrđene su u metanolnim ekstraktima svih testiranih taksona. Najviše koncentracije flavonoida utvrđene su za metanolni ekstrakt taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* ( $88.69 \pm 1.33$  mg RU / g).

Antioksidativni potencijal suvog metanolnog i tečnih metanolnih i vodenih ekstrakata taksona roda *Amphoricarpos* je izražen u IC50 (mg/mL) vrednostima. IC50 vrednosti antioksidativnog potencijala ekstrakata i tečnih ekstrakata date su u Tabeli 17. Vrednosti antioksidativne aktivnosti kretale su se od  $170.01 \pm 1.58$  do  $1041.62 \pm 2.35$  mg/mL.

Najveći kapacitet za neutralizaciju DPPH radikala je izmeren u suvom metanolnom ekstraktu taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* ( $170.01 \pm 1.58$  mg/mL). Ovo je u korelaciji sa visokim sadržajem ukupnih fenola i koncentracijama flavonoida u suvom metanolnom ekstraktu ovog taksona.

Tabela 15. Ukupan sadržaj fenola u ekstraktima listova taksona roda *Amphoricarpos* izraženih kao ekvivalenti galne kiseline, GAE (mg of GA/g of ekstrakt)

Takson	Suvi metanolni ekstrakt	Tečni metanolni ekstrakt	Tečni vodeni ekstrakt
<i>Amphoricarpos</i>			
<i>neumayerianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i>	41.60 ± 1.04	14.96 ± 0.48	11.90 ± 0.19
<i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i>	67.23 ± 0.70	25.10 ± 0.50	19.71 ± 0.46
<i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertisceus</i>	50.74 ± 0.93	20.15 ± 1.10	16.68 ± 0.21

Svaka vrednost je prosečna vrednost tri analize ± standardna devijacija.

Tabela 16. Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktima listova taksona roda *Amphoricarpos* izraženih kao ekvivalenti rutina, RuE (mg of Ru/g of ekstrakt)

Takson	Suvi metanolni ekstrakt	Tečni metanolni ekstrakt	Tečni vodeni ekstrakt
<i>Amphoricarpos</i>			
<i>neumayerianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i>	48.22 ± 0.41	15.97 ± 0.31	9.79 ± 0.43
<i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i>	88.69 ± 1.33	21.14 ± 0.22	13.14 ± 0.12
<i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertisceus</i>	54.61 ± 0.45	17.50 ± 0.14	10.16 ± 0.28

Svaka vrednost je prosečna vrednost tri analize ± standardna devijacija.



Tabela 17. Antioksidativna aktivnost ekstrakata listova taksona roda *Amphoricarpos* izražena u IC<sub>50</sub> vrednostima (μg/mL)

Takson	Suvi metanolni ekstrakt	Tečni metanolni ekstrakt	Tečni vodeni ekstrakt
<i>Amphoricarpos</i>			
<i>neumayerianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i>	365.52 ± 1.12	748.35 ± 2.05	1041.62 ± 2.35
<i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i>	170.01 ± 1.58	565.02 ± 1.45	676.18 ± 1.84
<i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertisceus</i>	226.42 ± 1.79	570.26 ± 1.99	684.98 ± 1.60

Svaka vrednost je prosečna vrednost tri analize ± standardna devijacija.



#### **4.6.3. Antioksidativna aktivnost i ukupan sadržaj fenola i flavonoida ekstrakata listova vrste *Amphoricarpos elegans***

Ukupni sadržaj fenola značajno varira između ekstrakata listova vrste *Amphoricarpos elegans*, pri čemu je metanolni ekstrakt pokazao najveću količinu (Tabela 18). Fenoli ili flavonoidi nisu detektovani u *n*-heksanskoj frakciji.

Kako fenoli i flavonoidi nisu detektovani u *n*-heksanskoj frakciji (Tabela 18), samo su etil acetatne i metanolne frakcije korišćene u antioksidativnim testovima. U sva tri testa (DPPH, ABTS i FRAP), metanolni ekstrakt je pokazao veći antioksidativni potencijal. Budući da je razlika između ukupnog sadržaja flavonoida u oba ekstrakta veoma mala, većina antioksidativnog potencijala može se pripisati fenolima. Međutim, antioksidativni potencijal metanolne frakcije, pokazan na DPPH testu, bio je više od deset puta veći od frakcije etil acetata.

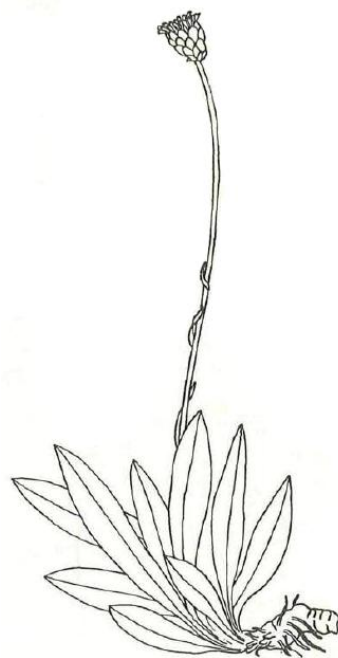
Tabela 18. Ukupni sadržaj fenola i flavonoida i antioksidativna aktivnost *n*-heksanskog, etil acetatnog i metanolnog ekstrakta listova vrste *Amphoricarpos elegans*

Ekstrakti	Prinos [%]	Ukupni fenoli GAE µg/mg	Ukupni			
			flavonoidi QUE µg/mg	DPPH IC50 mg/ml	ABTS AAEC mg/ml	FRAP Fe <sup>2+</sup> mmol/mg
<i>n</i> -heksan	6.65	-	-	-	-	-
etil acetat*	2.32	19.9 <sup>a</sup> ± 12.8	86.6 <sup>a</sup> ± 8.9	3.50	0.03 <sup>a</sup> ± 0.01	0.13 <sup>a</sup> ± 0.01
metanol*	9.67	96.3 <sup>b</sup> ± 5.5	96.7 <sup>a</sup> ± 7.7	0.24	0.07 <sup>b</sup> ± 0.01	0.32 <sup>b</sup> ± 0.01

\*Uzorci su analizirani u triplikatu (n = 3) i izraženi kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, osim za DPPH test (IC50).

Različita slova (a- b) u okviru iste kolone ukazuju na statističke značajne razlike na osnovu ANOVA (p < 0.05)

Ilustracija *Amphoricarpos autariatus* Blečić et Mayer: Habitus, Blečić i Mayer (1967). Die europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos* VISIANI. Phytion, 12, 150-158



## 5 DISKUSIJA



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Morfologija (morfometrijska analiza)

Morfometrijska analiza 28 karaktera pokazala je dobro razdvajanje istraživanih balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*. Karakteri koji su najviše doprineli diferencijaciji su oni koji se odnose na vegetativne strukture: broj grana stabljike (SC\_br\_no), oblik lista rozete (RL\_S), dužina lista rozete (RL\_L) i širina lista rozete (RL\_W). Na dobijenom kladogramu uočava se grupisanje morfološki sličnijih taksona, *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* sa jedne strane strane i *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* sa druge.

Morfometrijska analiza karaktera habitusa i glavice pokazala je najbolje razdvajanje istraživanih balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*. Karakteri koji su u ovom slučaju najviše doprineli diferencijaciji su takođe vegetativnih struktura: broj listića na stabljici (SL\_no), oblik lista rozete (RL\_S), dužina lista rozete (RL\_L), širina lista rozete (RL\_W) i pokrivenost naličja lista rozete trihomama (RL\_Ha\_ab). Dobijeni kladogram je dao diferencijaciju i grupe taksona kao i u prethodnoj analizi.

Dobijeni rezultati se razlikuju od rezultata Caković i sar. (2015) gde morfološki karakteri nisu razdvojili balkanske populacije. Caković i sar. (2015) su za svoje istraživanje odabrali 30 morfoloških karaktera, od kojih je većina i ranije bila korišćena za razlikovanje taksona. U njihovom istraživanju svi kvalitativni karakteri su bili nevarijabilni i stoga isključeni iz dalje analize, za razliku od našeg istraživanja gde je u analizu uključeno osam kvalitativnih karaktera koji su testirani. U istom radu, rezultat analize glavnih komponenti (PCA) nije odražavao taksonomiju prema Blečić i Mayer (1967). Dakle, karakteri sa najvećim opterećenjem bili su karakteri lista, papusa i cipsele. Kanonijska diskriminantna analiza (CDA) u istom radu Caković i sar. (2015) pokazala je veliko preklapanje populacija, osim najsevernijih populacija, koje su donekle bile odvojene. Treba istaći da ove najsevernije populacije odgovaraju bosanskom taksonu *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*. Takođe, CDA analiza za tri *a priori* grupe, pokazala je da su karakteri involukruma i listova najviše doprineli razdvajanju na prvoj osi, a karakteri involukruma,



papusa i cipsele na drugoj. U CDA analizi za pet *a priori* grupa karakteri koji su najviše doprineli razdvajanju na prvoj osi su bili karakteri listova, involukruma, stabljike i papusa, a na drugoj osi su to bili karakteri involukruma i listova.

Istorijski gledano, morfološki karakteri su bili od velikog značaja prilikom tumačenja taksonomskih odnosa unutar balkanskog kompleksa roda *Amphoricarpos*. Karakteri listova su u početku bili ključni za razlikovanje podvrsta, varijeteta i formi. Tako je Murbeck (1891) varijetet tipsek vrste iz Hercegovine sa širokim listovima opisao kao var. *velezensis* Murbeck, Beck (1894) kao f. *latifolia* G. Beck, a Bošnjak (1936) kao podvrstu *murbeckii* Bošnjak. Sa druge strane, Fukarek (1965) se uzdržao od bilo kakvog klasifikovanja, iako je u osnovi prepoznao tri entiteta: biljke sa dugačkim, uskim, zašiljenim listovima koje bi odgovarale var. *neumayeri*, širokolisne biljke var. *murbecki* i forma između te dve "var. *intermedia*".

Najznačajniji rad vezan koji se donosi na taksonomiju roda *Amphoricarpos* na Balkanu jeste rad autora Blečić i Mayer (1967). Značajni dijagnostički karakteri koji su Blečić i Mayer (1967) isticali bili su širina bazalnih listova, oblik vrha lista, margina lista (uvijena ili ne), oblik involukralnih brakteja, dužina šiljka (mukro), širina krilca obodne cipsele, oblik ušastih nastavaka obodne cipsele kao i indumentum obodne cipsele. Oni su opisali širokolisne populacije kao *A. autariatus* Blečić et Mayer, a u okviru njih prepoznali dve podvrste, subsp. *autariatus* i subsp. *bertisceus* Blečić et Mayer.

Prema Blečić i Mayer (1967) najznačajniji karakteri, osim listova, koji odvajaju tipsku vrstu *A. neumayerianus* od *A. autariatus* su karakteri spoljašnjih involukralnih listića i obodne cipsele. Tipska vrsta ima involukralne listiće duguljasto - jajastog oblika, u 2 – 3 reda, sa izduženim šiljkom (mukro) koji jasno prelazi gornju ivicu i spljoštene, dlakave, široko okriljene, sa istaknutim ušima, obodne cipsele. S druge strane, *A. autariatus* ima involukralne listiće okruglo - jajastog oblika, koji su u 2 – 3 reda, sa vrlo kratkim, jedva primetnim šiljkom (mukro). Takođe, obodne cipsele su slabo okriljene, gole i bez ušiju. U okviru *A. autariatus* podvrste se razlikuju po karakterima lista (oblik, vrh, margina), broj glavica po stabljici i po boji cvetova.

U našem istraživanju je pokazano da su karakteri listova bili najznačajniji za razdvajanje vrsta što je u saglasnosti sa radom Blečić i Mayer (1967). Ipak, u našem



istraživanju je pokazano da karakteri cipsela (dlakavost, širina krilca, broj čekinja papusa kao i dužina čekinja papusa), nisu pokazali razdvajanje taksona, već se taksoni prema ovim karakterima preklapaju. Takođe, morfometrijska analiza karaktera involukralnih listića nije dala očekivane rezultate. U CDA analizi koja je uključila samo karaktere glavice i involukruma taksoni se nisu razdvojili.

Dakle, u našem istraživanju pokazano je da su karakteri vegetativnih organa, kao i kombinovani karakteri vegetativnih organa i glavice vrlo značajni pri razdvajanju četiri taksona: *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. Ovako razdvojeni taksoni su i na isti način geografski razdvojeni. Za takson *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* vezuju se populacije sa Orjena i Lovćena, za takson *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* vezuju se populacije iz Bosne, za takson *A. autariatus* subsp. *autariatus* vezuju se populacije iz zapadnog i centralnog dela Crne Gore, dok se za takson *A. autariatus* subsp. *bertisceus* vezuju populacije sa jugoistočnog dela Crne Gore.

Ovo je i delom u saglasnosti sa literaturnim podacima. Fukarek (1965) je zapazio da su biljke sa dugačkim, uskim, zašiljenim listovima (var. *neumayeri*) uobičajeno bliže Jadranskom moru (planinski venci Orjen, Bijela gora, Lovćen). Takođe, Blečić i Mayer (1967) su, u okviru *A. autariatus*, zaključili da prva podvrsta (*A. autariatus* subsp. *autariatus*) ima severozapadnu distribuciju, odnosno endemična je za Bosnu i Hercegovinu i Crnu Goru, dok je druga podvrsta (*A. autariatus* subsp. *bertisceus*) rasprostranjena na jugoistoku uključujući Crnu Goru, Makedoniju, Kosovo, Albaniju i severnu Grčku. Razlika u odnosu na ove podatke, se ogleda u izdvajanju bosanskog taksona (*A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*) u našem istraživanju.



## 5.2. Mikromorfologija

Indumentum. Mikromorfološka analiza je pokazala da svi istraživani taksoni *Xeranthemum* grupe poseduju trihome na stablu, kao i vunasti indumentum na obe strane lista, ali i da su trihome sa abaksijalne strane mnogo gušće raspoređene. Izuzetak je goli indumentum adaksijalne strane lista vrste *Shangwua denticulata*. Na vegetativnim delovima biljaka iz podtribusa Carduinae prisutan je širok spektar trihoma (Häffner 2000). Većina predstavnika iz Carduinae ima vunasti indumentum na abaksijalnoj strani lista ili sa obe strane lista (Häffner 2000) što je u saglasnosti sa našim istraživanjem. Trihome su jednoćelijske ili izgrađene od jedne do nekoliko bazalnih ćelija i jedne dugačke kovrdžave terminalne ćelije; retko su trihome velike, jednoredne i višećelijske (Häffner 2000). Jednoćelijske granate trihome su sporadično prisutne kod Carduinae, npr. kod *Onopordum* (Häffner 2000).

Kapitatne trihome su pronađene na listovima svih istraživanih taksona *Xeranthemum* grupe, ali su one mnogo brojnije na abaksijalnoj strani lista vrste *Sh. denticulata*, kao i na površini stabla vrste *Sh. masarica*. Široko rasprostranjen mikrokarakter na stablima i listovima predstavnika familije Asteraceae je prisustvo žlezdanih kapitatnih trihoma kratkog vrata, koje se vide kao žlezdane tačke (Robinson 2009). Prema Häffner (2000), žlezdane trihome su izgrađene od dva reda ćelija: donji par formira dršku, a vršni par formira žlezdu. Ipak, kod nekih rodova iz Carduinae, npr. *Alfredia* Cass., *Ancathia* DC., *Carduus*, *Cirsium*, *Lamyropappus* Knorring & Tamams., *Olgaea* Iljin, *Synurus* Iljin i *Xanthopappus* C. Winkler, žlezdane trihome su odsutne (Häffner 2000). Dobro dokumentovan fenomen kod familije Asteraceae jeste očuvanje osobina povezanim sa adaptacijom na ekstremna staništa. Tako, rod *Phalacrachena* Iljin iz Sibira ima gust žlezdani indumentum koji se interpretira kao predačka adaptacija na sušna staništa (Susanna i sar. 2011). Dodatno, žlezdane trihome su glavna mesta biosinteze i akumulacije seskviterpenskih laktona, koji imaju značajnu ulogu u ekologiji, pokazuju biološku aktivnost i važni su u hemotaksonomiji familije (Apezzato-da-Glória i sar. 2012).





List. Na adaksijalnoj strani epidermisa lista vrsta *Xeranthemum inapertum*, *X. annuum*, *X. cylindraceum* i posebno *Siebera pungens* uočena su naborana zadebljanja kutikule. Prema Pătruț i sar. (2005), ova osobina predstavlja adaptaciju koja verovatno ima ulogu u redukciji evapotranspiracije. S druge strane, epidermske ćelije adaksijalne strane lista kod svih istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* kao i kod vrste *Shangwua denticulata* nisu uočeni kutikularni nabori spoljašnjih periklinalnih ćelijskih zidova. Ova osobina je verovatno povezana sa mezofitskim, planinskim staništima ovih taksona. Četiri tipa stominog aparata je zabeležen kod Asteraceae: anomocitni, brahiparacitni, anizocitni i diacitni (Adedeji i Jewoola 2008). Mi smo uočili aktinocitni tip stominog aparata na adaksijalnoj površini lista kod *A. exsul* i *S. pungens*, za razliku od anomocitnog tipa kod *X. annuum* i *X. cylindraceum*. Treba istaći da nisu uočene stome kod svih istraživanih taksona, usled prisustva brojnih nežlezdanih trihoma.

Kod svih istraživanih vrsta epidermske ćelije su poligonalnog oblika, osim kod vrsta *Chardinia orientalis* i *X. inapertum* gde su one veoma nepravilne odnosno nepravilno poligonalne. Antiklinalni ćelijski zidovi epidermskih ćelija na adaksijalnoj strani lista se razlikuju između istraživanih vrsta: izvijugani kod vrsta *Ch. orientalis*, *X. inapertum* i *S. pungens*, blago izvijugani do ravni kod vrsta *A. exsul*, *Sh. denticulata*, blago izvijugani kod *A. elegans*, *X. annuum* i *X. cylindraceum* i ravni kod balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*. Ova osobina povezuje balkanske taksone roda *Amphoricarpos*, a takođe i daje dodatne karaktere za razgraničenje vrsta roda *Xeranthemum*.

Naboran izgled adaksijalne strane lista kod *Ch. orientalis*, kanalni izgled antiklinalnih zidova ćelija adaksijalne strane lista kod *X. inapertum* i uočljiva strijatna površina kod *S. pungens* su najverovatnije jedinstvene osobine za ove vrste. S druge strane raspored ćelija adaksijalnog epidermisa koji nalikuje na slagalicu ("puzle") povezuje vrste roda *Amphoricarpos* i *Sh. denticulata*.

Mikromorfološki rezultati istraživanja listova i stabla ukazuju na prisustvo kseromorfnih karakteristika, npr. dlakavo stablo i listovi kod svih istraživanih vrsta. Uočava se tendencija od gole adaksijalne strane lista kod *Sh. denticulata*, preko blago razvijenog indumentuma kod istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* do guste pokrivenosti trihomama kod *Ch. orientalis*, vrsta roda *Xeranthemum* i *S. pungens*, koje rastu na



otvorenim sušnim staništima. Štaviše, prostor koji se formira između površine lista i trihoma štiti epidermis od ekstremne evaporacije (Uzunova i sar. 2007). Takođe, kseromorfna tendencija je uočena i u sledećim karakterima: glatki spoljašnji periklinalni zidovi adaksijalnog epidermisa kod svih istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* i *Sh. denticulata*, blago naborani zidovi kod vrsta roda *Xeranthemum*, veoma naborani zidovi kod *Ch. orientalis* i izrazito naborani (strijatni) zidovi kod *S. pungens*.

Sistematski značaj karaktera lista epidermisa je veoma dobro dokumentovan u okviru familije Asteraceae (Adedeji i Jewoola 2008; Karanović i sar. 2015). Takođe, ornamentacija kutikule može pružiti dodatne taksonomske karaktere (Stenglein i sar. 2005). Tako je u ovom istraživanju pokazano da mikromorfološke osobine epidermisa lista (priroda spoljašnjih periklinalnih i antiklinalnih zidova i indumentuma) predstavljaju taksonomski značajne karaktere u razgraničenju vrsta i čak na nivou roda, kako je prethodno i naveo Barthlott (1981).

Involukralne brakteje. Rezultati u ovom istraživanju su pokazali da se srednja involukralna brakteja razlikuje između istraživanih vrsta u pogledu indumentuma, površine, oblika šiljka i prisustva kristala vedelita. Involukralne brakteje balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* i vrsta *Chardinia orientalis*, *Xeranthemum inapertum*, *X. annuum* su gole; kod vrsta *Amphoricarpos exsul*, *A. elegans*, *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* i *Shangwua masarica* brakteje su skoro gole, poseduju trihome na marginama i na vrhu brakteje; a vrste *X. cylindraceum* i *Siebera pungens* imaju vermiformne, prilegle, beličaste trihome u centralnom delu. Jedino kod vrste *X. cylindraceum* pored pomenutih vermiformnih trihoma uočene su i kapitatne žlezdane trihome. Ovaj karakter je dodatni za razgraničenje vrsta roda *Xeranthemum*.

Takođe dokumentovana je i razlika u površini involukralnih brakteja. Tako involukralna brakteja vrste *Sh. masarica* ima nepravilno mrežastu površinu, involukralne brakteje taksona *A. exsul*, *A. elegans* i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* imaju mrežasto - naboranu površinu, dok involukralne brakteje taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus*, *A. autariatus* subsp. *bertisceus* i *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* imaju naborano -



strijatnu površinu. Sve vrste jednogodišnjih rodova, *Ch. orientalis*, vrste roda *Xeranthemum* i *Siebera pungens* imaju mrežastu površinu involukralnih brakteja.

Mukro involukralne brakteje se pokazao kao dobar karakter za razgraničenje vrsta roda *Xeranthemum*. Vrste *X. inapertum* i *X. annuum* imaju veoma zašiljen mukro sa dugačkim trnom, dok vrsta *X. cylindraceum* ima kratak i zaobljen mukro. Takođe, mukro je kratak i zaobljen kod *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* i tupo zaobljen kod *A. autariatus* subsp. *autariatus* i kod oba taksona jedva prelazi ivicu brakteje, što je i u saglasnosti sa radom Blečić i Mayer (1967). S druge strane mukro je duguljasto zaobljen kod *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (različito od rezultata Blečić i Mayer 1967), i šiljat kod *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i kod oba taksona prelazi ivicu brakteje. Ovi karakteri imaju taksonomski značaj i mogu biti korisni pri razgraničenju taksona unutar balkanskog kompleksa roda *Amphoricarpos*.

Pločice voska nepravilnih oblika i različitih veličina pronađene su samo na epidermisu involukralne brakteje vrste *X. inapertum*. Površine involukralnih brakteja kod *X. annuum* i *X. cylindraceum* ne poseduju tako izrazite pločice voska, iako je prisustvo voska uočljivo. Veoma uočljivo prisustvo pločica voska može biti od koristi prilikom razgraničenja vrsta roda *Xeranthemum*.

Dodatno, mikrokarakteri involukralnih brakteja se smatraju veoma značajnim pri razgraničenju i na višim taksonomskim nivoima unutar familije Asteraceae (npr. za potribuse u okviru Cardueae karakteristične su involukralne brakteje sa trnovitim češljasto - resastim nastavcima kod Cardopatiinae; obično trnovite, najunutrašnjije bez nastavaka ili sa rudimentiranim nastavcima kod Carduinae; unutrašnje često upadljive i obojene kod Carlininae; kožasto - opnasti, resasti, češljasti, trnoviti ili nebodljikavi nastavci kod Centaureinae; i involukralni lisitci u mnogo redova kod Echinopsinae (Robinson 2009; Susanna and Garcia- Jacas 2009).

Kristali. Kristali vedelita su uočeni na površini involukralnih brakteja vrsta *Chardinia orientalis*, *Siebera pungens*, *Xeranthemum inapertum*, *X. annuum* i *X. cylindraceum* dok kod drugih istraživanih vrsta roda *Amphoricarpos* i *Shangwua masarica* kristali nisu detektovani. Da se radi o kristalima vedelita, a ne o kristalima hemijski sličnog



( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) vevelita, može se zaključiti jer ovi kristali ne pokazuju monokliničnu formu koja se sreće kod vevelita. Logično pitanje koje se nameće je zbog čega ti kristali nisu prisutni na involukralnim braktejama vrsta roda *Amphoricarpos* i *Sh. masarica*. Ovo može biti povezano sa staništem, jer u okviru *Xeranthemum* grupe, vrste rodova *Amphoricarpos* i *Shangwua* rastu u planinskim regionima, dok jednogodišnje vrste ostalih rodova (*Chardinia*, *Siebera* i *Xeranthemum*) rastu na otvorenim sušnim staništima, koji mogu da utiču na formiranje kristala.

Takođe, i unutar biljnih ćelija može se uočiti raznolikost hemijski specifičnih minerala (Brizuela i sar. 2007). Najobilniji su minerali koji se sastoje od kalcijumovih soli, obično kalcijum oksalat (Korth i sar. 2006). Kalcijum oksalat ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) kristali su široko prisutni kod biljaka i pronađeni su u preko 215 familija (Molano-Flores 2001; Kartal 2016). Posle kalcijum-oksalata, silicijum-dioksid ( $\text{SiO}_2$ ) je drugi verovatno najzastupljeniji biomineral, koji se javlja kod svih biljnih vrsta (Willey 2016) u obliku fitolita (Arnott, 1982; Volcani 1983). Ostali kristali, gips ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), kalcit ( $\text{CaCO}_3$ ) i silvit (KCl) se javljaju ređe.

Kalcijum oksalati su javljaju uglavnom kao monohidrični (vevelit -  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) i dihidrični (vedelit -  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) kristali (Frei-Wyssling 1981; Arnott 1982; Monje i Baran 2002; Echigo i sar. 2005). Individualni kristaliti vedelita imaju tetragonalni oblik, za razliku od šiljatog monokliničkog oblika vevelita (Monje i Baran 2002). Oni su prisutni u različitim biljnim organima i njihovim delovima i tkivima: korenovi (Dane i sar. 2000; Horner i sar. 2000), stabla (Meric 2008, 2009a), listovi (Horner i sar. 2012), semena (Ilarslan i sar. 2001), plodnici (Tilton i Horner 1980; Meric 2008, 2009a, 2009b), antere (Meric 2008, 2009a, 2009b) i krunični listići (Meric 2008, 2009b). Prisutnost ovih kristala se pripisuje različitim funkcijama: regulacija kalcijuma u ćelijama (Kostman i Franceschi 2000; Volk i sar. 2002), zaštita od herbivora (Molano-Flores 2001), detoksikacija (neutralizacija) oksalne kiseline ili teških metala (Franceschi i Nakata 2005), mehanička potpora tkiva, kao i sakupljanje i refleksija svetlosti (Franceschi i Horner 1980; Kuo-Huang i sar. 2007).

Oblici kristala kalcijum-oksalata variraju. Ukoliko se nalaze unutar biljnih ćelija opisani su kao rafidi, druze, stiloidi, prizme ili kristalni pesak (Franceschi i Horner 1980;



Kartal 2016). Kristali kalcijum oksalata su uočeni kod predstavnika familije Asteraceae (Dormer 1961, 1962; Horner 1977; Meric i Dane 2004; Meric, 2008, 2009a, 2009b; Kartal 2016). Smatra se da je formiranje kristala unutar ćelija pod genetičkom kontrolom kao i da je specifično za određene vrste (Kausch i Horner 1984; Ilarslan i sar. 2001; Horner i sar. 2009). Tako, prisustvo, distribucija i oblici kristala kalcijum-oksalata se mogu koristiti kao dobri taksonomski karakteri (Prichid i Rudall 1999; Lersten i Horner 2000; Pennisi i McConnell 2001; Franceschi i Nakata, 2005; Horner i sar. 2012; Kartal 2016).

Prisutvo ekstracelularnih kristala Ca-oksalata je manje ili više rasprostranjeno kod biljaka (Barabe i sar. 2004). Ekstracelularni kristali na površini epidermisa nađeni su kod Casuarinaceae (Berg 1994), *Gleditsia* L. (Borchert 1984), *Dracaena* Vand. ex L. (Pennisi i sar. 2001) i *Nymphaea* L. (Kuo-Huang 1992), dok su tapetalni rafidi pronajđeni kod Commelinaceae, Haemodoraceae, Philidraceae i Pontederiaceae (Prichid i sar. 2003). Ekstracelularni kristali kalcijum oksalata pronajđeni su samo na klipu predstavnika familije Araceae. Funkcija ekstracelularnih kristala ostaje nepoznata (Barabe i sar. 2004).

Kalijum se, pored ostalih katjona, nalazi i kao komponenta kristala sulfata, koji se retko javljaju kod biljaka (Dickison 2000). Kristali kalijum hlorida nalaze se u parenhimskom tkivu kod *Tradescantia pallida* (Rose) D.R.Hunt (Brizuela i sar. 2007).

Na osnovu naših rezultata, a i u saglasnosti sa literaturnim podacima (De Ioreo i Dove 2004; Barcenar-Arguello i sar. 2015), tip formiranja kristala kao i morfologija kristalita usko su povezani sa hemijskim sastavom kristala, kao i sa edafskim faktorima u kojima istraživane vrste rastu. S druge strane, strukturne karakteristike svake kristalne faze zavise od faktora kao što su: tip hemijske veze, veličina jona ili atoma, temperature kristalizacije, itd. Dakle, faze sa različitim hemijskim sastavima mogu se pojaviti u istom kristalnom obliku (npr. minerali galenit - PbS i silvit - KCl) se pojavljuju u istom kristalnom obliku [heksaedron (kocka)] i obrnuto, hemijski slične faze se javljaju u potpuno različitim kristalnim oblicima (slučaj u našem istraživanju: vedelit -  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - tetragonalni kristalni oblici i vevelit -  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - monoklinične kristalne forme). Takođe, modifikacija oblika različitih kristala može zavisiti od prisustva malih neorganskih molekula i umerenih do velikih organskih molekula (De Ioreo i Dove 2004). Važno je



napomenuti, da sa taksonomskog aspekta, morfološka raznolikost kristala kod biljaka može biti imati filogenetski značaj (Barcenas-Arguello i sar. 2015).

Pokazano je da su ekstracelularni kristali oksalata proizvod pseudo-nektarija kod roda *Stelis* Sw. (Chase i Peacor 1987), dok je prisustvo ekstracelularnih kristala povezano sa stomama kod rodova *Arum* L., *Philodendron* Schott. ili *Schismatoglottis* Zoll. & Moritzi (Dauman 1930, 1970). S druge strane, kod roda *Dracaena* kristali se nalaze između primarnog ćelijskog zida i kutikule (Pennisi i sar. 2001). Iako je funkcija ovih kristala nejasna, predložene su različite funkcije. Formiranje kristala na površini vrsta roda *Ramalia* je povezano sa uslovima životne sredine (Garty i sar. 2002). Pokazano je da kristali oksalata imaju fiziološku funkciju, uklanjanje oksalata, koji bi se inače nakupio u biljci u toksičnim količinama za samu biljku (Franceschi i Horner 1980). Pronađeni su i slobodni kristali na površini žiga tučka kod *Philodendron melinonii* Brongn. ex Regel (Barabe i Lacroix, 2000). Takođe, mnoge vrste zahtevaju kalcijum za klijanje polenove cevi (Richards 1986). Stoga je moguće da prisustvo kristala na površini žiga utiče na uspešno klijanje polena (Ivano i sar. 2004).

Ekstracelularni kristali imaju zaštitnu ulogu protiv herbivora (Franceschi i Horner 1980). Pokazano je da ženke insekta *Larinus sibiricus* legu dva ili tri jaja u svakoj cvasti vrste *X. annuum* (Volovnik 2016). Prema našim saznanjima, ovo je prvi nalaz o prisustvu kristala silvita i vedelita na površini involukralnih brakteja i kruničnog listića u biljnom carstvu. Naši rezultati pokazuju nove delimitirajuće karaktere za dve vrste roda *Xeranthemum*. Prisustvo kristala silvita na površini kruničnog listića vrste *X. cylindraceum* jasno razlikuje ovu vrstu od *X. annuum*. Ovi rezultati, takođe, pokazuju korisnost SEM-EDS analize u sistematskim studijama biljaka.

Treba istaći da je proces formiranja ekstracelularnih kristala i dalje neobjašnjen fenomen. Dodatna istraživanja ovih kristala, pre svega upotrebom transmisiona elektronske mikroskopije, neophodna su kako bi se zaista razumeo proces formiranja kristala, način depozicije, mesta sinteze kao i uloge koje oni imaju. Dodatna analiza, ovim i drugim odgovarajućim metodama, involukralnih brakteja drugih taksona u okviru tribusa Cardueae će biti svakako od značaja.



Cvetni region. U ovom istraživanju su proučavani i stubići plodnika nekoliko predstavnika iz *Xeranthemum* grupe. Stubić je dvodelan, odnosno sastoji se do dve grane. Pokazano je da se vrhovi grana stubića razlikuju između analiziranih taksona roda *Amphoricarpos*. Naime vrhovi grana stubića su vrlo kratki, pravi, tupi, povezani kod turske vrste *A. exsul*, dok su kod crnogorskih taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* i *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* oni kratki, šiljati, razilazeći, savijeni prema spolja. Ovaj podatak za crnogorske taksone je u saglasnosti sa opisom koji su dali Wang i sar. (2013) za rodove u okviru *Xeranthemum* grupe. Međutim, u našem istraživanju pokazano je da se *A. exsul* razlikuje od datog opisa za rod *Amphoricarpos*. Opis grana stubića više odgovora opisu jednogodišnjih rodova iz grupe (Wang i sar. 3013).

Cipsele. U ovom istraživanju je pokazano da su cipsele svih istraživanih vrsta, osim *Shangwua masarica* svilaste. Dvojne trihome na površini plodova se često javljaju kod predstavnika Asteraceae (Robinson 2009). Ove trihome, specifične za epidermis cipsele (Hess 1938), sastoje se od dve izdužene paralelne ćelije, koje nastaju od epidermske prekusorske ćelije koja podleže antiklinalnim deobama (Bremer 1987; Cron i sar. 1993; Hess 1938). Funkcija ovih trihoma je još uvek nejasna. Prema Hess (1938), glavna funkcija bi mogla biti apsorpcija vode. Ova tvrdnja je u saglasnosti i sa našim rezultatima jer smo uočili šuplje dvojne trihome kod unutrašnje cipsele *A. elegans*. Stoga, miksogene dvojne trihome zadržavaju vodu oko površine cipsele i tako potpomažu klijanju i verovatno doprinose disperziji semena (Hess 1938).

U okviru tribusa Cardueae, cipsele su gole kod većine predstavnika podtribusa Carduinae i Centaureinae, i obično dlakave ili gusto svilaste kod Carlininae, Cardopatiinae i Echinopsinae (Susanna i Garcia-Jacas 2009). Jedini izuzetak u okviru Carduinae je *Xeranthemum* grupa (Dittrich 1977). *Xeranthemum* grupa deli osobinu (prisustvo dvojnih trihoma) sa bazalnim podtribusima Carlininae, Cardopatiinae i Echinopsinae. Dodatno, Ozcan (2017) nije pronašao dvojne trihome kod roda *Cirsium*. Neposedovanje dvojnih trihoma kod *Shangwua* se može interpretirati kao gubitak (Petit 1997).

U ovom istraživanju je pokazano da se površina cipsele razlikuje između istraživanih vrsta. Površina cipsele vrsta *Sh. masarica* i *Amphoricarpos exsul* je nepravilno



talasasto mrežasta, kod vrste *A. elegans* je naborano - mrežasta, dok je kod vrsta *Xeranthemum inapertum*, *X. annuum*, *X. cylindraceum* i *Siebera pungens* mrežasta. Vrsta *Chardinia orientalis* se posebno izdvaja po izrazito papilozno-strijatnoj površini cipsele. Ovaj karakter odvaja *Ch. orientalis* od ostalih istraživanih vrsta. Karakter koji je uočljiv kod nekih grupa unutar Carduinae (the *Cousinia* group, *Dolomiaea* DC, *Jurinea* i neki rodovi iz *Onopordum* grupe) je naborani perikarp, dok je glatki perikarp konstantan kod *Carduus*, *Cirsium* i nekih drugih centralno azijskih Carduinae (Häffner 2000; Ozcan 2017).

Sve istraživane vrste imaju adaksijalnu inserciju cipsele. Ovo je u saglasnosti sa Dittrich (1977), koji je naveo da je površina insercije ploda predstavnika Cardueae prava i bazalna, ili je lateralna kod nekih rodova, npr. *Cardopatium*, *Chardinia*, *Siebera* i *Xeranthemum*. Ipak, Häffner (2000) je pronašla strogo bazalnu površinu insercije kod *Cousinia* grupe, *Cynara* L., *Dolomiaea* i *Pilostemon* Cass., kao što je i Ozcan (2017) kod *Cirsium*.

Takođe, asimetrični karpopodijum je osobina koja povezuje sve istraživane taksone. Karpopodijum je zona sa uočljivim sklerifikovanim epidermisom perikarpa (Haque i Godward 1984; Mattfeld 1923), koji učestvuje u odvajanju cipsele od receptakuluma (John 1921). Pronađen je kod predstavnika mnogih tribusa Asteraceae (Haque i Godward 1984). Štaviše, sugerisano je da je prisustvo dlakavog papusa i karpopodijuma povezano, jer obe strukture imaju ulogu u anemohoriji (Haque i Godward 1984). Karpopodijum može biti simetričan ili je češće asimetričan, neuočljiv ili istaknut ili čak može da odsustvuje (Funk i sar. 2009; Haque i Godward 1984). Oblik karpopodijuma najviše zavisi od mesta cipsele na receptakulumu (Sundberg, 1985). Važno je istaći da su oblik kao i građa karpopodijuma karakteri koji su se koristili u taksonomskim studijama (King i Robinson 1966; Sundberg 1985). Dodatno, Ozcan (2017) je dokumentovala nerazvijeni karpopodijum kod *Cirsium* taksona.

Papus sačinjen od čekinja je prisutan kod vrsta roda *Amphoricarpos* i *Shangwua masarica*, dok je papus izgrađen od ljuspi prisutan kod ostalih istraživanih vrsta što je u saglasnosti sa Dittrich (1996). Odnosno perasto-čekinjasti papus prisutan je kod *Shangwua masarica*, barbelatno - osasto zašiljen kod taksona roda *Amphoricarpos*, a osasto - zašiljen plevičasto - ljuspast kod analiziranih jednogodišnjih predstavnika. Ovi nalazi sugerišu





blizak odnos između jednogodišnjih rodova grupe. Opadajući papus je prisutan kod većine predstavnika Carduinae, dok je trajan papus pronađen kod većine vrsta roda *Jurinea* i srodnih rodova (Häffner 2000). U našem istraživanju utvrđeno je da svi analizirani taksoni imaju trajan papus. Kod Cardueae, pinule čekinja papusa su kraće od širine čekinje (hrapave čekinje), iste dužine kao širina čekinje (pinulatne čekinje), ili su mnogo duže i kapilarne (peraste čekinje) (Susanna i Garcia-Jacas 2009). U okviru Carduinae, osobine struktura čekinja papusa mogu pomoći u delimitaciji rodova (Häffner 2000; Mukherjee i Nordenstam 2008). Papus izgrađen od hrapavih cilindričnih čekinja pronađen je kod *Berardia* i *Staelina*, čekinjaste ili barbelatne čekinje su prisutne kod *Carduus-Cirsium* grupe, veoma dugačke peraste čekinje su prisutne kod *Cynara* grupe, veoma dugačke uočljive peraste čekinje su prisutne kod *Jurinea-Saussurea* grupe, i peraste čekinje kod *Onopordum* grupe (Susanna i Garcia-Jacas 2009).

Linczevsky (1962) je napomenuo da je kod *A. elegans* papus izgrađen od brojnih čekinja (30 – 40), uvek uzak, skoro čekinjast, fino zupčasto-hrapav, u poređenju sa papusom kod *A. neumayerianus*, koga čini mnogo manji broj čekinja, skoro uvek je širi, usko linearan, nejasno, testerasto-trepljast. Međutim, Linczevsky (1962) nije napomenuo da su čekinje papusa kod *A. elegans* organizovane u dva reda, što je veoma uočljivo na našim mikrografijama unutrašnje cipsele. Štaviše, ovakav papus nije pronađen kod drugih istraživanih vrsta u ovom istraživanju. Papus organizovan u dva reda je pronađen samo kod cipsele predstavnika Centaureinae (Susanna i Garcia-Jacas 2009). Dakle, ovaj podatak ima veliki taksonomski značaj.

Rezultati su takođe pokazali da je kod svih istraživanih vrsta papus direktno vezan za perikarp. Kod Cardueae, papus je direktno vezan za zid perikarpa kod bazalnih podtribusa Cardopatiinae, Carlininae i Echinopsinae, kao i kod rodova *Berardia* i *Staelina*, i kod *Xeranthemum* grupe iz Carduinae. Dakle, predstavnici *Xeranthemum* grupe dele ovu zajedničku osobinu sa ostalim podtribusima Cardueae. Takođe, rezultati su u saglasnosti sa radovima koje je sproveo Dittrich (1970, 1977). On je naveo da je papus kod *Xeranthemum* fiksiran za vertikalni zid vrha cipsele, dok je kod ostalih Carduinae i svih Centaureinae, papus fiksiran za parenhimatični prsten na vršnom regionu cipsele.



Ostaci nektarija, koje okružuju osnovu stubića, uočene su na vrhu unutrašnje cipsele vrste *A. elegans*. Prema Bernardello (2007) u okviru glavice, unutrašnji dvopolni cvetovi su obično sa nektarijama, dok su nektarije odsutne ili neprimetne u spoljašnjim ženskim ili sterilnim cvetovima što može imati taksonomsku vrednost. Prisustvo ili odsustvo nektarija, njihov raspored i druge karakteristike (npr. tip, topografija, morfo-anatomija) imaju taksonomski značaj u razgraničenju rodova ili vrsta (Smets 1986; Bernardello 2007; Sulborska 2011). To su pokazali i Karanović i sar. (2016) za određene vrste roda *Inula*. Iz ovog razloga raspored nektarija kod *A. elegans*, koji smo primetili kao okrugli ili blago petougaoni, može imati taksonomski značaj. Dakle, iako karakteristike nektarija mogu imati taksonomski značaj, dostupni podaci za *Xeranthemum* grupu, kao i tribus Cardueae su oskudni, i to bi trebalo razmotriti u budućim istraživanjima.

Plod kod predstavnika familije Asteraceae varira u obliku i dlakavosti. Reproductivni delovi biljaka su pouzdaniji pokazatelji intergeneričkih odnosa nego vegetativni delovi koji brže podležu morfološkim promenama tokom evolucije (Petit 1997). Dodatno se smatra da su morfološke karakteristike plodova (na primer, skulptuiranost) manje podložni uticaju faktora sredine (Barthlott 1984). Morfološke karakteristike cipsele pružaju taksonomski značajne karaktere i široko su korišćeni pri rasvetljavanju nejasnih taksonomskih odnosa unutar familije Asteraceae (Stebbins 1953; Barthlott 1984; Singh i Pandey 1984; Blanca i Díaz de la Guardia 1997; Zhu i sar. 2006; Garg i Sharma 2007; Inceer i sar. 2012), posebno unutar tribusa Cardueae (Dittrich 1977, 1985; Petit 1997; Häffner 2000; Zarembo i Boyko 2008; Abid i Qaiser 2009; Abid i Ali 2010). Ornamentacija semena i plodova pruža korisne taksonomske karaktere, tj. ovi karakteri su relativno pod manjim uticajem faktora sredine (Sears 1922). Dodatno, Petit (1997) je studirajući odnose između rodova unutar Cardueae istakao da su reproduktivne strukture više varijabilne između rodova.

Optimizacija karaktera koji su analizirani u ovom istraživanju, kao i nekih koji su pomenuti od strane drugih autora (npr. izgled šiljka (mukro) involukralne brakteje kao i margina i boja papusa; Bremer 1994; Dittrich 1996; Wang i sar 2013) su prikazani na filogenetskom stablu *Xeranthemum* grupe (preuzeto i modifikovano iz rada Wang i sar. 2013) (Slika 28).



Neke osobine kao što su glatki spoljašnji periklinalni zidovi epidermskih ćelija, blago izvijugani antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa, raspored ćelija adaksijalnog epidermisa koji nalikuje na slagalicu ("puzle"), veoma mali mukro involukralnih brakteja, crna margina involukralnih brakteja kao i odsustvo kristala vedelita dele vrste *Amphoricarpos exsul* i *Shangwua masarica* i *Sh. denticulata*, dok izvijugani antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa, šilaste involukralne brakteje, kristali vedelita na površini involukralnih brakteja kao i osasto-zašiljen, plevičasto-ljuspast papus povezuju jednogodišnje vrste *Chardinia orientalis*, *Siebera pungens* i *Xeranthemum inapertum*.

Involukralne brakteje svih predstavnika *Xeranthemum* grupe su kožasto-opnaste i često obojene (Wang i sar. 2013). Istraživane vrste imaju kožasto-opnaste, više manje papiraste, pergamentne brakteje sa različitom veličinom šiljka (mukro), koji je relativno kratak kod *A. exsul* i *Sh. masarica*, dugačak kod *Ch. orientalis* i *X. inapertum*, i veoma dugačak i uzdignut kod *S. pungens* (Bremer 1994). Analiza herbarijumskih eksikata je pokazala da brakteje vrsta oba roda, *Amphoricarpos* i *Shangwua*, imaju crnu marginu. Dimorfne cipsele su prisutne kod *A. exsul* i *Ch. orientalis* (Bremer 1994). Petit (1997) je sugerisao da su sterilne cipsele kod *Siebera* i *Xeranthemum* verovatno nastale od tipa cipsele kod roda *Amphoricarpos*, koji poseduje spljoštene i krilate spoljašnje cipsele, što filogenetski može značiti da su cipsele kod ovih predstavnika išle u pravcu od dimorfnih prema monomorfnim te da su one filogenetski mlađe.

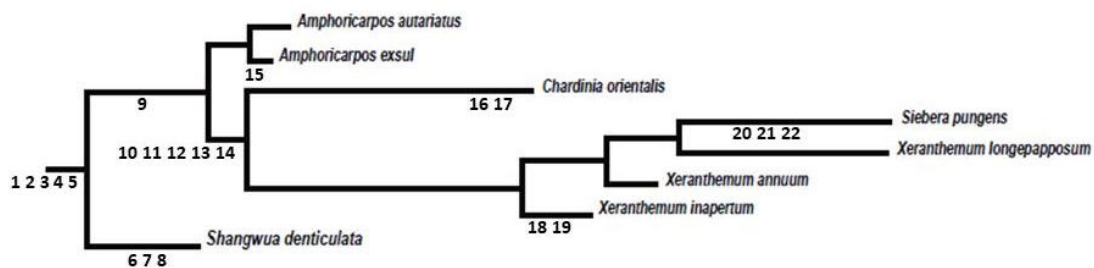
Takođe, boja papusa može biti dodatni taksonomski karakter (Häffner 2000). Većina predstavnika Carduinae imaju beli do krem obojeni ili čak braonkast papus (Häffner 2000), što je pokazano i u ovom istraživanju, odnosno, boja papusa varira između istraživanih vrsta. Izuzetak je vrsta *S. pungens* kod koje je papus transparentan sa braon prugom na sredini ljuspi (Wang i sar. 2013).

Sledeće osobine se mogu potencijalno smatrati specifičnim za vrste: goli adaksijalni epidermis lista i površine cipsele, nepravilno mrežasta površina involukralne brakteje kao i perasto-čekinjasti papus za vrste *Shangwua masarica* i *Sh. denticulata*; barbelatno - osasto zašiljen papus za taksone roda *Amphoricarpos*; nepravilan oblik ćelija epidermisa adaksijalne strane lista kao i kutikularni nabori i papilozna površina cipsele kod *Chardinia*



*orientalis*; kanalni izgled antiklinalnih zidova ćelija adaksijalnog epidermisa i pločice voskova na površini involukralnih brakteja za *Xeranthemum inapertum*; i snažno zadebljali nabori spoljašnjih zidova ćelija adaksijalnog epidermisa i involukralna brakteja sa belim prileglim trihomama u centralnom delu za *Siebera pungens*.

Osobine kao što su vermiformne trihome na stablu i abaksijalnoj površini lista, adaksijalna insercija cipsele i asimetričan karpodijum, kao i direktno vezivanje papusa za perikarp, su zajedničke za sve istraživane taksone.



Slika 28. Filogenetsko stablo *Xeranthemum* grupe (preuzeto iz rada Wang i sar. 2013) pokazuje distribuciju istraživanih karaktera. 1 = izgled ćelija adaksijalnog epidermisa kao slagalica ("puzle"); 2 = kratak murko involukralne brakteje; 3 = crna margina involukralne brakteje; 4 = glatki spoljašnji periklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa; 5 = blago izvijugani antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa; 6 = gola površina cipsele; 7 = goli adaksijalni epidermis; 8 = perasto-čekinjasti papus; 9 = dimorfne cipsele; 10 = izvijugani antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa; 11 = šilaste involukralne brakteje; 12 = glatke involukralne brakteje; 13 = kristali vedelita na površini involukralnih brakteja; 14 = osasto-zašiljen, plevičasto ljuspast papus; 15 = barbelatno - osasto zašiljen papus; 16 = kutikularni nabori ćelija epidermisa adaksijalne strane lista; 17 = papilozna površina cipsele; 18 = kanalni izgled antiklinalnih zidova ćelija adaksijalnog epidermisa; 19 = pločice voskova na površini involukralnih brakteja; 20 = snažno zadebljali nabori spoljašnjih zidova ćelija adaksijalnog epidermisa; 21 = dugačak, uspravan, oštar, šilast mukro involukralne brakteje; 22 = transparentan papus sa braon prugom na sredini ljuspi. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 = naši rezultati; 2, 3, 9, 11, 21, 22 = rezultati iz literature (Bremer 1994; Dittrich i sar. 1996; Wang i sar. 2013).



### 5.3. Anatomija

Podzemne strukture. Taksoni roda *Amphoricarpos* imaju zadebljale podzemne strukture, rizome, koji obrazuju adventivne korenove. Generalno, anatomske studije koje su uključivale korenove i rizome uglavnom su bile fokusirane na one vrste koje poseduju neke sekretorne strukture i imaju potencijalnu primenu u farmaciji. Cury i Appezzato-da-Gloria (2009) su detaljno analizirali i dokumentovali različite sekretorne strukture u zadebljalim podzemnim organima (koren, ksilopodijum, podzemno stablo) šest vrsta iz familije Asteraceae koje pripadaju različitim tribusima. Anatomska istraživanja podzemnih organa taksona iz tribusa Cardueae su oskudna (Fritz i Saukel 2011a, 2011b), a većina studija se bavi južnoameričkim vrstama, posebno onima koje sadrže sekretorne kanale i šupljine (Melo-de-Pinna i Menezes 2002; Appezzato-Da-Gloria i sar. 2008).

Ginko i sar. (2016) su istraživali validnost anatomske karaktere korena i rizoma 59 vrsta koje pripadaju tribusima Cardueae i Cichorieae za taksonomsku klasifikaciju i filogenetsku rekonstrukciju, iako je, izbor taksona bio zasnovan na farmaceutskom značaju. Oni su zaključili da većina anatomske osobine pokazuje barem neki stepen homoplazije u evoluciji, ograničavajući tako njihovu primenljivost kao filogenetski informativnih karaktere. Fritz i Saukel (2011c) dokumentovali su zanimljiv fenomen postojanja interksilarne plute u korenu dve vrste roda *Saussurea*. Interksilarne pluta nastaje u sekundarnom ksilemu i uključuje razvoj periderma koji razdvaja izvorno ksilemski cilindar. Na taj način se koren razdvaja na različite delove (Fritz i Saukel 2011c). Svakako je neophodno više komparativnih taksonomskih studija o anatomiji korena/rizoma i drugih vrsta iz tribusa Cardueae.

Adventivni koren. Kod vrsta iz familije Asteraceae prisustvo meristematskog endoderma i sekretornih kanala je povezano sa adventivnim korenovima (Williams 1947; Melo-de-Pinna i Menezes 2002). Prema Williams (1947), koji je proučavao veliki broj različitih biljnih vrsta, meristemski endodermis stvara tkiva između endodermisa i hipodermisa. Dokumentovano je da u korenu *Ianthopappus corymbosus* (Manje) Rokue & DJNHind (Mutisieae, Asteraceae), meristemski endodermis formira više od 2/3 kore, dok hipodermis,



u ranim fazama diferencijacije, proizvodi spoljašnji deo kore (Melo-de-Pinna i Menezes 2002). Isto tako, kod vrste *Richterago* Kuntze (Melo-de-Pinna 2000), meristemski endodermis samo formira unutrašnju koru. Takođe, kod *I. corymbosus*, meristemski endodermis ima glavnu ulogu u formiranju sekretornih kanala (Melo-de-Pinna i Menezes 2002). Štaviše, epitelna organizacija ćelija sekretornih kanala adventivnog korena podržava isključivanje *I. corymbosus* iz roda *Richterago* (Melo-de-Pinna i Menezes 2002). U našem istraživanju, nije uočen meristemski endodermis, jer su za analizu korišćeni stariji adventivni korenovi, kod kojih je kora već razvijena. Iako su sekretorni kanali korena, koji sadrže lipofilne supstance, česti kod predstavnika familije Asteraceae (Fahn 1979; Cury i Appezzato-da-Gloria 2009; Janačković i sar. 2019), kao i kod nekih vrsta tribusa Cardueae (Williams 1954; Metcalfe i Chalk 1950), oni nisu pronađeni u adventivnom korenu vrsta roda *Amphoricarpos*.

**Koren.** Pojava sekundarnih tkiva u korenu obe istraživane vrste roda *Xeranthemum* čini se neuobičajenim, jer su vrste ovog roda jednogodišnje, a sekundarno debljanje kod jednogodišnjih biljaka je izuzetak (Sidhu i Saini 2011). Fritz i Saukel (2011) su takođe istraživali anatomiju podzemnih delova nekih medicinski važnih vrsta i primetili sekundarni floem. Tačan razlog zašto vrste roda *Xeranthemum* obrazuju sekundarna tkiva u korenu nije jasan. Iniciranje sekundarnog rasta korena može se smatrati promenom životne forme, sa jednogodišnje na višegodišnju. Odnosno kada korenovi postanu vijabilni, biljka može sledeće godine formirati nove izdanke (Sidhu i Saini, 2011). Međutim, sekundarna tkiva nisu primećena u stablu kod ova dve istraživane vrste. Samo koren pokazuje sekundarnu građu.

Postoji i alternativna hipoteza koju smo mi u ovom istraživanju postavili: promena je bila u suprotnom smeru, od višegodišnje forme ka jednogodišnjoj. U grupi *Xeranthemum*, vrste rodova *Amphoricarpos* i *Shangwua* rastu u planinskim područjima (Susanna i Garcia-Jacas 2009; Wang i sar. 2013), dok vrste jednogodišnjih rodova, *Xeranthemum*, *Siebera* i *Chardinia*, rastu u otvorenim stepama. Naša hipoteza daje ideju da je jednogodišnja forma *Xeranthemum*, *Chardinia* i *Siebera* sekundarna adaptacija na sušnu klimu od mezofilnih višegodišnjih predaka. Adaptacija nije potpuna i sekundarni rast je još



uvek prisutan u korenu uprkos ranom odvajanju *Xeranthemum* od *Amphoricarpos* u oligocenu (pre oko 27 miliona godina) prema Barres i sar. (2013).

**Rizom.** Rizom istraživanih vrsta roda *Amphoricarpos*, iako pokazuje sekundarnu građu, zadržao je primarnu koru. Anatomija rizoma može se smatrati tipičnom, osim uočenog ekscentričnog rasta. Evans i sar. (2012) su objavili zanimljiv fenomen ekscentričnog rasta stabla vrste *Artemisia tridentata* Nutt. Pokazali su da determinisani rast cvetnih grana uzrokuje umiranje vaskularnog kambijuma koji okružuje njihove tačke vezivanja na glavnom stablu. Ova pojava dovodi do ekscentričnog rasta stabla. Štaviše, oni su predložili da ovaj neobičan fenomen ekscentričnog rasta, koji nije povezan sa interksilarnom plutom, podržava hipotezu da je *A. tridentata* poreklom od zeljastog pretka i da je sekundarno evoluirala i ima nesavršenu drvenastu građu. Međutim, ekscentrični rast zabeležen kod rizoma istraživanih vrsta roda *Amphoricarpos* nema isti scenario. Ovo podržava našu hipotezu prema kojoj je u *Xeranthemum* grupi jednogodišnja forma predstavnika koji naseljavaju suva staništa (na primer stepe) nastala od višegodišnje forme planinskih predaka (Barres i sar. 2013; Garnatje i sar. 2004).

Takođe, Omer i Moselei Jr. (1981) su proučavali anatomiju vegetativnih organa vrste *Jaumea carnosus* (Less.) A.Grai i dokumentovali vrlo široke parenhimske zrake koji se razvijaju u sekundarnim tkivima rizoma. Ove parenhimske zrake autori povezuju sa usporavanjem aktivnosti vaskularnog kambijuma koji formira depresije na stablu. Široki parenhimski zruci su takođe zabeleženi u rizomima istraživanih taksona roda *Amphoricarpos*. Takođe, zaključeno je da se adventivni korenovi koji polaze sa rizoma razvijaju od parenhimskih tkiva blizu primarnog ksilema i od interfascikularnog regiona blizu primarnog floema (Omer i Moselei Jr 1981).

**Drška cvasti.** Anatomija drške cvasti istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* je tipična i prethodno opisana za Asteraceae (Metcalf i Chalk 1957). Uočeno je nekoliko takozvanih "kortikalnih" provodnih snopića, izvan kruga sačinjenog od medularnih provodnih snopića. Prema autorima Metcalfe i Chalk (1950), prisustvo medularnih i kortikalnih provodnih snopića važno je za taksonomiju. Makbul i sar. (2012) pronašli su kortikalne provodne



snopiće u stablu *Scorzonera ahmet-duranii* Makbul & Coskunc, ali ne i u stablu srodne *S. semicana* DC., što ukazuje na taksonomski značaj ovih snopića. U drugoj studiji, Makbul i sar. (2016) su kod turskih taksona *Scorzonera* L. pronašli male kortikalne provodne snopiće među glavnim velikim provodnim snopićima. Međutim, autori navode da ne postoji korelacija između ove osobine i subgeneričke ili sekcijske taksonomije (Makbul i sar. 2016).

Pojava kortikalnih i medularnih provodnih snopića je takođe dokumentovana kod *Centaurea sadleriana* Janka (Luković i sar. 2013) i *I. corymbosus* (Melo-de-Pinna i Menezes 2002). Autori Melo-de-Pinna i Menezes (2002) razlikuju kortikalne provodne snopiće od lisnih tragova u odnosu na položaj ksilema i floema. U kortikalnim provodnim snopićima ksilem je izvan floema, dok je u lisnim tragovima ksilem orijentisan prema osi organa. Postavlja se pitanje da li su ovi kortikalni provodni snopići zaista pozicionirani u korteksu kod istraživanih taksona roda *Amphoricarpos*? Jednostavnim histohemijskim testom, potvrdili smo da endodermis, čije su ćelije bogate skrobom, u ovom slučaju, okružuje sve provodne snopiće. Štaviše, u ovim snopićima, ksilem je orijentisan prema osi organa. Prema tome, treba biti opazan i treba proveriti orijentaciju ksilema/floema u snopićima pre upotrebe termina "kortikalni" za označavanje ovog tipa provodnih snopića. Ovo je s razlogom, jer se nekada ovi snopići nalaze unutar centralnog cilindra, samo prividno izvan kruga provodnih snopića, iako se termin kortikalni široko koristi u literaturi. Svakako, prisustvo ovih snopića može imati taksonomski značaj, ali je ipak neophodno u tu svrhu anatomski analizirati i druge srodne vrste iz *Xeranthemum* grupe i tribusa Cardueae.

Stablo. Anatomija stabla istraživanih vrsta roda *Xeranthemum* je tipična za familiju Asteraceae (Metcalf i Chalk 1957). Mlado stablo vrste *X. annuum* na poprečnom preseku ima pet jasno izraženih rebara, dok je mlado stablo vrste *X. cylindraceum* petougono. Ovaj karakter (oblik poprečnog preseka mladog stabla) može biti važan za taksonomiju. Anatomske karaktere drške cvasti takođe mogu biti taksonomski važni (Metcalf i Chalk 1950). Samo kod *X. annuum* uočeno je nekoliko "kortikalnih" provodnih snopića. Prema autorima prisustvo medularnih i kortikalnih provodnih snopića ima značajnu taksonomsku vrednost.





Istraživani taksoni rodova *Amphoricarpos* i *Xeranthemum* ne poseduju sekretorna tkiva u drškama cvasti. Većina taksona iz Cardueae ima samo kanale sa lateksom u nadzemnim delovima ili uopšte nemaju sekretorne organe, npr. *Xeranthemum*, *Siebera*, *Chardinia*, *Cardopatum* (Dittrich, 1997). Morfologija i distribucija sekretornih struktura su od velike taksonomske važnosti. Tako, nepostojanje sekretornih organa u vegetativnim organima istraživanih taksona povezuje rodove *Amphoricarpos* i *Xeranthemum*.

List. Većina predstavnika Carduinae ima vunasti indumentum na obe površine lista ili samo na abaksijalnoj strani (Haffner 2000), što je takođe bio slučaj kod vrsta koje smo proučavali. Mnogo gušći indumentum zabeležen je na abaksijalnoj strani taksona roda *Amphoricarpos*. U familiji Asteraceae zabeležene su četiri vrste stoma: anomocitne, brahiparacitne, anizocitne i diacitne (Adedeji i Jewoola 2008), koje su okružene tipičnim epidermskim ćelijama ili pomoćnim ćelijama. Freire i sar. (2007) su istraživali epidermske karakteristike roda *Baccharis* L. i pronašli šest tipova stoma: anomocitni, anizocitni, ciklocitni, aktinocitni, tetracitni i staurocitni. Podaci dobijeni u našem istraživanju ukazuju da istraživane vrste roda *Xeranthemum* poseduju isti tip stome - anomocitni.

Rezultati epidermalnih otisaka listova istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* i vrsta roda *Xeranthemum* u saglasnosti su sa našim mikromorfološkim istraživanjima. Taksonomski značaj karakteristika epidermisa lista je vrlo dobro dokumentovan u familiji Asteraceae (Barthlott 1981; Adedeji i Jewoola 2008; Karanović i sar. 2015; da Silva i dr. 2014).

Kapitatne žlezdane trihome se nalaze na dršci cvasti kao i na listovima svih istraživanih taksona roda *Amphoricarpos*, ali su mnogo brojnije na abaksijalnoj površini lista. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su takođe pokazali da su mikromorfološke karakteristike lista i stabla korisne u razgraničavanju ispitivanih vrsta roda *Xeranthemum*. Ove dve srodne vrste razlikuju se po tipu žlezdanih trihoma, *X. annuum* ima biserijatne, dok *X. cylindraceum* poseduje kapitatne sesilne trihome.

Šupljine, kanali, idioblasti, kao i žlezdane trihome, uočene su u i na listovima mnogih predstavnika familije Asteraceae (Milan i sar. 2006; Duarte i sar. 2011; Camilotti i sar. 2014). Kod predstavnika familije Asteraceae, široko rasprostranjene trihome na



stablima i listovima su kapitatne žlezdane trihome kratkog vrata, u obliku žlezdanih tačaka (Robinson 2009). Žlezdane trihome se često sastoje od biserijatne drške, obično formirane od pet parova ćelija (Ciccarelli i sar. 2007), i glave, formirane od jedne do mnogo ćelija što je i pokazano u našem istraživanju za taksone roda *Amphoricarpos* i *X. annuum*. Razvoj žlezdanih trihoma opisan je kod *Artemisia annua* L. (Duke i Paul 1993; Duke i sar. 1994) i *A. campestris* subsp. *maritima* (DC.) Arcang. (Ascensao i Pais 1987). Analizirajući žlezdane trihome kod vrste *Grindelia pulchella* Dunal, Bartoli i sar. (2011) su dokumentovali da se proizvod izlučivanja akumulira između ćelijskog zida i kutikule, koja se raspukne i oslobađa sadržaj. Takođe je pronađeno da se sekret sastoji od različitih specijalizovanih metabolita, npr. etarskih ulja, seskviterpenskih laktona, supstanci sličnih pektinu, flavonoida, itd. (Ascensao i Pais 1987, 1988; Pagni i sar. 2003; Andreucci i sar. 2008; Lusa i sar. 2016). Osobine indumentuma (morfologija, rasprostranjenost i gustina žlezdanih i nežlezdanih trihoma, kao i karakteristike stominog aparata) predstavljaju važne karaktere u taksonomiji (Karanović i sar. 2015).

Klasifikacija trihoma je veoma kompleksna zbog velike morfološke raznolikosti i mikrostrukture, različitog porekla i lokacije, kao i različitog načina izlučivanja sekreta (Werker i sar. 1985). Trihome se mogu razlikovati po broju ćelija, rasporedu, obliku i dužini (Werker 2000). Tako je opisano više od 300 tipova trihoma (Spring 2000). Uprkos ovoj ogromnoj heterogenosti u morfologiji, često sličnost indumentuma između srodnih rodova ukazuje na sličnost tih rodova i u drugim osobinama (Stebbins 1953). Tip trihoma je važan karakter, posebno na nižim taksonomskim nivoima (Stebbins 1953, Faust i Jones 1973; Sahu 1982; Koroliuk 1997; Krak i Mraz 2008). Trihomi *Carduinae* se mogu svrstati u jednoćelijske ili višećelijske, sastavljene od jedne do nekoliko bazalnih ćelija i dugačkih ćelija; retko su trihome velike, jednoredne i višećelijske (Häffner 2000).

Anatomija lista često odražava uslove životne sredine. Osobine kao što su: debela kutikula, posebno dobro razvijeno mehaničko tkivo, hidrenhim, kao i mali odnos površine i zapremine ukazuju na kseromorfiju (Anderson i Creech 1975). Prisustvo debele kutikule, koja je dokumentovana u ovom istraživanju na adaksijalnoj površini svih istraživanih taksona, ukazuje na kseromorfiju (Anderson i Creech 1975). Biljke sa izolateralnom građom listova obično rastu na staništima sa intenzivnim sunčevim zračenjem. Vrste koje



pripadaju rodovima *Aster* L., *Galatella* Cass. i *Tripolium* Nees (Karanović i sar. 2015), kao i većina vrsta roda *Centaurea* i *Artemisia*, imaju izolateralnu građu listova, koja je karakteristična za biljne vrste koje rastu na sušnim staništima (Fahn i Cutler 1992; Luković i sar., 2013; Janačković i sar., 2019). Iako vrste roda *Xeranthemum* žive na otvorenim, sunčanim i sušnim staništima, naši rezultati pokazali su da obe istraživane vrste imaju dorziventralnu građu listova. Ovaj nalaz takođe ide u prilog našoj hipotezi da je rod *Xeranthemum* najverovatnije nastao od mezofilnih predaka i predstavlja bitnu osobinu za filogeniju grupe. U prilog tome idu i rezultati ovog istraživanja, koji su pokazali da listovi proučavanih taksona roda *Amphoricarpos* imaju dorziventralnu građu, manje više uobičajenu za predstavnike familije Asteraceae (Oliveira i sar. 2011; Duarte i sar. 2011). Treba istaći da iako su anatomske karakteristike listova često povezane sa staništem, oni su pod genetičkom kontrolom i zato imaju taksonomski značaj (Anderson i Creech 1975).

**Kristali.** Kristalne druze pronađene su samo u ćelijama listova taksona roda *Amphoricarpos*, ali ne i kod istraživanih vrsta roda *Xeranthemum*. Morfologija i distribucija kristala se smatraju genetički kontrolisanim od strane ćelije (Meric 2009) i mogu biti korisni u taksonomskoj proceni određenih taksona. Prema Prychid i Rudall (1999) kristalne druze su uobičajene kod dikotila.

Meric (2008) je dokumentovao druze u listovima (epidermis i mezofil) vrste *Coniza canadensis* (L.) Cronquist i *C. bonariensis* (L.) Cronquist. Kristali su nađeni u epidermskim ćelijama vrste *Gleditsia triacanthos* L. (Borchert 1984) i *Stilosanthes guianensis* (Aubl.) Sv. letci (Brubaker i Horner 1989). Takođe, Wu i Kuo-Huang (1997) su zabeležili druze u ćelijama epidermisa lista *Artocarpus altilis* (Parkinson ex Fernald) Fosberg i u mezofilnim ćelijama *A. altilis*, *Cudrania cochinchinensis* (Lour.) Iakuro Kudo & Masam., *Ficus virgata* Reinw. ex Blume i *Morus australis* Poir. Meric (2009) je pronašao druze u listovima mesofila vrste *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron. ali ne i u epidermism ćelijama listova. Pored toga, Lersten i Horner (2000) navode da druze, u listovima vrste *Prunus* L., mogu biti korisne za razjašnjavanje nejasne taksonomije ovog roda.

Kuo-Huang i sar. (2007) su naveli da druze u palisadnim ćelijama *Peperomia glabella* (Sw.) A.Dietr. učestvuju u fotosintetičkom procesu kao i da su dijometri ovih



kristala u vezi sa intenzitetom svetlosti. Štaviše, druze pružaju strukturnu podršku tkivima i uključene su u regulaciju kalcijuma (Nakata 2003). Dakle, za razumevanje taksonomskog značaja druzi u ovoj grupi potrebna su dodatna anatomska istraživanja i drugih taksona roda *Amphoricarpos*, kao i srodnih taksona iz *Xeranthemum* grupe.

Cvetni region. Veoma razvijeni višeslojni sklerenhim, koji je uočen u involukralnim braktejama svih istraživanih vrsta, može se smatrati dobrim zaštitnim slojem cvasti. Anatomija palje je vrlo slična anatomiji involukralne brakteje, jer te dve strukture predstavljaju homologe strukture, koje se razlikuju samo po položaju na receptakulumu (Harris 1995). Palje bi se mogle smatrati ili rudimentarnim braktejama koje podupiru pojedinačne cvetove ili involukralnim braktejama koje se nalaze između cvetova (Keil i Stuessi 1981; Bremer 1987; Robinson i Funk 1987). Kod predstavnika Cardueae receptakulum je obično čekinjast, a čekinje su brojnije od cvetova i nalaze se rasuto po receptakulumu (Bremer 1994). Na poprečnim preseccima involukralnih brakteja istraživanih vrsta roda *Xeranthemum* uočeni su kristali vedelita. Na površini brakteje, kod vrste *X. annuum* još se uočavaju i trihome. Ovi naši anatomske podaci su u saglasnosti sa našim mikromorfološkim istraživanjima. Kod vrsta roda *Amphoricarpos* ustanovili smo da prave palje formiraju usečeni jezičasti čunić, koji je više uzan kod *A. elegans*, a kod *A. neumayerianus* je širi i obično uzdužno nepravilno podeljen. Radijalne unutrašnje involukralne brakteje su karakteristične za rod *Xeranthemum* (Bremer, 1994).

Na poprečnim preseccima nezrelih cipsela taksona roda *Amphoricarpos*, u perikarpu, je dokumentovano nekoliko grupa sklerenhimskih vlakana, što je karakteristično za predstavnike ove grupe (Lavialle 1912; Petit 1997). U našem istraživanju uočeni su radialno izduženi i sklerifikovani zidovi ćelija epidermisa teste, koji su takođe spomenuti od strane autora Lavialle (1912) i Petit (1997). Takođe, kao što je dokumentovano za familiju (Davis 1966; Johri i sar. 1992), sve istraživane vrste imaju anatropni semeni zametak sa bazalnom placentacijom. Kod vrsta roda *Xeranthemum* u našem istraživanju uočeno je bočno otvaranje antera, iako je introrzni način uobičajeniji za Asteraceae (Katinas i sar. 2016). Fitomelaninski sloj uočen kod nekih predstavnika familije Asteraceae (Pandey i Singh 1982) nije uočen kod istraživanih taksona roda *Amphoricarpos*, kao ni kod



*X. annuum* (Ozcan i Akinci 2019). Osobine embriona, kotiledona i endosperma su u skladu sa opisom koji je dat u studiji koju je sprovedla Häffner (2000). U našem istraživanju cvasti balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* dokumentovan je endosperm koji se sastoji od jednog do tri sloja, dok su Ozcan i Akinci (2019) pokazali da je kod *X. annuum* endosperm jednoslojan, a Jana i Mukherjee (2014) da je dvoslojan. U našem istraživanju, cvasti vrsta roda *Xeranthemum* nisu bile u stadijumu formiranja plodova, pa rezultati ne mogu biti uporedivi sa sličnim studijama vezanim za plodove vrste *X. annuum* (Jana i Mukherjee 2014; Ozcan i Akinci 2019).

Neki anatomski i morfološki karakteri cveta, npr. oblik pappusa, grane stubića, morfo-anatomija krunice i antera, korisne su za klasifikaciju taksona unutar tribusa familije Asteraceae (Judd i sar. 2002). Takođe, embriološki karakteri mogu biti važni u razumevanju taksonomskih odnosa između familija, rodova i taksona (Palser 1975; Stuessy 2009). Međutim, istorijski gledano, taksoni familije Asteraceae su kompleksni za ontogenetske studije (Dadpour i sar. 2012), a radovi koji se tiču anatomije cvetova i cvasti su retki. Batista i De Souza (2017) su proučavali ontogeniju cveta kod deset vrsta iz familije Asteraceae i pokazali da su karakteri cvetova korisni u razlikovanju vrsta. Takođe, Franca i sar. (2015) su istraživali embriologiju dve vrste roda *Ageratum* L. i potvrdili heterogenost embrioloških procesa u familiji. Dobijeni rezultati svakako doprinose poznavanju anatomije cvasti oba istraživana roda, ali treba izvršiti detaljniju analizu cvasti srodnih vrsta iz ove grupe.

Svi istraživani taksoni roda *Amphoricarpos* pokazuju slične anatomske karakteristike. Anatomska uniformnost ukazuje na veoma bliske odnose između ispitivanih taksona. Analizirani anatomski kvalitativni karakteri doprinose poznavanju generalne anatomije roda *Amphoricarpos*.

Dobijeni rezultati za anatomske karakteristike vrsta *X. annuum* i *X. cylindraceum* pokazali su brojne kvantitativne i kvalitativne razlike koje bi mogle imati taksonomski značaj. Odabrani kvantitativni i kvalitativni karakteri stabla, lista i drške cvasti (oblik, tip žlezdanih trihoma, prisustvo kortikalnih provodnih snopića), na osnovu kojih se istraživane vrste roda *Xeranthemum* anatomski razlikuju, doprinose boljoj identifikaciji taksona. Pored



toga, svi dobijeni karakteri se mogu smatrati dodatnim karakterima koji bi mogli pomoći u razgraničenju drugih vrsta iz tribusa Cardueae.

Dalja istraživanja srodnih vrsta iz *Xeranthemum* grupe ili tribusa Cardueae mogu da rasvetle proces formiranja sekundarnih tkiva u korenu. Ovde se pre svega misli na jednogodišnje predstavnike iz grupe. Takođe, anatomska istraživanja ostalih vrsta iz *Xeranthemum* grupe su neophodna kako bi se potvrdila naša hipoteza o adaptaciji datih taksona na sušna staništa. Štaviše, anatomska i embriološka istraživanja bi doprinela pronalasku dodatnih potencijalnih taksonomskih karaktera koji bi doprineli boljoj identifikaciji vrsta ili delimitaciju određenih taksona. Takva istraživanja bi doprinela i boljoj analizi karakteristika cvetova, kao što su otvaranje antera, građa krunice, žiga i plodnika itd.



## 5.4. Fitohemija

Masne kiseline. GC-FID analizom u cipselama istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* u ovom istraživanju detektovano je ukupno osam masnih kiselina od kojih je šest identifikovano. Dominantna masna kiselina kod svih istraživanih taksona je linolna što je i pokazano kod drugih taksona iz tribusa Cardueae (Powell i sar. 1967; Spencer i sar. 1969; Morris i sar. 1968; Janačković i sar. 1996; Kurt i sar. 2019). Takođe, pokazano je da se razlikuju i profili masnih kiselina između obodnih i centralnih cipsela istog taksona. U literaturi nema podataka o uporednoj analizi masnih kiselina dimorfnih cipsela heterokarpnih taksona. Ovaj podatak je veoma značajan za buduća slična istraživanja.

Sa taksonomskog aspekta bitno je naglasiti da profili masnih kiselina istraživanih taksona nisu identični. Neke masne kiseline su pronađene kod nekih taksona, dok kod drugih odsustvuju. Tako u obodnim cipselama vrste *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* nije detektovana jedna masna kiselina (neidentifikovana). Takođe, druga (neidentifikovana) masna kiselina, kao i margarinska masna kiselina su pronađene samo u obodnim cipselama taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *autariatus*. S druge strane, od svih istraživanih taksona, jedino u centralnim cipselama taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* nije pronađena linolenska masna kiselina. Taksoni *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* su sličniji, jer u njihovim cipselama nisu detektovane jedna masna kiselina (neidentifikovana) kao ni margarinska. Ovi rezultati su od taksonomske važnosti pri rešavanju kompleksne taksonomije roda *Amphoricarpos* na Balkanu.

Profil masnih kiselina cipsele vrste *X. cylindraceum* se razlikuje od profila masnih kiselina istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* po dominantnoj masnoj kiselini (oleinska), kao i po prisustvu palmitoleinske, eikozenoinske, arahidinske i behenske masne kiseline i odsustvu margarinske kiseline.

Dominantna masna kiselina (oleinska) u cipselama vrste *X. cylindraceum* je različita od dominantne masne kiseline pronađene u ulju cipsela drugih taksona u okviru tribusa Cardueae. Dakle, linolna masna kiselina je pronađena kao dominantna masna kiselina u cipselama vrsta *X. annuum* (Powell i sar. 1967), dvema vrstama roda *Carlina* (Spencer i



sar. 1969), *Arctium minus* L. (Morris i sar. 1968), dvema vrstama roda *Ptilostemon* i *Cirsium* (Janačković i sar. 1996). Takođe Kurt i sar. (2019) su analizirali sastav masnih kiselina iz cipsela 11 taksona tribusa Cardueae iz Turske. Dominantna masna kiselina kod svih istraživanih taksona bila je linolna. Linolenska masna kiselina je bila dominantna u ulju 19 različitih vrsta roda *Centaurea* (Janačković 2004), dok je kod vrste *C. galicicae* Micevski to palmitinska, a kod srodne vrste *C. tomorosii* Micevski linolelaidinska (Janačković i sar. 2017).

Pokazano je da profili masnih kiselina cipsela mogu imati taksonomski značaj na nivou roda u analizi sastava masnih kiselina vrsta *Ptilostemon strictus* (Ten.) Greuter, *P. afer* (Jacq.) Greuter, *Cirsium candelabrum* Griseb. i *C. eriophorum* (L.) Scop. (Janačković i sar. 1996). Preciznije, linolenska kiselina je pronađena samo u ulju cipsela vrsta roda *Cirsium*, što podržava odvajanje roda *Ptilostemon* iz roda *Cirsium* (Janačković i sar. 1996). Ozcan i sar. (2016) su takođe zaključili da se sastav masnih kiselina cipsela može koristiti kao dodatni hemotaksonomski karakter za rod *Cirsium*. Uočene razlike, posebno između vrsta *X. cylindraceum* i *X. annuum*, upućuju da se odnos linolenske i oleinske masne kiseline može smatrati hemotaksonomskim karakterom za razlikovanje ove dve vrste.

Vrste familije Asteraceae magacioniraju proteine i masti u svojim semenima. Po pravilu, ulja u semenima su bogata linolnom kiselinom i sadrže manju količinu oleinske i palmitinske kiseline; linolenska i stearinska su zastupljene u malom procentu (Shorland 1963). Shorland (1963), Hilditch i Williams (1964) i Hegnauer (1964) su ustanovili neke taksone sa neuobičajenom C<sub>18</sub> nesaturisanom kiselinom kao glavnom masnom kiselinom u semenu (više od 10 %). Jones i Earle (1966) i Barclay i Earle (1974) su utvrdili veliki broj vrsta u familiji Asteraceae koje produkuju ulja sa neuobičajenim masnim kiselinama. Pored zajedničkih masnih kiselina, masti iz semena nekih taksona iz tribusa Cardueae sadrže specijalne epoksi i hidroksi - masne kiseline sa konjugovanim dvogubim vezama, koje su pronađene kod vrsta *Artemisia*, *Calendula* L., *Cosmos* Cav., *Helianthus* L., *Tragopogon* L., *Vernonia* Schreb., *Osteospermum* L. i *Dimorphotheca* Vaill. ex Moench. Od hidroksi - masnih kiselina izolovane su  $\alpha$ - i  $\beta$ -dimorfekolinska kiselina. Prisustvo  $\gamma$ -linolenske kiseline, neuobičajene masne kiseline, zabeležena je u ulju cipsele nekih vrsta roda





*Saussurea* (Tsevegsüren i sar. 1997). Cipsele nekih mongolskih vrsta Asteraceae sadrže neuobičajene trans-masne kiseline (Tsevegsüren i sar. 2000).

Prema nekim autorima ekološki faktori imaju dominantan uticaj na sastav masnih kiselina semena u odnosu na genetičke faktore (Thompson i sar 1973; Johnson i Jellum 1972; Tremolieres i sar. 1982; Marin i sar. 1983; 1989a; 1989b). Korišćenje masnih kiselina kao taksonomskih markera može biti opravdano samo ako one ne variraju u svom sastavu pod uticajem ekoloških faktora. Stabilnost sastava masnih kiselina ukupnih lipida cipsela, bez obzira na poreklo u odnosu na lokalitete sa kojih su uzorci sakupljeni, govori u prilog izučavanju i primeni ovih karaktera u hemotaksonomskim studijama. Sastav masnih kiselina ne može se koristiti kao taksonomski parametar na istom taksonomskom nivou kod različitih grupa biljaka (Janačković 2004) što je i pokazano u našem istraživanju. Masne kiseline se smatraju veoma značajnim hemotaksonomskim markerima u taksonomskim analizama određenih biljnih vrsta i korišćene su u analizama mnogih grupa biljaka (Stuessy 2009; Zhang i sar. 2015; Ozcan i sar. 2016). Značaj masnih kiselina, kao taksonomskih markera na raznim nivoima i u okviru različitih taksonomskih kategorija je veliki (Harborne i Turner 1984, Janačković i sar. 2017). Takođe, U/S indeks (nezasićene/zasićene masne kiseline) se može koristiti kao pouzdan taksonomski marker (Marin i sar. 1991).

Seskviterpenski laktoni. Zajednička osobina svih gvajanolidnih jedinjenja izolovanih iz taksona roda *Amphoricarpus*, i nazvanih amforikarpolidi, jeste da imaju jedinstveni obrazac za oksigenaciju koji nije pronađen ni kod jednog taksona iz tribusa Cardueae niti kod drugih tribusa familije Asteraceae. Sve prethodne fitohemijske studije (Djordjević i sar. 2004; 2006; Cvetković i sar. 2014) taksona roda *Amphoricarpus* sa zapadnog Balkana otkrile su ukupno trideset amforikarpolida (sa istom osnovnom strukturom). Naše istraživanje retke i stenoendemične vrste *A. elegans* sa zapadnog Kavkaza pokazalo je da je dominantno jedinjenje 3-deoksiamforikarpolid, koje je ranije pronađeno i kod crnogorskih taksona ovog roda. Ovaj rezultat, s obzirom na hemotaksonomski značaj amforikarpolida, predstavlja vezu između balkanskih i kavkaskih taksona roda *Amphoricarpus*.



Kavkaz se odlikuje raznolikim predelima sa biljnim zajednicama i genetičkom raznolikošću vrsta u odnosu na Mediteran, zbog svojih edafsko-klimatskih uslova, visokih hipsometrijskih nivoa, dobro izražene geografske izolacije, itd. (Shetekauri i Kutateladze 2017). Kavkaz se odlikuje visokim endemizmom i predstavlja jedan od najpoznatijih centara biodiverziteta (Akhalkatsi i sar. 2012). Flora Gruzije je zastupljena sa 4130 vrsta vaskularnih biljaka, od kojih 4034 vrsta pripada grupi skrivenosemenica (Nakhutsrishvili 1999). Od ukupnog broja vrsta, 1304 (32,3%) su endemične za Kavkaz i 261 (6,6%) za Gruziju (Schatz i sar. 2009). U flori Kavkaza 17 rodova je endemično, od kojih je većina zastupljena sa jednom vrstom, među njima je *Amphoricarpos elegans* (Akhalkatsi i sar. 2012). Među kalcifitima botaničko-geografske pokrajine Cochis najistaknutiji je, između ostalih, *A. elegans* (Shetekauri i Kutateladze 2017), koji pripada grupi „krečnjačkih endemita“ zapadnog Kavkaza (Linczevsky 1962).

Kako je *A. elegans* stenoendemična vrsta, za izolaciju laktona je korišćena veoma mala količina biljnog materijala (samo 1.00 g) u poređenju sa prethodnim istraživanjima, gde je korišćeno mnogo više biljnog materijala (Djordjević i sar. 2004; 2006). Zbog toga je bilo moguće identifikovati i okarakterisati samo dominantnan seskviterpenski lakton gvajanolidnog tipa 3-deoksiamforikarpolid.

Seskviterpenski laktoni su velika grupa hemijskih jedinjenja koja imaju širok spektar funkcionalnih grupa. Do sada je opisano više od 5000 struktura prirodnih seskviterpenskih laktona (Milosavljević i sar. 1999). Većina ovih jedinjenja je pronađena kod viših biljaka, uglavnom kod predstavnika familije Asteraceae (više od 90%), ali se mogu naći i kod nekih gljiva (Atrrog i sar. 2008). Najzastupljeniji seskviterpenski laktoni su germakranolidi, gvajanolidi i eudezmanolidi, klasifikovani na osnovu njihovih karbocikličnih skeleta. Strukturna karakteristika ovih jedinjenja je  $\gamma$ -laktonski prsten. Seskviterpenski laktoni su predmet konstantnih istraživanja širom sveta, zbog njihove biološke aktivnosti i ekoloških funkcija, kao i njihovog hemotaksonomskog značaja (Atrrog i sar. 2008; Repetto i Llesuy 2002; Da Costa i sar. 2005; Repetto i Boveris 2010).

Na osnovu ekstrakcije glavnih klasa specijalizovanih metabolita kod taksona familije Asteraceae, žlezdane trihome se smatraju glavnim mestima biosinteze i akumulacije seskviterpenskih laktona (Soković i sar. 2017; Da Costa i sar. 2005; Spring i



sar. 1989; Spring 1991; Spring i sar. 2001; Sakamoto i sar. 2005; Appezzato-da-Glória i sar. 2012; Lusa i sar. 2016). Kod predstavnike familije Asteraceae, a posebno kod predstavnika tribusa Cardueae, specijalizovani metaboliti pretežno uključuju lipofilna jedinjenja (posebno seskviterpenske laktone), dok su hidrofilna jedinjenja retko zastupljena (Susanna i Garcia-Jacas 2009). Seskviterpenski laktonei gvajanolidnog tipa, koji predstavljaju jednu od najvećih grupa među seskviterpenskim laktoneima izolovanih iz predstavnika familije Asteraceae, generalno pokazuju nisku kompleksnost (Djordjević i sar. 2004).

Seskviterpenski laktonei su pod direktnom genetičkom kontrolom i gotovo ne variraju u sastavu i sadržaju u odnosu na ekološke uslove, npr. vreme, faza razvića, stanište (Janačković 2004). Ovo je pokazano u infraspecijskoj studiji seskviterpenskog laktonea kod vrste *Ambrosia psilostachya* DC. u Severnoj Americi (Mabry 1970). Ova jedinjenja mogu imati taksonomski značaj na nivou vrste (npr. kod grupe *Achillea millefolium* L. (Kubelka i sar. 1999)), kao i roda, podtribusa, tribusa. SLs su značajni i u taksonomiji tribusa Cardueae kao i podtribusa Centaureinae (Nowak i sar. 1996). Autori su na osnovu distribucije 42 SLs kod 57 vrsta iz podtribusa Centaureinae diskutovali o taksonomiji tribusa.

Scotti i sar. (2012) su pomoću samoorganizovanih mapa (Self-Organizing Maps) molekularnih deskriptora, kao jednog vida neuronskih mreža, uradili klasifikaciju familije Asteraceae na tribuse na osnovu SLs. Rezultati su pokazali da se dobijena hemotaksonomska šema delimično preklapa sa klasifikacijom koju je dao Bremer, a koja se zasniva na morfološkim karakteristikama.

Takođe, utvrđeno je prisustvo seskviterpenskog laktonea knicina kod nekih predstavnika podroda *Acrolophus* (Cass.) Dobroc. kao i kod drugih taksona roda *Centaurea* (Geppert i sar. 1983; Nowak i sar. 1984, 1986; Gousiadou i Skaltsa, 2003). Vučković i sar. (2006) su analizirali sadržaj seskviterpenskog laktonea u nadzemnom delu vrste *Anthemis arvensis* L. i pokazali prisustvo laktonea anteindurolicida, koji je pronađen samo kod predstavnika roda *Anthemis* (*Anthemis indurata* Delile, *Anthemis pseudocotula* Boiss. i *Anthemis cotula* L.) što je hemotaksonomski značajno.

Poređenjem rezultata prethodnih studija seskviterpenskog laktonea taksona roda *Amphoricarpos* može se uočiti razlika u profilima ovih jedinjenja između taksona (Tabele



19 i 20). Iz tabela se može zaključiti da postoje razlike u količini i sastavu SLs kod istraživanih taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. Kod prvog taksona laktoni 2 i 4 dominiraju, dok kod drugog taksona preovladavaju laktoni 5 i 6. Takođe kod drugog taksona nije pronađen lakton 1. U drugom istraživanju istog taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* samo sa drugog lokaliteta (Djordjević i sar. 2006) pronađeno je 11 amforikarpolida, od kojih su sedam predstavljali nova jedinjenja. Za razliku od prethodne studije kod ovog taksona pronađen je i lakton 1. U sledećoj studiji, analizirani su SLs kod taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* i pronađeno je 13 amforikarpolida (2 – 8; 11 – 15; 19), koji su okarakterisani još u prethodnim studijama. Međutim, dominantni laktoni kod ovog taksona su bili 11 i 13. Cvetković i sar. (2014) su istraživali SLs kod dve podvrste vrste *A. autariatus* i dokumentovali različit sastav laktona. Kod *A. autariatus* subsp. *autariatus* pronađeno je sedam laktona (od kojih pet samo kod njega), dok je kod *A. autariatus* subsp. *bertisceus* pronađeno 14 laktona (od kojih 12 samo kod njega). Sumarno, uočava se razlika u sastavu SLs između crnogorskih taksona.

Metabolomički pristup zasnovan na NMR analizi (Cvetković i sar. 2018) pokazao je diferencijaciju na osnovu specijalizovanih metabolita, taksona roda *Amphoricarpos*, koji su prethodno klasifikovani kao dve vrste: *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* sa dve podvrste (Blečić i Mayer 1967). <sup>1</sup>H NMR analiza “otiska prsta” u kombinaciji sa statističkim analizama (PCA i OPLS-DA) pokazala je jasno razdvajanje između ovih vrsta, odnosno dobijene su dve grupe na osnovu metabolomičke sličnosti. Ova diferencijacija se zasnivala na sadržaju amforikarpolida, koji su svi oksigenisani na C-15, tipični za *Amphoricarpos* (Cvetković i sar. 2014; Đorđević i sar. 2004; Đorđević i sar. 2006; Jadranin i sar. 2013). Kod taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* glavni seskviterpenski laktoni su dodatno oksidovani u položaju 2, dok kod obe podvrste vrste *A. autariatus* preovladavaju oni seskviterpenski laktoni koji su oksidovani na C-9 (Cvetković i sar. 2018).

Potpunija slika taksonomskog značaja seskviterpenskih laktona kod roda *Amphoricarpos* na Balkanu zahteva istraživanje i taksona iz Bosne, *Amphoricarpos neumayerianus* ssp. *murbeckii*.

Tabela 19. Zbirna tabela fitohemijskih istraživanja SLs taksona roda *Amphoricarpos*

Taksoni*	Lokalitet	Država	SLs	Razlike	Referenca
<i>A. neumayeri</i> ssp. <i>neumayeri</i> * ( <i>A. neumayerianus</i> subsp. <i>neumayerianus</i> )	Orjen	Crna Gora	13 gvajanolida - amforikarpolida identifikovano; Lakton 9 dominantan	laktoni 2 i 4 dominiraju, prisustvo laktona 1	Djordjevic i sar. 2004
<i>A. neumayeri</i> ssp. <i>murbeckii</i> * ( <i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertisceus</i> )	Visitor	Crna Gora		veća količina laktona 5 i 6, odsustvo laktona 1	
<i>A. neumayeri</i> ssp. <i>murbeckii</i> * ( <i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertisceus</i> )	Karanfili, Prokletije	Crna Gora	11 gvajanolida - amforikarpolida identifikovano; 5-11 nova jedinjenja		Djordjevic i sar. 2006
<i>A. autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> * ( <i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i> )	Kanjon Tare	Crna Gora	13 amforikarpolida identifikovano (2-8; 11-15; 19) u odnosu na prethodne publikovane laktone; laktoni 11 i 13 dominantni		Jadrinin i sar. 2013
<i>A. autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> * ( <i>A. autariatus</i> subsp. <i>autariatus</i> )	Kanjon Tare	Crna Gora		laktoni 5,6,7,11,12	
<i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>bertisceus</i> * ( <i>A. autariatus</i> subsp. <i>bertisceus</i> )	Zeletin planina	Crna Gora	1-17 laktona, 9-17 novi amforikarpolidi		Cvetkovic i sar. 2014
<i>Amphoricarpos elegans</i>	Migaria planina	Gruzija	1 dominantan lakton (3-deoskiamforikaprolid)	lakton 1	rezultati ovog istraživanja

\* taksonomija u radovima prema Webb (1972).

Tabela 20. Identifikovani SLs kod crnogorskih taksona roda *Amphoricarpos* prema Djordjević i sar. (2004; 2006), Jadranin i sar. (2013) i Cvetković i sar. (2015)

Br.	Naziv	ANN	AAA	AAB
1	3-Deoxymphoricarpolide	+		+
2	Amphoricarpolide	+	+	+
3	15- <i>O</i> -Acetylamphoricarpolide	+	+	+
4	3,15-Di- <i>O</i> -acetylamphoricarpolide	+	+	+
5	3,15-Di- <i>O</i> -acetyl-9 $\beta$ -hydroxyamphoricarpolide	+	+	+
6	15- <i>O</i> -Isovaleroyl-3 $\beta$ - <i>O</i> -acetyl-9 $\beta$ -hydroxyamphoricarpolide	+	+	+
7	3,15-Di- <i>O</i> -acetyl-10 $\alpha$ (14)-epoxyamphoricarpolide	+	+	
8	3- <i>O</i> -Acetyl-2 $\alpha$ -hydroxyamphoricarpolide	+	+	+
9	15- <i>O</i> -Acetyl-2 $\alpha$ -hydroxyamphoricarpolide	+		+
10	15- <i>O</i> -Isovaleroyl-2 $\alpha$ -hydroxyamphoricarpolide	+		+
11	3,15-Di- <i>O</i> -acetyl-2 $\alpha$ -hydroxyamphoricarpolide	+	+	+
12	15- <i>O</i> -Isovaleroyl-3 $\beta$ - <i>O</i> -acetyl-2 $\alpha$ -hydroxyamphoricarpolide	+	+	+
13	3,15-Di- <i>O</i> -acetyl- $\alpha$ -acetoxiamphoricarpolide	+	+	+
14	15- <i>O</i> -acetyl-9 $\beta$ -hydroxyamphoricarpolide		+	+
15	15- <i>O</i> -acetyl-3-deoxyamphoricarpolide		+	+
16	3-Deoxy-10 $\alpha$ (14)-epoxyamphoricarpolide			+
17	3-Deoxy-10 $\alpha$ (14)-epoxy-11 $\alpha$ ,13-dihydroxy-11,13-dihydroamphoricarpolide			+
18	3-Deoxy-11 $\alpha$ ,13-dihydroxy-11,13-dihydroamphoricarpolide			+
19	15- <i>O</i> -acetyl-3-deoxy-11 $\alpha$ ,13-dihydroxy-11,13-dihydroamphoricarpolide		+	+
20	15- <i>O</i> -acetyl-3-deoxy-11 $\alpha$ -hydroxy-13-chloro-11,13-dihydroamphoricarpolide			+
21	3-Deoxy-15- <i>O</i> -acetyl-10 $\alpha$ ,14-epoxyamphoricarpolide			+
22	15- <i>O</i> -Acetyl-10 $\alpha$ ,14-epoxyamphoricarpolide			+
23	3,15-Di- <i>O</i> -acetyl-9 $\alpha$ -hydroxyamphoricarpolide		+	
24	3- <i>O</i> -Acetyl-9 $\beta$ -hydroxy-5- <i>O</i> -senecioylamphoricarpolide		+	
25	3- <i>O</i> -Acetyl-15- <i>O</i> -isovaleroylamphoricarpolide			+
26	3-Deoxy-11 $\alpha$ ,13-epoxyamphoricarpolide			+
27	3-Deoxy-15- <i>O</i> -acetyl-11 $\alpha$ ,13-epoxyamphoricarpolide			+
28	15- <i>O</i> -Acetyl-3-deoxy-11 $\beta$ ,13-dihydro-13-hydroxyamphoricarpolide			+
29	13-Chloro-3-deoxy-11 $\alpha$ -hydroxy-11,13-dihydroamphoricarpolide			+

ANN - *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*; AAA - *A. autariatus* subsp. *autariatus*; AAB - *A. autariatus* subsp. *bertisceus*; + = prisustvo.



Fenolna jedinjenja. U ekstraktima listova taksona roda *Amphoricarpos* ukupno je detektovano i identifikovano 30 fenolnih jedinjenja i to najviše iz grupe fenolnih kiselina i derivata kao i iz grupe flavona. Razlika se ogleda u detekciji jedinjenja u dva različita tipa uzorka. U uzorcima intaktnih listova ukupno je detektovano i identifikovano 16 fenolnih jedinjenja, dok je 30 jedinjenja pronađeno u uzorcima samlevenih listova. Ne postoji ni jedno detektovano jedinjenje da je pronađeno samo u uzorcima intaktnih listova. Kod taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* razlikuje se dominantno jedinjenje pronađeno u oba ekstraktima.

Sa taksonomskog aspekta bitno je naglasiti da profili fenolnih jedinjenja istraživanih taksona nisu identični. Ovde će biti poređeni i diskutovani fenolni profili svih taksona dobijenih iz istog tipa ekstrakta.

U fenolnom profilu intaktnih listova taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* nisu pronađeni apigenin i naringenin, dok su ova jedinjenja pronađena u ekstraktima ostalih taksona. Takođe, jedino je u fenolnom profilu intaktnih listova taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* pronađen izomer 1 trihidroski-dimetoksi-flavon. Samo u ekstraktima taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* pronađena su jedinjenja izomer 2 trihidroski-dimetoksi-flavon i izomer 3 trihidroski-dimetoksi-flavon.

U fenolnom profilu samlevenih listova svih istraživanih taksona dominantno jedinjenje je 5-*O*-kafeoilhinska kiselina, osim kod taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* kod koga je to hrizoeriol. U ekstraktu ovog taksona je takođe pronađena 5-*O*-kafeoilhinska kiselina ali ne kao dominantno jedinjenje. Takođe, u ekstraktima samlevenih listova *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* nisu pronađena jedinjenja: izomer 1 dikafeoilhinske kiseline, Izomer 2 dikafeoilhinske kiseline, Luteolin 6-*C*-pentozid-8-*C*-heksozid i Tetrahidroski-monometoksi-flavon *O*-rutinozid. Samo u ekstraktu taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* nije pronađen luteolin 7-*O*-rutinozid, dok su samo u ekstraktu ovog taksona pronađeni izomer 1 trihidroski-dimetoksi-flavona i izomer 2 trihidroski-dimetoksi-flavona. Apigenin i naringenin nisu pronađeni u ekstraktima i intaktnih i samlevenih listova taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. Samo u ekstraktima taksona *A. neumayerianus* subsp.



*neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* pronađen je izomer 3 trihidroski-dimetoksi-flavon. Ovi rezultati su takođe od taksonomskog značaja pri rešavanju kompleksne taksonomije roda *Amphoricarpos* na Balkanu.

U tribusu Cardueae posebno su značajni flavonoidi koji uključuju antocijanine, žute flavonoide i bezbojne flavonoide. Dominanti tipovi flavonoida u tribusu su flavoni i flavonoli. Flavanoni i flavanonoli su ograničeni na rodove *Carthamus* L., *Centaurea* i *Silybum* Vaill. Visoko metoksilovani flavonoli i flavoni su prisutni kod *Centaurea* i *Cirsium*. Vrste *Silybum marianum* (L.) Gaertn. i *S. eburneum* Coss. & Durieu su izuzeci jer sadrže flavonolignane, koji su do sada pronađeni jedino kod vrste roda *Hydnocarpus* Gaertner iz familije Achariaceae. Ova nova klasa jedinjenja sastoji se od flavonoida i lignana, sadrži jedinicu koniferil alkohola koji je vezan za flavanonolski deo; izolovana jedinjenja se razlikuju samo u načinu vezivanja ova dva dela. Mnogi flavonoidi, uključujući i one koji su polimetoksilovani, su u obliku glikozida. Obično su prisutni kao *O*-glikozidi, 3-*O*-glikozidi u slučaju flavonola i 7-*O*-glikozidi u slučaju flavanona gde su 4'-*O*-glikozidi retki. Flavoni C-glikozidi se javljaju sporadično, jedini predstavnici ove grupe glikozida su svertizin i izosvertizinin. Šećerna komponenta ovih glikozida je obično glukoza. Galaktoza je retko prisutna. Od disaharida je kao dominantna pronadjena rutinoza. Derivati glukuroninske i galakturoninske kiseline su ograničeni samo na *Centaurea* vrste. Samo je nekoliko triglikozida izolovano. Tip flavonoida kod Carduinae i Centaureinae je veoma sličan ako se uporede podaci vezani za rodove *Cirsium* i *Centaurea* koji su do sada najviše istraživani i koji sadrže najveći broj vrsta. Oba roda se karakterišu prisustvom mono-, di-, i tri-, metoksilovanim flavonoidima sa 5,6,7-hidroksilovanim obrascem na A prstenu kvercetagetina i skutelareina. Najdominantniji aglikoni su pektolarigenin, cirzimaritin, cirzilino i cirziol kod *Cirsium* i skutelarein, centaureidin, jaceidin, jaceosidin i hispidulin kod *Centaurea* (Wagner 1977).

Od ostalih fenolnih jedinjenja, cimetna kiselina i njeni derivati karakterišu podtribuse Carduinae i Centaureinae, dok su tanini odsutni ili se sporadično javljaju. Osim hlorogenske kiseline i njenih izomera, didepsidi kumarinskog tipa (*Cynara scolymus* L.) su jedini sa prostom strukturom. Kod vrsta rodova *Arctium*, *Carthamus* i *Centaurea* dimerski fenilpropanski derivati arkiin i hidroskiarkciin, lignani gvajalignanolidnog tipa su od





fiziološkog značaja u semenima i plodovima. Ovaj lignanski tip je ograničen samo za Carduinae i Centaureinae. Prisustvo dehidrodikoniferil alkohola i flavanolignana kod *Silybum* i koniferina kod vrsta roda *Centaurea* ukazuje na postojanje biosintetske povezanosti između lignana i flavonoida. Lignani imaju isti visoki obrazac metoksilacije kao i flavonoidi kod oba podtribusa (Wagner 1977).

Zemtsova i Molchanova (1979) su u ekstraktu vrste *X. annuum* sa Krima dokumentovali šest supstanci polifenolne prirode, od toga, u reakciji kisele hidrolize, kao produkti, detektovani su luteolin i kvercetin. Grecco i sar. (2011) su istraživali fenolne derivate vrste *Baccharis retusa* DC. i dokumentovali 11 fenolnih jedinjenja, od toga naringenin i apigenin koji su pronađeni i u našim ekstraktima. Dodatno su zaključili da koprissustvo jedinjenja taksifolina i aromadendrina, kao i sakuranetina se mogu smatrati hemijskim markerima za vrstu *B. retusa*.

Formisano i sar. (2012) su uradili detaljan literaturni pregled flavonoida i njihovih <sup>13</sup>C-NMR spektralnih podataka predstavnika podtribusa Centaureinae. Podtribus obuhvata 72 roda razvrstanih u sedam grupa, od kojih je, jedna od većih, grupa *Centaurea* sa 32 roda. Dotadašnja istraživanja u vezi prisustva flavonoida rađena su na svega 16 od 72 rodova iz podtribusa. Autori su opsežnim pregledom literature pronašli ukupno 272 različita flavonoida iz 148 vrsta koje pripadaju ovim 16 rodova, a od kojih je najintenzivnije istraživani rod *Centaurea* (112 taksona). Pronađena jedinjenja pripadaju grupama: flavona (44 jedinjenja), flavonola (37 jedinjenja), flavanona, flavanonskih glikozida i dihidroflavonola (19 jedinjenja), flavonskih glikozida (51 jedinjenje), flavonol glikozida (71 jedinjenje), C-glikozilflavonoida (28 jedinjenja) i 22 druga jedinjenja. Međutim, autori nisu izvodili hemotaksonomske zaključke.

Sajjadi i sar. (2017) su izolovali i identifikovali dva fenolna jedinjenja iz nadzemnog dela *Cousinia verbascifolia* Bunge: apigenin i kafenu kiselinu koje su i pronađene u našim ekstraktima. Salah i sar. (2019) su u etil acetatnom i vodenom ekstraktu vrste *Volutaria lippii* (L.) Cass. (Asteraceae-Cardueae), identifikovali deset fenolnih kiselina i osam flavonoida. U obe frakcije 3-O-kafoilhinska i 3,4-di-O-kafeoilhinska kiselina su predstavljale najzastupljenije komponente. 3-O-kafoilhinska kiselina je takođe pronađena u ekstraktima samlevenih listova taksona *Amphoricarpos*. Marengo i sar. (2019)



su analizirali intraspecijsku varijabilnost vrste *Ptilostemon casabonae* (L.) Greuter koristeći fitohemijske i molekularne markere. Među glavnim komponentama, između ostalog, pronađena su jedinjenja apigenin i derivati kafeoilhinske kiseline koje su i u saglasnosti sa našim rezultatima.

Neophodan je nastavak istraživanja sadržaja fenolnih jedinjenja u ekstraktima vrsta roda *Amphoricarpos* iz Turske i Gruzije kako bi se dobila celovita slika sastava fenola za ceo rod.



## 5.5. Molekularne analize

Kako podaci plastidnih markera nisu dali značajne informacije, diskusija je fokusirana na rezultatima jedarnih markera kao i kombinovanih, jedarnih i plastidnih markera.

Rezultati su pokazali nepotpunu diferencijaciju taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* slično kao i Caković i sar. (2015). Međutim, naši rezultati su pokazali da se bosansko-hercegovački takson, *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*, izdvaja u oba tipa analize u odnosu na druge taksone, što nije zaključeno u radu Caković i sar. (2015).

U dobijenom filogenetskom stablu uočene su veoma kratke grane kod roda *Amphoricarpos* u poređenju sa jednogodišnjim rodovima iz *Xeranthemum* grupe, kao i sa rodom *Shangwua*. Ovo ukazuje na verovatno ranu diverzifikaciju balkanske klade i sigurno zajedničko poreklo svih balkanskih taksona. Sve balkanske populacije čine monofiletsku grupu sestrinsku sa *A. exsul*, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjem Caković i sar. (2015). Na osnovu rezultata, moguće poreklo postanka roda *Amphoricarpos* je Kavkaz i Anatolija.

Caković i sar. (2015) su na osnovu ITS sekvenci pokazali da su odnosi među balkanskim populacijama u saglasnosti više sa geografijom nego taksonomijom: šest najzapadnih populacija formiraju kladu koja je sestrinska za sve ostale populacije, koje čine drugu kladu; unutar ove druge klade, najjužnije populacije iz Albanije i Grčke bile su razdvojene od svih ostalih populacija i formirale su podkladu sa niskom podrškom. Prema analizama datiranja balkanske populacije su se odvojile od anatolijskog taksona *A. exsul* pre oko 4.9. miliona godina što je i u saglasnosti sa radom Barres i sar. (2013), dok su se bosanske populacije odvojile od ostalih populacija pre oko 1.7 miliona godina, a najjužnije pre oko 1.2 miliona godina. U istoj studiji na osnovu plastidnih sekvenci takođe je zaključeno da sve balkanske populacije formiraju monofiletsku kladu sestrinsku sa *A. exsul*. Takođe, ustanovljeno je da 16 populacija poseduje isti centralni haplotip, od koga su se izdvojili haplotipovi tri južne populacije na osnovu jednog ili dva mutacijska koraka. Devet populacija je formiralo kladu sa niskom podrškom, zasnovanom na jednoj supstituciji; dve



grupe taksona *A. neumayerianus* iz Bijele gore razdvojene su na osnovu četiri mutacijska koraka i formiraju visoko podržanu podkladu.

U istoj studiji, testirani su AFLP markeri. Neighbor Joining (NJ) analiza je identifikovala nekoliko klastera sa visokom bootstrap podrškom, koji su takođe podržani i u NeighborNet analizi. Većina divergentnih klastera sa maksimalnom bootstrap podrškom obuhvatila je sve populacije *A. autariatus* subsp. *autariatus* iz zapadne Bosne i Hercegovine. Drugi klaster obuhvatio je najjužnije populacije *A. autariatus* subsp. *bertisceus* iz Albanije i Grčke, koje su se genetički razlikovale. Najveći klaster obuhvatio je populacije *A. autariatus* subsp. *autariatus* iz jugoistočne Bosne i Hercegovine i Crne Gore i jednu populaciju *A. autariatus* subsp. *bertisceus* iz Crne Gore. Odnosi između ostalih populacija nisu bili razrešeni. Bajesovo klasterovanje sa softverom BAPS je rezultovalo u dobijanju pet klastera. Glavna koordinatna analiza je pokazala dobru podudarnost sa dobijenih pet klastera koje je identifikovao BAPS, iako su postojale velike razlike između taksonomskog statusa u odnosu na rad Blečić i Mayer (1967).

Duboka genetička razdvojenost unutar balkanskih populacija roda *Amphoricarpos* sugerisana na osnovu ITS i AFLP markera (Caković i sar. 2015) datirana je na pre oko 1.7 miliona godina i geografski se poklapa sa distribucijskim jazom otprilike na području između reke Neretve i Sutjeske u Bosni i Hercegovini (Niketić i sar. 2014). Slični genetički prekidi vezani za dolinu reke Neretve uočeni su kod nekoliko biljnih i životinjskih taksona (Kutnjak i sar. 2014), dok se genetička razdvojenost u grupi *Heliosperma pusillum* (Waldst. & Kit.) Rchb. koja datira iz pliocena poklapa sa rekama Sutjeska i Drina u najistočnijoj Bosni i Hercegovini (Frajman i Oxelman 2007). Genetička divergencija najjužnijih populacija taksona *Amphoricarpos* iz Albanije i severne Grčke (Caković i sar. 2015) je verovatno uzrokovana geografskom izolacijom sprečavajući protok gena (Surina i sar. 2014).

Balkansko poluostrvo je centar evropske biljne raznovrsnosti kao i važan centar endemizma (Hayek 1924- 1933; Turrill 1929; Markgraf 1932; Horvat i sar. 1974; Polunin 1987; Davis i sar. 1994; Kryštufek i Reed 2004; Stevanović i sar. 2007). Uzroci ove raznolikosti mogu biti u geografskom položaju na prelazu različitih florističkih provincija kao i zbog topografske, klimatske i geološke kompleksnosti regiona (Polunin 1987;



Griffiths i sar. 2004; Hewitt 2011; Nieto Feliner 2014). Osim toga, planine balkanskog poluostrva bile su mnogo manje pogođene pleistocenskim glacijacijama, za razliku od, na primer, Alpa i Pireneja, omogućavajući preživljavanje tercijarne flore i faune (npr. Comes i Kadereit 1998; Hewitt 2000; Petit i sar. 2003; Griffiths i sar. 2004; Hewitt 2011) i podsticanje divergencije u višestrukim pleistocenskim mikrorefugijumima (hipoteza “refugijum unutar refugijuma” Gómez i Lunt 2007; koji su za Balkan potvrdili npr. Surina i sar. 2011, 2014; Kutnjak i sar. 2014).

Nekoliko filogenetskih studija praćene analizama datiranja pokazale su da su mnogi balkanski endemiti nastali u tercijaru (npr. *Campanula comosiformis* (Hayek & Janch.) Frajman & Schneew.; Frajman i Schneeweiss 2009; *Heliosperma macranthum* Pančić, Frajman i sar. 2009a; *Viscaria asterias* (Griseb.) Frajman i verovatno *Atocion lerchenfeldianum* (Baumg.) M.Popp; Frajman i sar. 2009b); izuzeci su npr. vrste iz *Heliosperma pusillum* grupe (Frajman i sar. 2009a) i *Wulfenia* Jacq. (Surina i sar. 2014) koje su verovatno postale raznovrsne u pleistocenu.

Jedan od ranih divergentnih rodova familije Asteraceae je *Amphoricarpos*, koji je nastao u kasnom oligocenu otprilike pre oko 25 miliona godina (Barres i sar. 2013). Rod ima disjunktan areal, rasprostranjen je na Balkanskom poluostrvu, Anatoliji (Turska) i Kavkazu (Gruzija). *A. exsul* i *A. praedictus* su endemiti jugozapadne Anatolije (Schwarz 1970; Ayasligil 1984), dok je *A. elegans* distribuiran na Kavkazu (Gruzija). Ove tri vrste su ponekad tretirane kao poseban rod *Alboviodoxa* (Grossheim 1949). Molekularno filogenetske studije su pokazale da je *A. exsul* sestrinski sa balkanskim taksonom *A. neumayerianus*. Smatra se da su se ove dve vrste razdvojile u ranom Pliocenu, pre oko 5 miliona godina (Barres i sar. 2013). Nekoliko vrsta je zajedničko za južni Balkan i Malu Aziju, od kojih su neke kao što su *Anemone blanda* Schott & Kotschy, *Atocion compactum* (Fisch.) Tzvelev, *Euphorbia myrsinites* L., *Juniperus excelsa* M.Bieb, *J. foetidissima* Willd. and *Ranunculus marginatus* d'Urv., proširili svoje rasprostranjenje do zapadnog Balkana sa jedne strane i Kavkaza sa druge (Turrill 1929; Stevanović 1996), i pokazuju isti obrazac distribucije kao i taksoni roda *Amphoricarpos*.



## 5.6. Biološka aktivnost

Ekstrakti taksona roda *Amphoricarpos* su pokazali dobar antioksidativni potencijal i snažan antimikrobni efekat. Rast ispitivanih mikroorganizama je bio različit u odnosu na različite testirane ekstrakte, što ukazuje da različite komponente ekstrakata mogu imati različite načine delovanja ili da je metabolizam nekih mikroorganizama bio u stanju da bolje prevaziđe efekat testiranih jedinjenja ili da se prilagodi. Ovim se može objasniti niža antifungalna aktivnost u odnosu na antibakterijsku aktivnosti ekstrakta 2, 4, 7, 9. U ovom istraživanju su korišćeni različiti ekstrakti zbog različitog sastava potencijalno aktivnih jedinjenja koja imaju različitu biološku aktivnost, a koja bi mogla da daju smernice za izbor najaktivnijih ekstrakata i čistih jedinjenja u budućim istraživanjima.

Prethodne studije su pokazale prisustvo različitih jedinjenja (seskviterpenske laktone) u ekstraktima iz različitih taksona roda *Amphoricarpos* (Djordjević i sar. 2004; 2006; Cvetković i sar. 2014). Ovo istraživanje, kao i naši rezultati ukazuju da je različita antimikrobna aktivnost istraživanih ekstrakata taksona ovog roda uzrokovana različitim sastavom specijalizovanih jedinjenja koja igraju važnu ulogu u biološkoj aktivnosti. Ovde se pre svega misli na seskviterpenske laktone, i to pre svega u etarskim ekstraktima, jer je u ovom istraživanju pokazano da je fenolni profil među istraživanim taksonima vrlo sličan, te se različita aktivnost može pripisati laktone jer su laktonski profili ovih taksona različiti.

Najveći ukupni sadržaj flavonoida i fenola, kao i najbolje antioksidativno dejstvo (DPPH test) imao je metanolni ekstrakt *A. autariatus* subsp. *autariatus* kao i metanolni ekstrakt *A. elegans*. Antioksidativni potencijal metanolnog ekstrakta *A. elegans* (DPPH test), bio je preko deset puta veći od antioksidativnog potencijala etil acetatnog ekstrakta. Ovakva aktivnost se ne može pripisati samo fenolnim jedinjenjima, jer je ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja bio samo četiri puta veći u metanolnom ekstraktu. Ovo dejstvo može povezati i sa dokazanim prisustvom seskviterpenskog laktona.

U mnogim radovima koji se bave antioksidativnom aktivnošću biljnih ekstrakata potvrđena je značajna linearna korelacija između antioksidativne aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola. Postoji veliki broj radova koji se bave antioksidativnom aktivnošću biljnih ekstrakata što potvrđuje značajnu povezanost između antioksidativne aktivnosti i



ukupnog fenolnog sadržaja (Katalinić i sar. 2006). Bolji antioksidativni potencijal u našem istraživanju *A. autariatus* subsp. *autariatus* u poređenju sa druga dva taksona može ukazivati da ovaj takson produkuje različita fenolna jedinjenja ili da ima iste komponente koje su prisutne u većoj količini a koje su uključene u antioksidativno delovanje. Ipak, naši rezultati nisu pokazali značajnu razliku u sastavu fenolnih jedinjenja u ekstraktima istraživanih taksona roda *Amphoricarpos*. Takođe, nije utvrđeno prisustvo nekog fenolnog jedinjenja samo u ekstraktima taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus*, kao ni da se neka od jedinjenja nalaze u većoj količini kod njega u odnosu na druge taksona. Ipak, samo jedna metoda nije dovoljna za izvođenje zaključka o sastavu fenolnih jedinjenja. Bez obzira na to, odgovor za različitu aktivnost se potencijalno može pronaći u sadržaju seskviterpenskih laktona, pre svega u etarskim ekstraktima.

Seskviterpenski laktoni gvajanolidnog tipa proizvode efekte povezane sa sprečavanjem i regulisanjem oksidativnih ćelijskih oštećenja i upala (Da Costa i sar. 2005). Iako je molekularni mehanizam antioksidativne zaštite seskviterpenskih laktona nepoznat, izgleda da je njihov antioksidativni efekat povezan sa biosintezom endogenih antioksidanasa (npr. prostaglandina) (Repetto i Boveris 2010). Prethodne studije su pokazale da su ciklični estri hidrosikarboksilnih kiselina koji sadrže seskviterpenske laktone odgovorni za njihovu biološku aktivnost (Raola i Chakraborty 2017). Takođe je pokazano da biološka aktivnost koju pokazuje većina seskviterpenskih laktona nastaje usled prisustva  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -laktona i  $\alpha,\beta$ -nezasićenog ciklopentenonskog prstena (Chaturvedi 2011). Iz ovih razloga, naši rezultati vezani za antioksidativni potencijal ekstrakta predstavnika roda *Amphoricarpos* važni su za buduća istraživanja biološke aktivnosti, terapijskog delovanja i novih biljnih izvora lekovitih supstanci.

Pregledom literature pronađeno je malo radova o biološkoj aktivnosti ekstrakata balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*. Pokazana je citotoksična aktivnost taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (Atrrog i sar. 2008) kao i antifungalna aktivnost komponenti sa površine listova taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* (Jadranin i sar. 2013).

Vrste familije Asteraceae produkuju i akumuliraju širok spektar specijalizovanih metabolita koji imaju važnu biološku aktivnost (Taleb-Contini i sar. 2007; Fritz i Saukel



2011). Mnoge vrste su poznate kao lekovite biljke koje pokazuju antioksidativno i antimikrobno dejstvo, zbog prisustva fenola (npr. flavonoida) i drugih bioaktivnih metabolita, kao što su seskviterpenski laktoni (Baba Aissa 1999; Barrero i sar. 1997; Font Quer 1995; Farrag i sar. 1993; Djordjević i sar. 2004; Djordjević i sar. 2006; Vallejo i sar. 2008; Atrrog i sar. 2008; Vallejo i sar. 2009; Jadranin i sar. 2013).

Mnogi izolovani specijalizovani metaboliti koji su pronađeni kod predstavnika tribusa Cardueae imaju farmakološko dejstvo. Iz klase poliacetilena karlina-oksida ima antibiotsku aktivnost (Schmidt-Thomé 1950). Iz klase terpenoida pokazano je da SLs knicin ima antimikrobnu (Reisch i sar. 1967) i antibiotsku aktivnost (Vanhaelen-Fastré 1972), kostunolid ima citotoksičnu aktivnost (Dorskotch i El-Feraly 1969), dokatraktilozid ima toksično dejstvo (antagonist oksidativne fosforilacije) (Vignais i sar. 1962). Od fenolnih jedinjenja za cinarin je pokazano da podstiče lučenje žuči (Hammerl i Pichler 1959), a silimarini imaju antihepatoksičnu aktivnost (Hahn i sar. 1968).

Kako su rezultati istraživanja pokazali vrlo visok antimikrobni potencijal ekstrakata, taksoni roda *Amphoricarpos* bi se mogli smatrati odličnim izvorom potencijalnih antimikrobnih supstanci. U okviru *Xeranthemum* grupe istraživanja biološke aktivnosti su vezana za pojedine vrste iz rodova *Amphoricarpos* i *Xeranthemum*. Vrste ostalih rodova su neistražene sa aspekta biološke aktivnosti.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na dalje analize vezane za antimikrobna svojstva i moguće sinergističke efekte ekstrakata kao i buduća istraživanja drugih taksona roda *Amphoricarpos* i *Xeranthemum* grupe, kao i iz tribusa Cardueae i njihove potencijalne primene u farmaciji, medicini, poljoprivredi i prehrambenoj industriji.





## 5.7. Opšta diskusija

U cilju revizije i predlaganja nove klasifikacije unutar tribusa Cardueae, Herrando-Moraira i sar. (2019) su primenili Hyb-Seq pristup na set od 76 vrsta iz tribusa Cardueae koji su obuhvatili sve definisane podtribuse i neformalne grupe. Filogenetske analize nuklearnih podataka u potpunosti su razrešile gotovo sve čvorove sa vrlo visokom podrškom. Nuklearne i plastidne topologije filogenetskih stabala unutar Cardueae su uglavnom podudarne sa vrlo ograničenim brojem nepodudarnih čvorova. Na osnovu dobijenih dobro rešenih filogenija, autori su predložili novu taksonomsku šemu koja se sastoji od 12 monofiletskih i morfološki konzistentnih podtribusa: Carlininae, Cardopatiinae, Echinopsinae, Dipteroquinae, Xerantheminae, Berardiinae, Staehelininae, Onopordinae, Carduinae, Arctiinae (novo), Saussureinae (novo) i Centaureinae. Sedam novih podtribusa je nastalo na osnovu podele nekadašnjeg šireg i parafilitskog podtribusa Carduinae. Novi monofiletski podtribusi zasnovani na neformalnim morfološkim grupama su: Dipteroquinae, Xerantheminae, Berardiinae, Staehelininae, Onopordinae, Arctiinae i Saussureinae. Većinu njih su i ranije istakli Susanna i Garcia-Jacas (2009).

U okviru morfoloških neformalnih grupa unutar Carduinae (Susanna i Garcia-Jacas (2009), *Xeranthemum* grupa jedna je od najbolje podržanih u odnosu na sve skupove podataka i analize. Vrste u okviru ove grupe su još od prvih filogenetskih studija bile prepoznate kao monofiletska i statistički veoma podržana grupa, i na osnovu jedarnih i na osnovu plastidnih markera (Herrando-Moraira i sar. 2019).

Procena postanka tribusa Cardueae naročito se dobro poklapa sa „Gladijacijom Oi-1“ koja se dogodila na prelazu između eocena i oligocena, kada je formiran antarktički kontinentalni ledeni pokrivač (Zachos i sar. 2001). Podtribusi su nastali u dva različita glavna vremenska perioda. Podtribusi Carlininae, Cardopatiinae, Dipteroquinae, Xerantheminae i Berardiinae verovatno potiču iz vremena oligocena, dok podtribusi Echinopsinae, Staehelininae, Onopordinae, Carduinae, Arctiinae, Saussureinae i Centaureinae potiču iz srednjeg kasnog miocena. Procenjeno je da je podtribus Xerantheminae nastao pre oko 24.56 miliona godina (Herrando-Moraira i sar. 2019).



Naši rezultati idu u prilog podizanja taksonomskog ranga *Xeranthemum* grupe, pre svega gledano u odnosu na mikromorfološke karaktere (vermiformne trihome na stablu i abaksijalnoj površini lista, adaksijalna insercija cipsele, asimetričan karpopodijum i direktno vezivanje papusa za perikarp). Ovde posebno treba istaći i značaj kristala vedelita pronađenih u ovom istraživanju samo kod jednogodišnjih predstavnika ovog podtribusa, što potencijalno može biti razlog dalje taksonomske diferencijacije u okviru *Xerantheminae*.

Takođe naši rezultati, pre svega mikromorfološki (kutikularna zadebljanja adaksijalne površine lista, vosak na involukralnim braktejama kao i bele prilegle trihome na involukralnim braktejama i kristali vedelita na površini involukralnih brakteja), anatomski (sekundarna građa korena i dorziventralna građa lista jednogodišnjih vrsta roda *Xeranthemum*) i molekularni markeri (ITS i kombinovani ITS i plastidni markeri), podržavaju filogenetsku hipotezu da su višegodišnji preci iz konzerviranih staništa (planine) adaptirani na sušna i ruderalna staništa. Takođe, u prilog ove hipoteze idu i ranija istraživanja (Garnatje i sar. 2004b) u koja dovode u vezu *Xeranthemum* sa: *Amphoricarpos*, *Chardinia* i *Siebera*. Rod *Amphoricarpos* se na bazi molekularne filogenije smatra bazalnim rodnom za *Chardinia*, dok se *Chardinia* smatra bazalnim rodnom za ostale rodove grupe (Garnatje i sar. 2004a).

Prema Barres i sar. (2013), divergencija između *Xeranthemum* i *Amphoricarpos* se desila u oligocenu (pre oko 27 miliona godina). Molekularne filogenije (Barres i sar. 2013; Susanna i sar. 2006) upućuju na blizak odnos između rodova *Amphoricarpos* i *Chardinia*, koje su sestrinske u odnosu na ostale rodove. Ovo je i u saglasnosti sa našim mikromorfološkim karakterima, jer prema našim rezultatima *Chardinia* deli neke osobine sa rodnom *Amphoricarpos* (dimorfne cipsele) i neke osobine samo sa rodnom *Xeranthemum* (šiljati i goli involukralni listići). Štaviše, blizak odnos između rodova *Xeranthemum* i *Chardinia* se ogleda u istoj ornamentaciji polenovog zrna (bradavičavi i prolatno-sferoidni) (Garnatje i Martín, 2007).

Značajan deo ovog istraživanja je posvećen rešavanju kompleksne infrageneričke klasifikacije endemičnog i reliktnog roda *Amphoricarpos* na balkanskom poluostrvu odnosno pitanju da li postoji i kakva je podudarnost u morfološkim, mikromorfološkim,



anatomskim, fitohemijskim i molekularnim karakteristikama istraživanih taksona balkanskog kompleksa ovog roda.

Taksonomski status vrsta i taksona roda *Amphoricarpos* na balkanskom poluostrvu pretrpeo je velike promene od samih početaka istraživanja ovog roda. Istraživanja su pokazala značajna variranja u habitusu, obliku listova i karakteristikama cveta između taksona.

U našim morfološkim (morfometrijskim) analizama, analizirani karakteri vegetativnih organa, kao i kombinovani karakteri vegetativnih organa i glavice podržali su podjelu balkanskog dela roda *Amphoricarpos* na četiri taksona: *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. Ovi razdvojeni taksoni su i geografski razdvojeni: *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (Orjena i Lovćen), *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (Bosna), *A. autariatus* subsp. *autariatus* (zapadna i centralna Crna Gora) i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (jugoistočna Crna Gora). Takođe, klaster analizom je pokazana diferencijacija taksona na dve grupe: prvu grupu čine međusobno morfološki slični taksoni *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* dok drugoj grupi pripadaju *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (često smatran sinonimom *A. autariatus* subsp. *autariatus* (Schwarz 1970; Webb 1976; Strid i Tan 1991)). Ovo je takođe i u saglasnosti sa geografskom distribucijom istraživanih taksona. Dakle ovde posebno treba obratiti pažnju na izdvajanje i bosansko-hercegovačke podvrste *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*.

Na osnovu naših mikromorfoloških istraživanja, rezultati koji mogu imati taksonomski značaj odnose se na površinu i oblik i dužinu šiljka (mukro) srednjih involukralnih brakteja. Na osnovu dužine i oblika šiljka (mukro) može se uočiti razlika između ova četiri taksona. Šiljak (mukro) involukralne brakteje je kratak i zaobljen kod *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* i tupo zaobljen kod *A. autariatus* subsp. *autariatus* i kod oba taksona jedva prelazi ivicu brakteje što je i u saglasnosti sa radom Blečić i Mayer (1967), dok je kod *A. autariatus* subsp. *bertisceus* duguljasto zaobljen, a kod *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* šiljat i kod oba taksona prelazi ivicu brakteje što je delimično u saglasnosti sa radom Blečić i Mayer (1967). *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* izdvaja se od ostalih taksona prema sledećim karakteristikama: prisustvo trihoma na



marginama i na vrhu brakteje, odsustvo strijatne površine brakteje, mukro involukralne brakteje kratak i zaobljen.

Rezultati anatomskih analiza pokazali su da svi istraživani taksoni roda *Amphoricarpos* pokazuju slične anatomske karakteristike. Anatomske karaktere u ovom slučaju nemaju taksonomski značaj. Ipak, uniformnost anatomske karaktere ukazuje na veoma bliske odnose između istraživanih taksona u odnosu na konzervativni genom ovog roda.

Na osnovu fitohemijskih istraživanja (masne kiseline iz cipsela i fenolna jedinjenja) vidljive su razlike u profilima, kako masnih kiselina tako i fenolnih jedinjenja. U obodnim cipselama vrste *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* nije detektovana jedna masna kiselina (neidentifikovana). Takođe, druga (neidentifikovana) masna kiselina, kao i margarinska masna kiselina su pronađene samo u obodnim cipselama taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *autariatus*. S druge strane, od svih istraživanih taksona, jedino u centralnim cipselama taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* nije pronađena linolenska masna kiselina. Taksoni *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* su sličniji, jer u njihovim cipselama nisu detektovane jedna masna kiselina (neidentifikovana) kao ni margarinska.

Takson *A. autariatus* subsp. *bertisceus* se izdvaja od ostalih taksona jer u fenolnom profilu intaktnih listova ovog taksona nisu pronađeni apigenin i naringenin. Takođe, jedino je u fenolnom profilu intaktnih listova taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* pronađen izomer 1 trihidroski-dimetoksi-flavon. Zajedničko za taksone *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* jeste da je samo u ekstraktima intaktnih listova ovih taksona pronađena jedinjenja izomer 2 trihidroski-dimetoksi-flavon i izomer 3 trihidroski-dimetoksi-flavon. Kada se posmatraju analize ekstrakata samlevenih listova, *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* se izdvaja po tome što je u njegovom profilu dominantno jedinjenje hrizoeriol, za razliku od ostalih taksona. Takođe, ovaj takson se izdvaja i po tome što nije pronađen luteolin 7-O-rutinozid, dok su samo kod njega pronađeni izomer 1 trihidroski-dimetoksi-flavona i izomer 2 trihidroski-dimetoksi-flavona. Apigenin i naringenin nisu pronađeni u ekstraktu taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus*, kao što je i bio slučaj u ekstraktu intaktnih listova. Zajedničko za taksone *A. neumayerianus*



subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* jeste da u ekstraktima nisu pronađena jedinjenja: izomer 1 dikafeoilhinske kiseline, izomer 2 dikafeoilhinske kiseline, luteolin 6-C-pentozid-8-C-heksozid i tetrahidroski-monometoksi-flavon O-rutinozid, dok je samo u njihovim ekstraktima pronađen izomer 3 trihidroski-dimetoksi-flavon. *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* se izdvaja po najvećoj zabeleženoj količini hrizoeriola, dominantne komponente u ekstraktu intaktnih listova, Dakle, iako postoje minorne razlike u profilima i masnih kiselina i fenolnih jedinjenja, one su vrlo značajne imajući u vidu vrlo srodne odnose između taksona.

Rezultati molekularne analize jedarnih markera kao i kombinovanih markera (jedarni + plastidni) pokazali su jasno izdvajanje taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* u oba tipa analize, u odnosu na ostale taksone roda *Amphoricarpos* (*A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*).

Poređenjem svih dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće: morfološka analiza (morfometrija) jasno odvaja četiri taksona (*A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*) unutar balkanskog kompleksa koji se poklapaju sa njihovim geografskim rasprostranjenjem; mikromorfološka analiza pokazuje razlike između taksona, ali pre svega izdvaja bosansko-hercegovački takson *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*; fitohemijska analiza pokazuje vidljive razlike u profilu masnih kiselina i fenola, ali ne izdvaja u potpunosti ni jedan takson. Molekularne analize podržavaju separaciju dva taksona: bosansko-hercegovački *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* i crnogorski takson (predstavljen svim istraživanim populacijama ostalih taksona: *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*). Svi navedeni karakteri imaju taksonomski značaj i mogu biti od koristi pri rešavanju kompleksne taksonomije ovog roda *Amphoricarpos* na Balkanu.

Dakle, rezultati ovog istraživanja pokazali su da diferencijacija unutar balkanskog kompleksa roda *Amphoricarpos* postoji. Rezultati upućuju na dve hipoteze. Prva hipoteza zasnovana na morfološkim karakterima govori o postojanju četiri morfološki definisana



taksona. Druga hipoteza, zasnovana na molekularnim karakteristikama govori o postojanju dva taksona.

Prva hipoteza, odnosno postojanje četiri taksona, govori u prilog tome da se radi, evolutivno gledano, o vrlo nedavno nastalim vikarijantnim vrstama koje se ne mogu okarakterisati molekularnim markerima koji su korišćeni u ovom istraživanju. U prilog definisanju četiri taksona idu i uočene razlike u mikromorfologiji (mukro involukralne brakteje) i razlike u hemijskim profilima, iako urađene fitohemijske analize nisu jasno razdvojile istraživane taksone. Ipak, treba istaći da su uočene fitohemijske razlike značajne kada se ima u vidu da se radi o reliktnim vrstama koje imaju konzervirani genom. Raspon njihove genetičke varijabilnosti je uzak, suprotno od vrsta koje su u trenutnoj specijaciji. Prema tome, ove razlike u mikromorfološkim i fitohemijskim karakteristikama između četiri vrlo srodna tercijarna taksona mogu biti dovoljne za njihovu diferencijaciju. Za razliku od našeg istraživanja postojanje odvojenih vrsta kod tercijalnog i reliktnog roda *Wulfenia* (Surina i sar. 2014), nije pokazano ni molekularnom ali ni morfološkom analizom. U prilog ovoj našoj hipotezi ide i metabolomička studija (Cvetković i sar. 2014) crnogorskih vrsta roda *Amphoricarpos* koja je pokazala razliku u količini seskviterpenskih laktona između ovih vrsta.

Takođe, rezultati klaster analize na osnovu morfoloških karaktera pokazuju sličnost između *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. Njihova sličnost se ogleda i u mikromorfološkim karakteristikama. Naime, kod oba taksona, mukro involukralne brakteje je duži i prelazi gornju ivicu. Sličnost se ogleda i u analizi fenolnih jedinjenja. U ekstraktima intaktnih listova oba taksona pronađena su ista jedinjenja: izomer 2 trihidroski-dimetoksi-flavon i izomer 3 trihidroski-dimetoksi-flavon. Takođe, u ekstraktima samlevenih listova kod oba taksona nisu pronađena jedinjenja: izomer 1 dikafeoilhinske kiseline, izomer 2 dikafeoilhinske kiseline, luteolin 6-C-pentozid-8-C-heksozid i tetrahidroski-monometoksi-flavon O-rutinozid, dok je utvrđeno prisustvo izomera 3 trihidroski-dimetoksi-flavon-a.

S druge strane, sličnost *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* takođe postoji u mikromorfologiji (izgled) šiljka (mukro) involukralne brakteje,



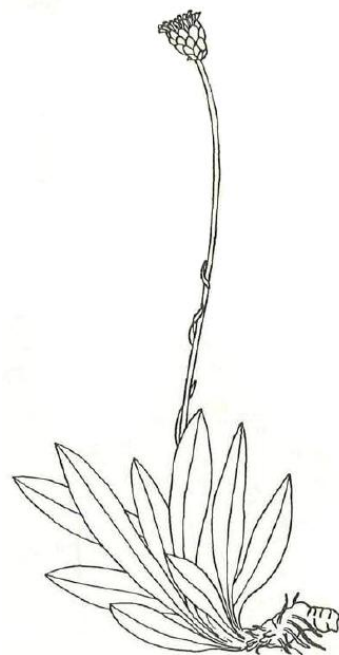
koji je kod oba taksona kratak i jedva prelazi gornju ivicu, pored morfoloških sličnosti koje su utvrđene klaster analizom.

Kod *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *autariatus* profili masnih kiselina su pokazali neznatnu sličnost.

Prema drugoj hipotezi koja je podržana molekularnim karakteristikama, na molekularnom nivou se jasno odvajaju crnogorski taksoni sa jedne strane i bosansko-hercegovački takson (*A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*), sa druge strane, koji su i geografski odvojeni. Takođe, mikromorfološka istraživanja su pokazala da crnogorski taksoni imaju naborano-strijatnu površinu involukralne brakteje, dok je ona kod bosansko-hercegovačkog taksona mrežasto-naborana. Uočava se i razlika u indumentumu involukralne brakteje. Involukralna brakteja bosansko-hercegovačkog taksona poseduje trihome na ivici i vrhu, dok je ona kod crnogorskih taksona gola. U pogledu fenolnih jedinjenja ovaj bosansko-hercegovački takson se izdvaja i po najvećoj zabeleženoj količini hrizoeriola, dominantne komponente u ekstraktu intaktnih listova svih istraživanih taksona. Ovu hipotezu podržavaju i delom rezultati Caković i sar. (2015), koji se odnose na molekularne analize (AFLP i ITS) prema kojima su se izdvojile bosansko-hercegovačke populacije koje odgovaraju *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*.

Dodatne analize koje bi konačno rasvetlile i definisale taksonomske odnose unutar balkanskog kompleksa roda *Amphoricarpos* mogle bi biti detaljne fitohemijske analize, pre svega, seskviterpenskih laktona bosansko-hercegovačkog taksona, kao i dodatne molekularne analize zasnovane na novim molekularnim markerima.

Ilustracija *Amphoricarpos autariatus* Blečić et Mayer: Habitus, Blečić i Mayer (1967). Die europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos* VISIANI. Phytion, 12, 150-158



## 6 ZAKLJUČCI





## 6. ZAKLJUČCI

1. U ovom istraživanju dobijeni su prvi podaci o: mikromorfologiji stabla, lista i involukralnih brakteja predstavnika *Xeranthemum* grupe; anatomiji balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* i vrsta roda *Xeranthemum* iz Srbije; sastavu masnih kiselina cipsela vrste *X. cylindraceum*; sastavu masnih kiselina cipsela i fenolnih jedinjenja iz listova balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*; dominantnom seskviterpenskom laktanu vrste *A. elegans*; antimikrobnoj i antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata crnogorskih taksona roda *Amphoricarpos*.
2. Morfometrijska analiza balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* je obuhvatila 28 karaktera, uključujući kvantitativne (20) i kvalitativne (8). Kanonijskom diskriminantnom analizom (CDA) svih karaktera pokazano je dobro razdvajanje istraživanih taksona. Karakteri koji najviše doprinose diferencijaciji su: broj grana stabljike, oblik listova rozete, dužina lista rozete i širina lista rozete. Kanonijskom diskriminantnom analizom (CDA) karaktera habitusa i glavice balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* pokazala je najbolje razdvajanje ovih taksona. Karakteri koji najviše doprinose diferencijaciji su: broj listića na stabljici, oblik listova rozete, dužina lista rozete, širina lista rozete i pokrivenost naličja lista rozete trihomama. Ovi razdvojeni taksoni su i geografski razdvojeni: *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* (Orjen i Lovćen), *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* (Bosna i Hercegovina), *A. autariatus* subsp. *autariatus* (zapadna i centralna Crna Gora) i *A. autariatus* subsp. *bertisceus* (jugoistočna Crna Gora).
3. Klaster analize za obe CDA analize pokazale su dve jasno izdvojene klade. Prvu kladu čine dve podklade morfološki sličnih taksona: *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*, a drugu kladu čine dve podklade takođe morfološki sličnih taksona: *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*. Kanonijska diskriminantna analiza (CDA) kojom su analizirani karakteri glavice i involukruma kao i CDA analiza kojom su



analizirani karakteri cipsele balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* nisu pokazale razdvajanje datih taksona.

4. Mikromorfološka analiza je pokazala da istraživani taksoni *Xeranthemum* grupe poseduju trihome na stablu, kao i vunasti indumentum na obe strane lista, ali i da su trihome sa abaksijalne strane mnogo gušće raspoređene. Izuzetak je goli indumentum adaksijalne strane lista vrste *Shangwua denticulata*. Kapitratne trihome su pronađene na listovima svih istraživanih taksona, ali su one mnogo brojnije na abaksijalnoj strani lista vrste *Sh. denticulata*, kao i na površini stabla vrste *Sh. masarica*.
5. Spoljašnji periklinalni zidovi adaksijalne strane lista vrsta *Xeranthemum inapertum*, *X. annuum*, *X. cylindraceum* i posebno *Siebera pungens* imaju naborana zadebljanja kutikule, dok su kod svih istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* kao i kod *Shangwua denticulata*, oni glatki. Kod svih istraživanih vrsta *Xeranthemum* grupe epidermske ćelije adaksijalne strane lista su poligonalnog oblika, osim kod *Chardinia orientalis* i *X. inapertum* gde su one veoma nepravilne odnosno nepravilno poligonalne. Antiklinalni zidovi epidermskih ćelija na adaksijalnoj strani lista su izvijugani kod *Ch. orientalis*, *X. inapertum* i *S. pungens*, blago izvijugani do ravni kod *A. exsul*, *Sh. denticulata*, blago izvijugani kod *A. elegans*, *X. annuum* i *X. cylindraceum* i ravni kod balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*. Ova osobina povezuje balkanske taksone roda *Amphoricarpos*, i predstavljaju dodatne karaktere za razgraničenje vrsta roda *Xeranthemum*.
6. Involukralne brakteje balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*, *Chardinia orientalis*, *Xeranthemum inapertum*, *X. annuum* su gole; kod *Amphoricarpos exsul*, *A. elegans*, *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* i *Shangwua masarica* su skoro gole, poseduju trihome na marginama i na vrhu brakteje; kod *X. cylindraceum* i *Siebera pungens* involukralne brakteje poseduju vermiformne, prilegle, beličaste trihome, u centralnom delu. Jedino su kod *X. cylindraceum* pored ovoga, uočene i kapitratne



- žlezdane trihome. Prisustvo kapitatnih žlezdanih trihoma je dodatni karakter za razgraničenje vrsta roda *Xeranthemum*.
7. Involukralna brakteja *Shangwua masarica* ima nepravilno mrežastu površinu, kod taksona *Amphoricarpos exsul*, *A. elegans* i *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* ona je mrežasto-naborana, dok kod taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus*, *A. autariatus* subsp. *bertisceus* i *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* ima naborano-strijatnu površinu. Sve vrste jednogodišnjih rodova, vrste roda *Xeranthemum*, *Chardinia orientalis* i *Siebera pungens* imaju mrežastu površinu involukralnih brakteja.
  8. Šiljak (mukro) involukralne brakteje se pokazao kao dobar karakter za razgraničenje vrsta roda *Xeranthemum*. Vrste *X. inapertum* i *X. annuum* imaju veoma ušiljen mukro sa dugačkim trnom, dok vrsta *X. cylindraceum* ima kratak i zaobljen mukro. Takođe, mukro je kratak i zaobljen kod *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* i tupo zaobljen kod *A. autariatus* subsp. *autariatus* i kod oba taksona jedva prelazi ivicu brakteje. Kod *A. autariatus* subsp. *bertisceus* mukro je duguljasto zaobljen i kod *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* šiljat. Kod oba taksona, mukro prelazi ivicu brakteje. Mukro, njegov oblik i veličina su karakteri koji imaju taksonomski značaj i mogu biti korisni pri razgraničenju taksona unutar balkanskog kompleksa roda *Amphoricarpos*.
  9. Veoma uočljive pločice voska nepravilnih oblika i različitih veličina pronađene su samo na epidermisu involukralne brakteje vrste *X. inapertum*. Površine involukralnih brakteja kod *X. annuum* i *X. cylindraceum* ne poseduju pločice voska, iako je vosak prisutan. Prisustvo pločica voska može biti dodatni karakter za razgraničenje vrsta roda *Xeranthemum*.
  10. Kristali vedelita uočeni su na površini involukralnih brakteja jednogodišnjih vrsta *Chardinia orientalis*, *Siebera pungens*, *Xeranthemum inapertum*, *X. annuum* i *X.*



*cylindraceum*, dok kod višegodišnjih predstavnika *Xeranthemum* grupe (vrste roda *Amphoricarpos* i *Shangwua masarica*) nisu detektovani. Kristali su identifikovani kao vedelit ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

11. Vrhovi grana stubića tučka, istraživanih predstavnika iz *Xeranthemum* grupe, su vrlo kratki, povezani, pravi i tupi kod turske vrste *A. exsul*, dok su kod crnogorskih taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus* i *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* oni kratki, šiljati, razilazeći i povijeni prema spolja.
12. Cipsele svih istraživanih vrsta, osim *Shangwua masarica*, su svilaste. Površina cipsela vrsta *Sh. masarica* i *Amphoricarpos exsul* je nepravilno talasasto mrežasta, kod vrste *A. elegans* je naborano-mrežasta, dok je kod *Xeranthemum inapertum*, *X. annum*, *X. cylindraceum* i *Siebera pungens* ona mrežasta. Vrsta *Chardinia orientalis* se posebno izdvaja po izrazito papilozno-strijatnoj površini cipsela. Sve istraživane vrste *Xeranthemum* grupe imaju adaksijalnu inserciju cipsela. Takođe, asimetrični karpopodijum je osobina koja povezuje sve istraživane taksona. Papus sačinjen od čekinja je prisutan kod taksona roda *Amphoricarpos* i *Shangwua masarica*, dok je papus izgrađen od ljuspi prisutan kod ostalih istraživanih vrsta. Odnosno, perasto-čekinjasti papus prisutan je kod *Shangwua masarica*, bradato-osasto zašiljen kod taksona roda *Amphoricarpos*, a osasto-zašiljen plevičasto ljuspast kod analiziranih jednogodišnjih predstavnika. Rezultati su takođe pokazali da je kod svih istraživanih vrsta papus direktno vezan za perikarp.
13. Kod unutrašnjih cipsela *A. elegans* papus je izgrađen od brojnih čekinja koje su organizovane u dva reda, što nije pronađeno kod drugih istraživanih vrsta iz *Xeranthemum* grupe. Ovaj podatak ima veliki taksonomski značaj.
14. Neke osobine kao što su glatki spoljašnji periklinalni zidovi epidermskih ćelija, blago izvijugani antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa, raspored ćelja adaksijalnog epidermisa koji nalikuju na slagalicu ("puzle"), veoma mali mukro



involukralnih brakteja kao i odsustvo kristala vedelita zajedničke su za vrste *Amphoricarpos exsul* i *Shangwua masarica* i *Sh. denticulata*, dok izvijugani antiklinalni zidovi ćelija adaksijalnog epidermisa, šilaste involukralne brakteje, kristali vedelita na površini involukralnih brakteja kao i osasto-zašiljen, plevičasto ljustast papus povezuju *Chardinia orientalis*, *Siebera pungens* i *Xeranthemum inapertum*, jednogodišnje vrste.

15. Sledeće mikromorfološke osobine se mogu potencijalno smatrati species specifičnim: goli adaksijalni epidermis lista i površine cipsele, nepravilno mrežasta površina involukralne brakteje kao i perasto-čekinjasti papus za vrste *Shangwua masarica* i *Sh. denticulata*; bradato-osasto zašiljen papus za taksone roda *Amphoricarpos*; nepravilan oblik ćelija epidermisa adaksijalne strane lista kao i kutikularni nabori i papilozna površina cipsele kod *Chardinia orientalis*; kanalna antiklinalna granica ćelija adaksijalnog epidermisa i voštane pločice na površini involukralnih brakteja za *Xeranthemum inapertum*; i snažno zadebljali nabori spoljašnjih zidova ćelija adaksijalnog epidermisa i involukralna brakteja sa belim prileglim trihoma u centralnom delu za *Siebera pungens*. Osobine kao što su vermiformne trihome na stablu i abaksijalnoj površini lista, adaksijalna insercija cipsele i asimetričan karpopodijum, kao i direktno vezivanje papusa za perikarp, su zajedničke za sve istraživane taksone.

16. Svi istraživani taksoni roda *Amphoricarpos* pokazuju slične anatomske karakteristike. Mladi adventivni koren pokazuje tipičnu građu. Sklerenhimska vlakna su prisutna u centru starijeg korena. Na poprečnom preseku rizoma uočena su sekundarna tkiva, sa širokim parenhimskim zracima koje prekidaju veoma dobro razvijeni ksilem. Rizomi pokazuju ekscentričan rast. List je amfistomatičan i ima dorziventralnu građu. Kristalne druze su pronađene u epidermskim i mezofilnim ćelijama lista. Poprečni presek drške cvasti je više manje višeugaonog oblika sa medularnim provodnim snopićima organizovanim u krugu i nekoliko "kortikalnih" snopića izvan kruga. Sekretorna tkiva nisu zabeležena. Višeslojni sklerenhim je



prisutan u mezofilu involukralnih brakteja i palja. Anatomija cvasti pokazuje slične karakteristike kao i ranije opisane za predstavnike familije Asteraceae. Uniformnost anatomskih karaktera ukazuje na veoma bliske odnose između istraživanih taksona. Analizirani anatomski kvalitativni karakteri doprinose poznavanju generalne anatomije roda *Amphoricarpos*.

17. Istraživane vrste roda *Xeranthemum* formiraju sekundarna tkiva u korenu, iako su jednogodišnje biljke. Anatomija stabla je tipična za ranije opisane za predstavnike familije Asteraceae. List ima dorziventralnu građu. Na površini involukralnih brakteja uočavaju se kristali. Višeslojni sklerenhim je prisutan u mezofilu involukralnih brakteja i palja. Anatomija palja je veoma slična anatomiji involukralnih brakteja. Važni karakteri cveta su: bočno otvaranje antera, krunica izgrađena od jednoslojnog epidermisa i homogenog parenhima u mezofilu, podcvetan plodnik i anatropan semeni zametak s abazalnom placentacijom. Odabrani kvantitativni i kvalitativni karakteri stabla, lista i drške cvasti (oblik, tip žlezdanih trihoma, prisustvo "kortikalnih" provodnih snopića), na osnovu kojih se istraživane vrste roda *Xeranthemum* anatomski razlikuju, doprinose boljoj identifikaciji taksona.
18. GC–FID analizom detektovano je ukupno osam masnih kiselina u cipselama balkanskih taksona roda *Amphoricarpos*. Od osam masnih kiselina šest je identifikovano, od palmitinske (C16:0) do stearinske (C18:0) masne kiseline. Dominantna masna kiselina kod svih istraživanih taksona je linolna, sa najvećim procentom (57.67%) u obodnim cipselama taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* i najmanjim (31.8%) u centralnim cipselama *A. autariatus* subsp. *bertisceus*. GC–FID analizom detektovano je ukupno 12 masnih kiselina u cipselama vrste *X. cylindraceum*. Od 12 masnih kiselina devet je identifikovano, od palmitoleinske (C16:1) do behenske (C22:0) masne kiseline. Dominantna masna kiselina je oleinska (55.24%). Ostale masne kiseline sa visokim procentom su linolna (16.48%)



- i palmitinska (8.88%). Masna kiselina sa najmanjim procentom je palmitoleinska (0.30%).
19. U profilima svih istraživanih taksona dominiraju nezasićene masne kiseline.
  20. Pomoću HPLC i  $^1\text{H}$  NMR kod vrste *Amphoricarpos elegans* utvrđen je dominantni seskviterpenski lakton 3-deoksiamforikarpolid.
  21. Orbitrap masenom spektrometrijom u ekstraktima balkanskih taksona roda *Amphoricarpos* je detektovano i identifikovano ukupno 30 fenolnih jedinjenja. Od toga, 11 jedinjenja pripada grupi fenolnih kiselina i derivata, sedam jedinjenja pripada grupi flavonoidnih-glikozida, 11 jedinjenja pripada grupi flavona, a jedno jedinjenje pripada grupi flavanona. Dominantno jedinjenje u uzorcima intaktnih listova svih istraživanih taksona je hrizoeriol sa najvećom količinom (8.276 mg/L) kod taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*. Dominantno jedinjenje u uzorcima samlevenih listova svih istraživanih taksona je 5-*O*-kafeoilhinska kiselina sa najvećom količinom (6.715 mg/L) kod taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*. Izuzetak je takson *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus* kod koga je dominantno jedinjenje hrizoeriol (4.216 mg/L).
  22. Molekularne analize jedarnih markera kao i kombinovani rezultati jedarnih i plastidnih markera pokazale su, veoma visokom podrškom, da je rod *Amphoricarpos* monofiletski i sestrinski je kladi koju obrazuju rodovi *Chardinia*, *Siebera* i *Xeranthemum* (*Xeranthemum* klada) koji sadrže samo jednogodišnje predstavnike. Rod *Shangwua* je sestrinska obema kladama.
  23. U osnovi se nalazi klada koju čini turska vrsta *A. exsul*. Kavkaska i turska i vrsta (*A. elegans* i *A. praedictus*) formiraju umereno podržanu kladu na osnovu analize kombinovanih podataka i sestrinske su kladi koju formiraju balkanski predstavnici roda (balkanska klada). Balkanski taksoni su podeljeni u dve dobro podržane klade.



Jednu kladu formiraju bosansko-hercegovačke populacije *A. autariatus* (*A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*), veoma dobrom podrškom, na osnovu oba tipa molekularnih podataka. Ova klada je sestrinska drugoj kladi, koju formiraju predstavnici ostalih balkanskih taksona, takođe visokom podrškom. U okviru ove, druge, balkanske klade, populacije različitih vrsta se mešaju.

24. U dobijenom filogenetskom stablu uočene su veoma kratke grane kod roda *Amphoricarpos* u poređenju sa jednogodišnjim rodovima iz *Xeranthemum* grupe, kao i sa rodom *Shangwua*. Ovo verovatno ukazuje na ranu diverzifikaciju balkanske klade i sigurno zajedničko poreklo svih balkanskih taksona. Sve balkanske populacije čine monofiletsku grupu sestrinsku sa *A. exsul*, kao što je i pokazano u ranijem istraživanju. Moguće mesto centra diverziteta roda *Amphoricarpos* je Kavkaz i Anatolija.
25. Mikromorfološki (kutikularna zadebljanja adaksijalne površine lista, vosak na involukralnim braktejama kao i bele prilegle trihome na involukralnim braktejama i kristali vedelita na površini involukralnih brakteja), anatomski (sekundarna građa korena i dorziventralna građa lista jednogodišnjih vrsta roda *Xeranthemum*) i molekularni markeri (ITS i kombinovani ITS i plastidni), podržavaju filogenetsku hipotezu koja govori da su višegodišnji preci iz konzerviranih staništa (planine) adaptirani na sušna i ruderalna staništa.
26. Rezultati *in vitro* antibakterijske aktivnosti suvog dietil etarskog, 80% metanolnog i 50% acetonskog ekstrakta listova istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* na osam bakterijskih vrsta pokazali su da je inhibitorna aktivnost postignuta u koncentraciji od 0.007 – 0.20 mg/mL, dok je baktericidni efekat postignut u koncentraciji od 0.015 – 0.25 mg/mL. Najosetljiviji bakterijski sojevi bili su *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*. Oba komercijalna antibiotika pokazala su manju aktivnost od testiranih ekstrakata (streptomycin, MIC od 0.04 – 0.26 mg/mL i MBC od 0.09-





0.52 mg/mL; ampicilin, MIC od 0.25 – 0.74 mg/mL i MBCs od 0.37 – 1.24 mg/mL).

27. Rezultati *in vitro* antifungalne aktivnosti suvog dietil etarskog, 80% metanolnog i 50% acetonskog ekstrakta listova istraživanih taksona roda *Amphoricarpos* na osam fungalnih vrsta pokazali su da su sve mikromicete bile osjetljive na testirane ekstrakte. Ekstrakti su inhibirali sve mikromicete pri koncentraciji od 0.001 – 0.4 mg/mL (MIC) i potpuno zaustavili rast pri koncentraciji od na 0.02 – 08 mg/mL (MFC). Najosetljivija vrsta je bila *Trichoderma viride*. Komercijalni antimikotici – bifonazol (MIC 0.10 – 0.20 mg/mL; MFC 0.20 – 0.25 mg/mL) i ketokonazol (MIC 0.15 – 2.50 mg/mL; MFC 0.20 – 3.50 mg/mL) bili su, pokazali su manju aktivnost od nekih ekstrakta.

28. Ukupan sadržaj fenola je izražen kao ekvivalenti galne kiseline u rasponu od  $11.90 \pm 0.19$  do  $67.23 \pm 0.70$  mg GA/g. Visoke koncentracije fenolnih jedinjenja su detektovane u metanolnim ekstraktima svih testiranih taksona. Najveći ukupni sadržaj fenola bio je u metanolnom ekstraktu *A. autariatus* subsp. *autariatus* ( $67.23 \pm 0.70$  mg GA/g). Koncentracije flavonoida u testiranom metanolnom ekstraktu i tečnom metanolnom i vodenom ekstraktu kretale su se od  $9.79 \pm 0.43$  do  $88.69 \pm 1.33$  mg RU/g. Visoke koncentracije flavonoida utvrđene su u metanolnim ekstraktima svih testiranih taksona. Najviše koncentracije flavonoida utvrđene su za metanolni ekstrakt taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* ( $88.69 \pm 1.33$  mg RU / g).

29. Antioksidativni potencijal suvog metanolnog i tečnih metanolnih i vodenih ekstrakata taksona roda *Amphoricarpos* izražen u IC<sub>50</sub> (mg/mL) vrednostima se kretalo od  $170.01 \pm 1.58$  do  $1041.62 \pm 2.35$  mg/mL. Najveći kapacitet za neutralizaciju DPPH radikala je izmeren u suvom metanolnom ekstraktu taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus* ( $170.01 \pm 1.58$  mg/mL). Ovo je u korelaciji sa visokim



sadržajem ukupnih fenola i koncentracijama flavonoida u suvom metanolnom ekstraktu ovog taksona.

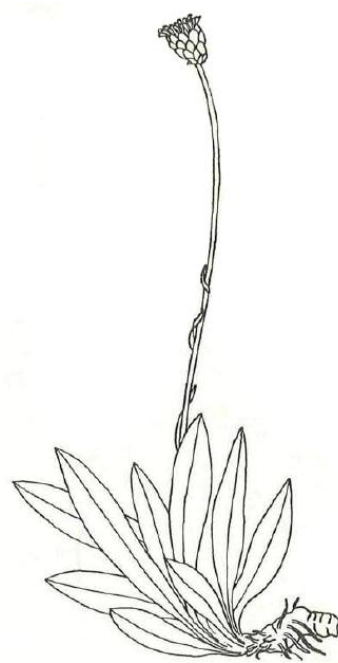
30. Ukupni sadržaj fenola značajno varira između ekstrakata listova vrste *Amphoricarpos elegans*, pri čemu je metanolni ekstrakt pokazao najveću količinu. U svim antioksidativnim testovima (DPPH, ABTS i FRAP), metanolni ekstrakt *A. elegans* je pokazao veći antioksidativni potencijal. Budući da je razlika između ukupnog sadržaja flavonoida u oba ekstrakta (metanolni i etil acetatni) veoma mala, većina antioksidativnog potencijala može se pripisati fenolima. Međutim, antioksidativni potencijal metanolne frakcije, pokazan u DPPH testu, bio je više od deset puta veći od antioksidativnog potencijala frakcije etil acetata, što se pripisuje i udelu seksviterpenkih laktona u antioksidativnoj aktivnosti.
31. Poređenjem svih dobijenih rezultata u odnosu na balkanski kompleks roda *Amphoricarpos*, može se zaključiti sledeće: morfološka analiza (morfometrija) jasno odvaja četiri taksona unutar balkanskog kompleksa koji se poklapaju sa njihovim geografskim rasprostranjenjem; mikromorfološka analiza pokazuje razlike između taksona, ali pre svega izdvaja bosansko-hercegovački takson; fitohemijska analiza pokazuje vidljive razlike u profilu masnih kiselina i fenola, ali ne izdvaja jasno ni jedan takson. Molekularne analize jedino podržavaju separaciju dva taksona: bosansko-hercegovački *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii* i crnogorski takson (sve istraživane populacije taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*, *A. autariatus* subsp. *autariatus* i *A. autariatus* subsp. *bertisceus*). Svi navedeni karakteri imaju taksonomski značaj i mogu biti korisni pri rešavanju kompleksne taksonomije ovog roda na Balkanu.
32. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da postoji diferencijacija unutar balkanskog kompleksa roda *Amphoricarpos*. Ovo je dovelo do postavljanja dve hipoteze. Prva hipoteza koja favorizuje postojanje četiri morfološki definisana taksona i druga



koja, na osnovu mikromorfoloških i molekularnih aspekata favorizuje postojanje dva taksona.

33. Naši rezultati takođe idu u prilog promene odnosno podizanja taksonomskog ranga *Xeranthemum* grupe, pre svega gledano u odnosu na zajedničke mikromorfološke karaktere (vermiformne trihome na stablu i abaksijalnoj površini lista, adaksijalna insercija cipsele, asimetričan karpopodijum i direktno vezivanje papusa za perikarp). Ovde posebno treba istaći i značaj kristala vedelita pronađenih u ovom istraživanju samo kod jednogodišnjih predstavnika ovog podtribusa, što potencijalno može biti razlog dalje taksonomske diferencijacije u okviru Xerantheminae.

Ilustracija *Amphoricarpos autariatus* Blečić et Mayer: Habitus, Blečić i Mayer (1967). Die europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos* VISIANI. Phytion, 12, 150-158



## 7 LITERATURA



## 7. LITERATURA

- Abid R, Ali N (2010). Cypsel morphology and its taxonomic significance for the tribe Senecioneae (Asteraceae) from Pakistan. *Pak J Bot* 42:117–133.
- Abid RD, Qaiser M (2009). Taxonomic significance of the cypsel morphology in the tribe Anthemideae (Asteraceae) from Pakistan and Kashmir. *Pak J Bot* 41:555–579.
- Adedeji O, Jewoola OA (2008). Importance of leaf epidermal characters in the Asteraceae family. *Not Bot Horticult Agrobot* 36:7–16.
- Akhalkatsi M, Ekhvaia J, Asanidze Z (2012). Diversity and genetic erosion of ancient crops and wild relatives of agricultural cultivars for food: implications for nature conservation in Georgia (Caucasus). In: Tiefenbacher J (ed) *Perspectives on Nature Conservation- Patterns, Pressures and Prospects*. InTech, pp 51–92.
- Altundag E, Ozturk M (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Proceed Soc Behav Sci* 19:756–777.
- Anderberg AA, Baldwin BG, Bayer RJ, Breitwieser I, Jeffrey C, Dillon MO, Eldenäs P, Funk VA, Garcia-Jacas N, Hind DJN, Karis PO, Lack HW, Nesom G, Nordenstam B, Oberprieler C, Panero JL, Puttock C, Robinson H, Stuessy TF, Susanna A, Urtubey E, Vogt R, Ward J, Watson LE (2007). Compositae. In: Kadereit JW, Jeffrey C (eds) *Flowering Plants. Eudicots. Asterales*, vol. VIII K. Kubitzki [ed], *The families and genera of vascular plants*. Springer Verlag, Berlin, pp 123–146.
- Anderson LC, Creech JB (1975). Comparative leaf anatomy of *Solidago* and related Asteraceae. *Amer J Bot* 62:486–493.
- Andreucci AC, Ciccarelli D, Desideri I, Pagni AM (2008). Glandular hairs and secretory ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): morphology and histochemistry. *Ann Bot Fenn* 45:11–18.
- Appezato-da-Glória B, Da Costa FB, Silva VC, Gobbo-Neto L, Rehder VLG, Hayashi AH (2012). Glandular trichomes on aerial and underground organs in *Chrysolaena* species



- (Vernonieae – Asteraceae): structure, ultrastructure and chemical composition. *Flora* 207:878–887.
- Appezato-da-Glória B, Hayashi A, Cury G, Soares M, Rocha R (2008). Occurrence of secretory structures in underground systems of seven Asteraceae species. *Bot J Linn Soc* 157:789–796.
- Arnott HJ (1982). Three systems of biomineralization in plants with comments on the associated organic matrix. In: Nancollas GH (ed) *Biological Mineralization and Demineralization*. Springer Verlag, Berlin, pp 199–218.
- Ascensão L, Pais MS (1988). Ultrastructure and histochemistry of secretory ducts in *Artemisia campestris* ssp. *maritima* (Compositae). *Nord J Bot* 8:283–292.
- Ascensão L, Pais MSS (1987). Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Bot Gaz* 148:221–227.
- Atrog BAA, Natić M, Tosti T, Opsenica Milojković D, Djordjević I, Tešević V, Jadranin M, Milosavljević S, Lazić M, Radulović S, Tešić Z (2008). Lipophilicity of some guaianolides isolated from two endemic subspecies of *Amphoricarpos neumayeri* (Asteraceae) from Montenegro. *Biomed Chromatogr* 23:250–256.
- Ayasligil Y (1984). New taxa and records from southwestern Turkey. *Notes Roy Bot Gard Edinburgh* 42:69–76.
- Baba Aissa F (1999). Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident. *Encyclopédie des plantes utiles*. Rouiba (Algeria): EDAS, Librairie moderne.
- Bahmani M, Zargaran A (2015). Ethno-botanical medicines used for urinary stones in the Urmia, Northwest Iran. *Eur J Integr Med* 7:657–662.
- Baldacci A (1894). Revista della collezione botanica fatta nel 1892 nell'Albania. *Malpighia* 8:69–87.



- Baldwin BG, Markos S (1998). Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Mol Phylogenet Evol* 10:449–463.
- Ballian D, Grebenc T, Božić G, Melnik V, Wraber T, Kraigher H (2006). History, genetic differentiation and conservation strategies for disjunct populations of *Sibiraea* species from Southeastern Europe and Asia. *Conserv Genet* 7:895–907.
- Barabé D, Lacroix C (2000). Homeosis in the flower of the Araceae: the case of *Philodendron melinonii* (Araceae). *Ann Bot-London* 86:479–491.
- Barabé D, Lacroix C, Chouteau M, Gibernau M (2004). On the presence of extracellular calcium oxalate crystals on the inflorescences of Araceae. *Bot J Linn Soc* 146:181–190.
- Bárcenas-Argüello ML, Gutiérrez-Castorena MCDC, Terrazas T (2015). The polymorphic weddellite crystals in three species of *Cephalocereus* (Cactaceae). *Micron* 77:1–8.
- Barclay AS, Earle FR (1974). Chemical analysis of seeds III: oil and protein content of 1253 species. *Econ Bot* 28:178–236.
- Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P, Cabrera E, Rodríguez-García I, García-Moreno M, Grávalos DG (1997). Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*. *Fitoterapia* 68:281–283.
- Barres L, Sanmartín I, Anderson CL, Susanna A, Buerki S, Galbany-Casals M, Vilatersana R (2013). Reconstructing the evolution and biogeographic history of tribe Cardueae (Compositae). *Am J Bot* 100:867–882.
- Barthlott W (1981). Epidermal and seed surface characteristics of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nord J Bot* 1:345–354.
- Barthlott W (1984). Microstructural features of seed surfaces. In: Heywood VH, Moore DM (eds) *Current concepts in plant taxonomy*. Academic Press, Cambridge, pp 95–105.



- Bartoli A, Galati BG, Tortosa RD (2011) Anatomical studies of the secretory structures: Glandular trichomes and ducts, in *Grindelia pulchella* Dunal (Astereae, Asteraceae). *Flora* 206:1063–1068.
- Batista MF, De Souza LA (2017) Flower structure in ten Asteraceae species: considerations about the importance of morpho-anatomical features at species and tribal level. *Braz J Bot* 40:265–279.
- Beck G (1894). V. Gruppe. In Dörfler I (ed), *Jahreskatalog des Wiener botanischen Tauschvereines*. Wien. p. 20.
- Ben Salah H, Smaoui S, Abdennabi R, Allouche N (2019). LC-ESI-MS/MS phenolic profile of *Volutaria lippii* (L.) Cass. extracts and evaluation of their in vitro antioxidant, antiacetylcholinesterase, antidiabetic and antibacterial activities. *Evid-Based Compl Alt* 2019:1–13.
- Bentham G (1873) Compositae. In: Bentham G, Hooker JD (eds) *Genera Plantarum*, vol. 2(1). Reeve, London. pp 163–533.
- Berg RH (1994). A calcium oxalate-secreting tissue in branchlets of the Casuarinaceae. *Protoplasma* 183:29–36.
- Bernardello G (2007). A systematic survey of floral nectaries. In: Nicolson Sw, Nepi M, Pacini E (eds) *Nectaries and Nectar*. Springer, The Netherlands. pp. 19–128.
- Blanca G, Díaz de la Guardia C (1997). Fruit morphology in *Tragopogon* L. (Compositae: Lactuceae) from the Iberian Peninsula. *Bot J Linn Soc* 125:319–329.
- Blečić V, Mayer E (1967). Die europäischen sippen der gattung *Amphoricarpus* Visiani. *Phyton* 12:150–158.
- Booth C (1971). Fungal culture media. In Norris JR, Ribbons DW (eds) *Methods in Microbiology*. London and New York: Academic Press. pp 49–94.
- Borchert R (1984) Functional anatomy of the calcium-excreting system of *Gleditsia triacanthos* L. *Bot Gaz* 145:474–482.





- Bošnjak K (1936). Iz hercegovačke flore. Glasnik Hrvatskog Prirodoslovnoga Društva, pp 41–48, 62–63.
- Bremer K. (1994). Asteraceae Cladistics and Classification. Timber Press: Portland, Oregon.
- Bremer K (1987). Tribal interrelationships of the Asteraceae. Cladistics 3:210–253.
- Brizuela M, Montenegro T, Carjuzaa P, Maldonado S (2007). Insolubilization of potassium chloride crystals in *Tradescantia pallida*. Protoplasma 231:145–149.
- Brubaker CL, Horner HT (1989). Development of epidermal crystals in leaflets of *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae; Papilionoideae). Can J Bot 67:1664–1670.
- Caković D, Stešević D, Schönswetter P, Frajman B (2015). How many taxa? Spatiotemporal evolution and taxonomy of *Amphoricarpos* (Asteraceae, Carduoideae) on the Balkan Peninsula. Org Divers Evol 15:429–445.
- Camilotti JG, Biu CC, Farago PV, Santos VLPD, Franco CRC, Budel JM (2014). Anatomical characters of leaves and stem of *Calea serrata* Less., Asteraceae. Braz Arch Biol Techn 57:867–873.
- Cassini H (1819) sur la famille de Synanthérées, contenant les caractères des tribus. J Phys Chim Hist Nat Arts 88:189–204.
- Cerbah M, Coulaud J, Brown SC, Siljak-Yakovlev S (1999). Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochoeris*. Heredity 82:261–266.
- Chase MW, Peacor DR (1987). Crystals of calcium oxalate hydrate on the perianth of *Stelis* SW. Lindleyana 2:91–94.
- Chaturvedi D (2011). Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities. In: Opportunity, Challenges and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. Research Signpost, Trivandrum, pp 313–334.
- Ciccarelli D, Garbari F, Pagni AM (2007). Glandular hairs of the ovary: a helpful character for Asteroideae (Asteraceae) taxonomy? Ann Bot Fenn 44:1–7.



- Comes PH, Kadereit JW (1998). The effects of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Plant Sci* 3:432–438.
- Cron GV, Robbertse PJ, Vincent PLD (1993). The anatomy of the cypselae of species of *Cineraria* L. (Asteraceae-Senecioneae) and its taxonomic significance. *Bot J Linn Soc* 112:319–334.
- Cullings KW (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol Ecol* 1:233–240.
- Cury G, Appezzato-da-Glória B (2009). Internal secretory spaces in thickened underground systems of Asteraceae species. *Aust J Bot* 57:229–239.
- Cvetković M, Djordjević I, Jadranin M, Vajs V, Vučković I, Menković N, Milosavljević S, Tešević V (2014). Further amphoricarpolides from the surface extracts of *Amphoricarpus* complex from Montenegro. *Chem Biodivers* 11:1428–1437.
- Cvetković M, Anđelković B, Stevanović V, Jadranin M, Đorđević I, Tešević V, Milosavljević S, Gođevac D (2018). NMR-based metabolomics study of *Amphoricarpus* species from Montenegro. *Phytochem Lett* 25:1–5.
- Da Costa F, Terflöth L, Gasteiger J (2005). Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry* 66:345–353.
- da Silva EMS, Hayashi AH, Appezzato-da-Glória B (2014). Anatomy of vegetative organs in *Aldama tenuifolia* and *A. kunthiana* (Asteraceae: Heliantheae). *Braz J Bot* 37:505–517.
- Dadpour MR, Naghiloo S, Neycharan SF (2012). The development of pistillate and perfect florets in *Xeranthemum squarrosum* (Asteraceae). *Plant Biol* 14:234–243.
- Dane F, Meric C, Hüseyinova G. (2000). Some ultrastructural observations on calcium oxalate raphide crystal idioblasts and meristematic cells of the adventive root tips of *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawl. ex Sprengel (Amaryllidaceae). *Turk J Bot* 24:71–80.



- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772.
- Daumann E (1930). Nektarabscheidung in der blütenregion einiger Araceen. Zugleich ein Hinweis auf die Bangersche Methode. *Planta* 12:38–48.
- Daumann E (1970). Das Blütennektarium der Monocotyledon unter besonderer Berücksichtigung seiner systematischen und phylogenetischen Bedeutung. *Feddes Repert* 80:463–590.
- Davis GL (1966). *Systematic embryology of the angiosperms*. John Wiley and Sons, New York, London, Sydney.
- Davis SD, Heywood VH, Hamilton AC (1994). *Centres of plant diversity, vol. 1, Europe, Africa, southwest Asia and the Middle East*. Gland: International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources.
- De Yoreo JJ, Dove PM (2004). Shaping crystals with biomolecules. *Science* 306:1301–1302.
- Dekić MS, Radulović NS, Randelović VN, Stojanović-Radić ZZ, Veljković BP (2015). Essential oils and diethyl ether extracts of Serbian *Xeranthemum cylindraceum* and *X. annuum*: chemical composition, antimicrobial activity, and chemotaxonomic implications. *Chem Biodivers* 12:1378–1397.
- Dickison WC (2000). *Integrative plant anatomy*. London, UK: Academic Press.
- Dittrich M (1966). Karpologische Untersuchungen zur systematik von *Centaurea* und verwandten Gattungen. *Bot Jahrb Syst* 88:70–162.
- Dittrich M (1970). Morphologische und anatomische untersuchungen an Früchten der Carduinae (Compositae). I. Morphologischer Teil. *Candollea* 25:45–67.
- Dittrich M (1977) Cynareae-systematic review. In: Heywood VH, Harborne JB, Turner BL (eds) *The Biology and Chemistry of Compositae*, Academic Press, London, vol. 2, pp 999–1015.



- Dittrich M (1985). Morphologische und anatomische untersuchungen an blüten und früchten der gattung *Carlina* (Compositae). Bot Jahrb Syst 107:591–609.
- Dittrich M (1996). Die bedeutung morphologischer und anatomischer achänen-merkmale für die systematik der tribus Echinopeae Cass. und Carlineae Cass. Boissiera 51:9–102.
- Djordjević I, Vajs V, Bulatović V, Menković N, Tešević V, Macura S, Janačković P, Milosavljević S (2004). Guaianolides from two subspecies of *Amphoricarpos neumayeri* from Montenegro. Phytochemistry 65:2337–2345.
- Djordjević I, Jadranin M, Vajs V, Menković N, Tešević V, Macura S, Milosavljević S (2006). Further guaianolides from *Amphoricarpos neumayeris* ssp. *murbeckii* from Montenegro. Z Naturforsch 61b:1437–1442.
- Dormer KJ (1961). The crystals in the ovaries of certain Compositae. Ann Bot-London 25:241–254.
- Dormer KJ (1962). The taxonomic significance of crystal forms in *Centaurea*. New Phytol 61:32–35.
- Doskotch RW, El-Feraly FS (1969). Antitumor agents II: Tulipinolide, a new germacranolide sesquiterpene, and costunolide. Two cytotoxic substances from *Liriodendron tulipifera* L. J Pharm Sci 58:877–880.
- Duarte MR, Budel JM, Matzenbacher NI, Menarim DO (2011). Microscopic diagnosis of the leaf and stem of *Lucilia nitens* Less., Asteraceae. Lat Am J Pharm 30:2070–2075.
- Duke SO, Paul RN (1993) Development and fine structure of glandular trichomes of *Artemisia annua* L. Int J Plant Sci 154:107–118.
- Duke MV, Paul RN, Elsohly HN, Sturtz G, Duke SO (1994). Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. Int J Plant Sci 155:365–372.



- Echigo T, Kimata M, Kyono A, Shimizu M (2005). Re-investigation of the crystal structure of whewellite  $[\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}]$  and the dehydration mechanism of caoxite  $[\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ . *Mineral Mag* 69:77–88.
- Espinel-Ingroff A (2001). Comparison of the e-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 39:1360–1367.
- Evans LS, Citta A, Sanderson SC (2012). Flowering branches cause injuries to second-year main stems of *Artemisia tridentata* Nutt. subspecies *tridentata*. *West N Am Naturalist* 72:447–457.
- Fahn A (1979). *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London.
- Fahn A, Cutler FD (1992). *Xerophytes, encyclopedia of plant anatomy*. Gebrüder Borntraeger.
- Farr ER, Leussink JA, Stafleu FA (1979). *Index nominum genericorum (plantarum)*, 1 (Aa-Epochnum). *Regnum Veg* 100:74.
- Farrag NM, Abd El Aziz EM, El-Domiaty MM, El Shafea AM (1993). Phytochemical investigation of *Centaurea araneosa* growing in Egypt. *J Pharm Sci* 2:29–45.
- Faust WZ, Jones SB (1973). The systematic value of trichome complements in a North American group of *Vernonia* (Compositae). *Rhodora* 75:517–528.
- Fikenscher LH, Hegnauer R, Ruijgrok HWL (1980). Die Verbreitung der blausäure bei den Cormophyten. 14. Mitteilung1. Neue beobachtungen zur cyanogenese bei den Compositen2. *Planta Med* 40:202–211.
- Font Quer P (1995). *Plantas Medicinales: El Dioscórides Renovado*. 15th ed. Madrid: Labor.
- Formisano C, Rigano D, Senatore F, Bancheva S, Maggio A, Rosselli S, Bruno M (2012). Flavonoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort. (Tribe Cardueae, Asteraceae): distribution and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data. *Chem Biodivers* 9:2096–2158.



- Frajman B, Oxelman B (2007). Reticulate phylogenetics and phytogeographical structure of *Heliosperma* (Sileneae, Caryophyllaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 43:140–155.
- Frajman B, Schneeweiss GM (2009). A Campanulaceous fate: the Albanian stenoendemic *Asyneuma comosiforme* in fact belongs to isophyllous *Campanula*. *Syst Bot* 34:595–601.
- Frajman B, Eggens F, Oxelman B (2009a). Hybrid origins and homoploid reticulate evolution within *Heliosperma* (Sileneae, Caryophyllaceae) - amultigene phylogenetic approach with relative dating. *Syst Biol* 58:328–345.
- Frajman B, Heidari N, Oxelman B (2009b). Phylogenetic relationships of *Atocion* and *Viscaria* (Sileneae, Caryophyllaceae) inferred from chloroplast, nuclear ribosomal, and low-copy gene DNA sequences. *Taxon* 58:811–824.
- Franca RDO, De-Paula OC, Carmo-Oliveira R, Marzinek J (2015). Embryology of *Ageratum conyzoides* L. and *A. fastigiatum* RM King & H. Rob. (Asteraceae). *Acta Bot Bras* 29:8–15.
- Franceschi VR, Horner Jr HT (1980). Calcium oxalate crystals in plants. *Bot Rev* 46:361–427.
- Franceschi VR, Nakata PA (2005). Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol* 56:41–71.
- Freire SE, Urtubey E, Giuliano DA (2007). Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. *Caldasia* 29:23–38.
- Frey-Wyssling A (1981). Crystallography of the two hydrates of crystalline calcium oxalate in plants. *Am J Bot* 68:130–141.
- Fritz E, Saukel J (2011a). Anatomy of subterranean organs of medicinally used Cardueae and related species and its value for discrimination. *Sci Pharm* 79:157–174.
- Fritz E, Saukel J (2011b). Secretory structures of subterranean organs of some species of the Cardueae and their value for discrimination. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 53:63–73.



- Fritz E, Saukel J (2011c). Interxylary cork of *Saussurea discolor* and *S. pygmaea* (Asteraceae). *Biologia* 66:454–457.
- Frost RL (2006). Raman spectroscopy of natural oxalates. *Anal Chim Acta* 517:207–214.
- Fukarek P (1965). Rasprostranjenost i ekološke karakteristike krčagovine *Amphoricarpus neumayeri* Vis. *Glasnik Zemaljskog Muzeja Sarajevo*, pp 3–4, 159–180.
- Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jacas N, Susanna A, Jansen RK (2005). Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biol Skrif* 55:343–374.
- Funk VA, Robinson HE (2005). Daisies and sunflowers: family Asteraceae. In: Krupnick GA, Kress WJ (eds) *Plant Conservation. A Natural History Approach*. University of Chicago Press, Chicago and London, pp 115–137.
- Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Robinson H (2009). Classification of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ (eds) *Systematics, Evolution, and Geography of Compositae*. IAPT, Vienna, pp 171–189.
- Gajić M (1975). Asteraceae Dumortier. In: Josifović M (ed) *Flora SR Srbije*. Vol. 7. Srpska Akad Nauka, pp 176–179.
- Garcia-Jacas N, Garnatje T, Susanna A, Vilatersana R (2002). Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Mol Phylogenet Evol* 22:51–64.
- Garg SK, Sharma KC (2007). Taxonomical significance of the micromorphological and scanning electron microscopic surface patterns of cypselas in some members of the tribe Heliantheae (Asteraceae). *Feddes Repert* 118:165–191.
- Garnatje T, Vallès J, Garcia S, Hidalgo O, Sanz M, Canela MA, Siljak-Yakovlev S (2004a). Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biol Cell* 96:117–124.



- Garnatje T, Vallès J, Vilatersana R, Garcia-Jacas N, Susanna A, Siljak-Yakovlev S (2004b). Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Plant Biol* 6:140–146.
- Garnatje T, Martín J (2007). Pollen studies in the genus *Echinops* L. and *Xeranthemum* group (Asteraceae). *Bot J Linn Soc* 154:549–557.
- Garty J, Kunin P, Delarea J, Weiner S (2002). Calcium oxalate and sulphate-containing structures on the thallial surface of the lichen *Ramalina lacera*: response to polluted air and simulated acid rain. *Plant Cell Environ* 25:1591–1604.
- Geppert B, Dro`d` B, Kielczewski M, Holub M (1983). Sesquiterpene lactones. XXIII. Isolation of sesquiterpene lactones from *Centaurea* L. species. *Acta Soc Bot Pol* 52:23–34.
- Ginko E, Dobeš C, Saukel J (2016). Suitability of root and rhizome anatomy for taxonomic classification and reconstruction of phylogenetic relationships in the tribes Cardueae and Cichorieae (Asteraceae). *Sci Pharm* 84:585–602.
- Godelle B, Cartier D, Marie D, Brown SC, Siljak-Yakovlev S (1993). Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry* 14:618–626.
- Gómez A, Lunt DH (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In Weiss S, Ferrand N (eds) *Phylogeography of southern European refugia*. Berlin: Springer, pp 155–188.
- Gousiadou, C., Skaltsa, H. 2003. Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 389–396.
- Grant V (1982a). Periodicities in the chromosome numbers of the angiosperms. *Bot Gaz* 143:379–389.
- Grant V (1982b) Chromosome number patterns in primitive angiosperms. *Bot Gaz* 143:390–394.





- Grecco SDS, Ferreira MJ, Romoff P, Favero OA, Lago JHG (2011). Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol* 42:21–24.
- Greuter W, Brummitt RK, Farr E, Kilian N, Kirk PM, Silva PC (1993). Names in current use for extant plant genera. *Regnum Veg* 129:48.
- Greuter W (2003). The Euro + Med treatment of Cardueae (Compositae) - generic concepts and required new names. *Willdenowia* 33:49–61.
- Griffiths HI, Kryštufek B, Reed JM (eds) (2004). *Balkan biodiversity: pattern and process in the European hotspot*. Dordrecht: Kluwer.
- Grossheim AA (1949). *Opredelitel' rastenii kavkaza*. Moskva.
- Häffner E (2000). On the Phylogeny of the Subtribe Carduinae (Tribe Cardueae, Compositae) Englera, No. 21. *Botanischer Garten und Botanisches Museum, Berlin-Dahlem*, pp 3–208.
- Hahn G, Lehmann HD, Kurten M (1968). Zur pharmakologie und toxikologie von silymarin, des antihepatotoxischen wirkprinzipes aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneimittelforschung* 18:698–704.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S* 41:95–98.
- Hamilton MB (1999). Four primer pairs for the amplification of chloroplastic intergenic regions with intraspecific variation. *Mol Ecol* 8:513–525.
- Hammerl H, Pichler O (1959). Untersuchungen über den einfluß eines artischockenextraktes auf die serumlipide in hinflick auf die Arterioskleroseprophylaxe. *Wiener Med Wochenschr* 109:853–855.
- Hanel H, Raether W (1988). A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses* 31:148–154.
- Haque MZ, Godward MBE (1984). New records of the carpopodium in Compositae and its taxonomic use. *Bot J Linn Soc* 89:321–340.



- Harborne JB, Turner BL (1984) *Plant Chemosystematics*. Academic Press, London and New York.
- Harris EM (1995). Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: a synthesis of historical and current concepts. Louisiana State University, Baton Rouge. *Bot Rev* 61:2-3, 93.
- Hayek A. (1924–1933). *Prodromus Florae peninsulae Balcanicae*. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*, 30:1–1193, 1–1152, 1–472.
- Hegnauer R (1964). *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band 3. Birkhäuser Verlag, Springer Basel.
- Herrando-Moraira S and the Cardueae radiations Group (in alphabetical order) Calleja JA, Galbany-Casals M, Garcia-Jacas N, Liu J-Q, López-Alvarado J, López-Pujol J, Mandel JR, Massó S, Montes-Moreno N, Roquet C, Sáez L, Sennikov A, Susanna A, Vilatersana R (2019). Nuclear and plastid DNA phylogeny of the tribe Cardueae (Compositae) with Hyb-Seq data: A new subtribal classification and a temporal diversification framework. *Mol Phylogenet Evol* 137:313–332.
- Hershkovitz MA (2006). Ribosomal and chloroplast DNA evidence for diversification of western American Portulacaceae in the Andean region. *Gayana Bot* 63:13–74.
- Hess R (1938). Vergleichende untersuchungen über die zwillingshaare der Compositen. *Bot Jahrb Syst* 68:435–496.
- Hewitt GM (2000). The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature* 405:907–913.
- Hewitt GM (2011). Mediterranean peninsulas: the evolution of hotspots. In: Zachos FE, Habel JC (eds) *Biodiversity hotspots*. Berlin: Springer, pp 123–147.
- Hilditch TP, Williams PN (1964) *The chemical constitution of natural fats* (4th edition). Chapman and Hall, London.
- Hind DJN (2007). Asteraceae. In: Heywood VH, Brummitt RK, Culham AC, Seberg O (eds) *Flowering Plant Families of the World*. Kew Publications, Richmond; Firefly Books, Ontario and Buffalo, New York, pp 46–52.



- Hoffman O (1893). Cynareae - Centaureinae. In: Engler A, Prantl K (eds) Die natürlichen Pflanzenfamilien, vol. 4(5). Engelmann, Leipzig, pp 324–333.
- Horner HT (1977). A comparative light and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). Am J Bot 64:745–759.
- Horner HT, Kausch AP, Wagner BL (2000). Ascorbic acid: a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid root culture. Int J Plant Sci 161:861–868.
- Horner HT, Wanke S, Samain MS (2009). Evolution and systematic value of leaf crystal macropatterns: a phylogenetic approach in the genus *Peperomia* (Piperaceae). Int J Plant Sci 170:343–354.
- Horner HT, Wanke S, Samain MS (2012). A comparison of leaf crystal macropatterns in the two sister genera *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). Am J Bot 99:983–997.
- Horvat I, Glavač V, Ellenberg H (1974). Vegetation Südosteuropas. Stuttgart: Gustav Fischer.
- Hübel W, Nahrstedt A, Fikenscher LH, Hegnauer R (1982). Zierinxylosid, ein neues cyanogenes glykosid aus *Xeranthemum cylindraceum*. Planta Med. 44:178–180.
- Ilarslan H, Palmer RG, Horner HT (2001). Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. Ann Bot-London 88:243–257.
- Inceer H, Bal M, Ceter T, Pinar NM (2012). Fruit structure of 12 Turkish endemic *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Asteraceae) taxa and its taxonomic implications. Plant Syst Evol 298:845–855.
- Iwano M, Entani T, Shiba H, Takayama S, Isogai A (2004). Calcium crystals in the anther of *Petunia*: the existence and biological significance in the pollination process. Plant Cell Physiol 45:40–47.
- Jadranin M, Djordjević I, Tešević V, Vajs V, Menković N, Soković M, Glamočlija J, Milosavljević S (2013). Sesquiterpene lactones of *Amphoricarpos autariatus* ssp.



- autariatus* from Montenegro - antifungal leaf - surface constituents. *Rec Nat Prod* 7:234–238.
- Jana BK, Mukherjee SK (2012). Cypselas as a taxonomic marker for the genus *Solidago* L. in the tribe Astereae (Asteraceae). *Biodiversity Conservation: Fundamentals and Applications* 227–233.
- Jana BK, Mukherjee SK (2012). Cypselas as a taxonomic marker for the genus *Solidago* L. in the tribe Astereae (Asteraceae). In: Saha, Ghosh, Gangopadhyay, Saha, Singh, Sarkar, Das (eds) *Biodiversity Conservation: Fundamentals and Applications*. Dum Dum Motijheel College (West Bengal State University), Kolkata, W.B. India. pp 227–233.
- Janačković P, Gavrilović M, Rančić D, Dajić-Stevanović Z, Giweli AA, Marin PD (2019). Comparative anatomical investigation of five *Artemisia* L. (Anthemideae, Asteraceae) species in view of taxonomy. *Braz J Bot* 42:135–147.
- Janačković P, Gavrilović M, Vujišić L, Matevski V, Marin PD (2017). Fatty acid composition of the cypselas of two endemic *Centaurea* species (Asteraceae). *Bot Serb* 41:3–9.
- Janačković P, Tešević V, Lakušić D, Milosavljević SM, Marin PD, Duletić-Laušević S, Marin M (2004). Linolenic fatty acid as a major component from cypselas of selected *Centaurea* species. XI OPTIMA Meeting, Abstract book, 138.
- Janačković P, Tešević V, Marin PD, Vajs V, Milosavljević SM, Ristić M (1996). Fatty acids of some species from *Ptilostemon* Cass. and *Cirsium* Adans. (Asteraceae). 1st Congress of Biologists of Macedonia, Abstract book, 93.
- Janačković P. (2004). Fitohemijska i hemotaksonomska analiza odabranih vrsta roda *Centaurea* L. (Asteraceae) sa područja Centralnog Balkana. Doktorska disertacija. Beograd.
- Janačković P. (1997). Fitohemijska i mikromorfološka analiza *Ptilostemon strictus* (Ten.) W. Greuter i srodnih vrsta tribusa Cynareae (Asteraceae). Magistarska teza. Beograd.



- Janačković P, Tešević V, Milosavljević S, Vuković G (2003) Biljke roda *Centaurea* kao potencijalni izvor seskviterpenskog laktona knicina. Review. *Lekovite sirovine* 23:5–14.
- Jensen WA (1962). *Botanical Histochemistry: Principles and Practices*. WH Freeman and Co., San Francisco.
- Johansen DA (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York, London.
- Johnson BJ, Jellum MD (1972). Effect of planting date on sunflower yield, oil and plant characteristics. *Agron J* 64:747–748.
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS (1992). *Comparative embryology of angiosperms*, vol 2. Springer-Verlag, New York.
- Jones Q, Earle FR (1966). Chemical analysis of seeds II: oil and protein content of 759 species. *Econ Bot* 20:127–155.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2002). *Plant systematics – a phylogenetic approach*, 2nd edn. Sunderland: Sinauer.
- Karanović D, Luković J, Zorić L, Anačkov G, Boža P (2015). Taxonomic status of *Aster*, *Galatella* and *Tripolium* (Asteraceae) in view of anatomical and micro-morphological evidence. *Nord J Bot* 33:484–497.
- Karanovic D, Zoric L, Zlatkovic B, Boza P, Lukovic J (2016). Carpological and receptacular morpho-anatomical characters of *Inula*, *Dittrichia*, *Limbarda* and *Pulicaria* species (Compositae, Inuleae): taxonomic implications. *Flora* 219:48–61.
- Kartal C (2016). Calcium oxalate crystals in some species of the tribe Cardueae (Asteraceae). *Bot Sci* 94:107–119.
- Katalinić V, Miloš M, Kulišić T, Jukić M (2004). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* 94:550–7.
- Katinas L, Hernández MP, Arambarri AM, Funk VA (2016). The origin of the bifurcating style in Asteraceae (Compositae). *Ann Bot-London* 117:1009–1021.



- Kausch AP, Horner HT (1984). Differentiation of raphide crystal idioblasts in isolated root cultures of *Yucca torreyi* (Agavaceae). *Can J Botany* 62:1474–1484.
- Keil DJ, Stuessy TF (1981). Systematics of *Isocarpha* (Compositae: Eupatorieae). *Syst Bot* 6:258–287.
- Kim KJ, Choi KS, Jansen RK (2005). Two chloroplast dna inversions originated simultaneously during the early evolution of the sunflower family (Asteraceae). *Mol Biol Evol* 22:1783–1792.
- King RM, Robinson H (1966). Generic limitations in the *Hofmeisteria* complex (Compositae-Eupatorieae). *Phytologia* 12:465–476.
- Koroyuk EA (1997). Structure of seed surfaces of the subtribe Asterinae (Asteraceae) from Siberia. *Bot Zh* 82:29–34.
- Korth KL, Doege SJ, Park SH, Goggin FL, Wang Q, Gomez SK, Liu G, Jia L, Nakata PA (2006). *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. *Plant Physiol* 141:188–195.
- Kostman TA, Franceschi VR (2000). Cell and calcium oxalate crystals growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants. *Protoplasma* 214:166–179.
- Krak K, Mráz P (2008). Trichomes in the tribe Lactuceae (Asteraceae) – taxonomic implications. *Biologia* 63:616–630.
- Kryštufek B, Reed JM (2004). Pattern and processes in Balkan biodiversity - an overview. In: Griffiths Hi, Kryštufek B, Reed JM (eds) *Balkan biodiversity, pattern and process in the European hotspot*. Dordrecht: Kluwer, pp 203–217.
- Kubelka W, Kastner U, Glasl S, Saukel J, Jurenitsch J (1999). Chemotaxonomic relevance of sesquiterpenes with the *Achillea millefolium* group. *Biochem Syst Ecol* 27:437–444.
- Kumarasamy Y, Byres M, Cox PJ, Jasapars M, Nahar L, Sarker SD (2007). Screening seeds of some scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytother Res* 21:615–21.



- Kuo-Huang L (1992). Ultrastructural study on the development of crystal-forming sclereids in *Nymphaea tetragona*. *Taiwania* 37:104–113.
- Kuo-Huang LL, Ku MSB, Franceschi VR (2007). Correlations between calcium oxalate crystals and photosynthetic activities in palisade cells of shade-adapted *Peperomia glabella*. *Bot Stud* 48:155–164.
- Kurt A, Ozcan M, Colak N, Ozogul Y, Glew R, Ozogul F, Ayaz FA (2019). Fatty acids of oil and antioxidant capacity of phenolics from fruits of 11 Cardueae (Carduoideae, Asteraceae) taxa from northeast Anatolia (Turkey). *Bot Serb*, 43:31–45.
- Kutnjak D, Schönswetter P, Dullinger S, Kuttner M, Niketić M, Frajman B (2014). Escaping to the summits: phylogeography and predicted range dynamics of *Cerastium dinaricum*, an endangered high mountain plant endemic to the western Balkan Peninsula. *Mol Biol Evol* 78:365–374.
- Lavialle MP (1912). Recherches sur le développement de l'ovaire en fruit chez les Composées. *Ann Sci Nat Bot* 15:39–141.
- Lavialle MP (1912). Recherches sur le développement de l'ovarie en fruit chez les Composées. *Ann Sci nat Sér 9 Bot* 15:39–151.
- Lersten NR, Horner HT (2000). Calcium oxalate crystals types and trends in their distribution patterns in leaves of *Prunus* (Rosaceae: Prunoideae). *Plant Syst Evol* 224:83–96.
- Lewis WH (1980). Polyploidy in angiosperms: dicotyledons. In: Lewis WH (ed) *Polyploidy. Biological Relevance* New York, London: Plenum Press, pp 241–268.
- Li HB, Wong CC, Cheng KW, Chen F (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensm-Wiss Technol* 41:385–390.
- Linczevsky IA (1962) Compositae Tribes Echinopsidae and Cynareae. In: Schischkin BK, Bobrov FG (eds) *Flora of the USSR*. Vol. 27. Akademiya Nauk SSSR. Moscow-Leningrad, pp 74–79.



- Linder CR, Goertzen LR, Heuvel BV, Francisco-Ortega J, Jansen RK (2000). The complete external transcribed spacer of 18S-26S rDNA: Amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in Asteraceae and closely allied families. *Mol Biol Evol* 14:285–303.
- Luković J, Malenčić D, Zorić L, Kodranov M, Karanović D, Kiproviski B, Boža P (2013). Anatomical characteristics and antioxidant ability of *Centaurea sadleriana* reveals an adaptation towards drought tolerance. *Cent Eur J Biol* 8:788–798.
- Lusa MG, Da Costa FB, Appezzato-da-Glória B (2016). Histolocalization of chemotaxonomic markers in Brazilian Vernoniae (Asteraceae). *Bot J Linn Soc* 182:581–593.
- Mabry TJ (1970). Intraspecific variation of sesquiterpene lactones in *Ambrosia* (Compositae): applications to evolutionary problems at the populational level. In: Harborne JB (ed) *Phytochemical Phylogeny* Academic Press, London and New York.
- Makbul S, Coşkunçelebi K, Okur S, Gültepe M (2016). Contribution to the taxonomy of Turkish *Scorzonera* (Asteraceae) taxa based on vegetative anatomy. *Nord J Bot* 34:670–684.
- Manly FJB (1986). *Multivariate statistical methods - a primer*. New York: Chapman and Hall.
- Marengo A, Maxia A, Sanna C, Mandrone M, Berteza CM, Bicchi C, Barbara S, Cecilia C, Rubiolo P (2019). Intra-specific variation in the little-known Mediterranean plant *Ptilostemon casabonae* (L.) Greuter analysed through phytochemical and biomolecular markers. *Phytochemistry* 161:21–27.
- Marin PD, Sajdl V, Kapor S, Tatić B, Petkovic B (1991). Fatty acids of the Saturejoideae, Ajugoideae and Scutellarioideae (Lamiaceae). *Phytochemistry* 30:2979–2982.
- Marin P, Sajdl V, Kapor S, Tatić B (1989a). Fatty acid composition of seeds of the Papaveraceae and Fumariaceae. *Phytochemistry* 28:133–137.





- Marin P, Jančić R, Sajdl V, Kapor S (1989b). Fatty acids of *Mentha* seed lipids. *Phytochemistry* 28:260–262.
- Marin P, Sajdl V, Kapor S, Tatić B, Petković B (1983) Značaj sadržaja i sastava klasa lipida semena u sistematici Papaveraceae i Fumariaceae. *Glasnik Instituta za botaniku i bot. b. Univ. u Beogradu.* 17:103–108.
- Markgraf F (1932). *Pflanzengeographie von Albanien. Ihre bedeutung für vegetation und flora der Mittelmeerländer.* *Bibliotheca Botanica* 26:100–132.
- Marzinek J, De-Paula CO, Oliveira TMD (2008). Cypselas or achenes? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. *Revista Brasil Bot* 31:549–553.
- Matejić J, Džamić A, Mihajilov-Krstev T, Randelović V, Krivošej Z, Marin P (2012). Total phenolic content, flavonoid concentration, antioxidant and antimicrobial activity of methanol extracts from three *Seseli* L. taxa. *Cent Eur J Biol* 7:1116–1122.
- Mattfeld J (1923) Compositae. In: Pilger R (ed) *Plantae Litzelburgianae brasilienses*: 8, *Notizblatt des Botanischen Gartens.* Berlin-Dahlem, pp 425–451.
- Melo-de-Pinna GF (2000). Anatomia dos órgãos vegetativos dos gêneros *Richterago* Kuntze e *Ianthopappus* Roque & D.J.N. Hind (Mutisieae-Asteraceae). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Melo-de-Pinna GF, Menezes NL (2002). Vegetative organ anatomy of *Ianthopappus corymbosus* Roque & Hind (Asteraceae-Mutisieae). *Braz J Bot* 25:505–514.
- Meric C, Dane F (2004). Calcium oxalate crystals in floral organs of *Helianthus annuus* L. and *H. tuberosus* L. (Asteraceae). *Acta Biol Szeged* 48:19–23.
- Meric C (2008). Calcium oxalate crystals in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. and *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. (Asteraceae: Astereae). *Acta Biol Szeged* 52:295–299.
- Meric C. (2009a). Calcium oxalate crystals in some species of the tribe Inuleae (Asteraceae). *Acta Biol Crac Ser Bot* 51:105–110.
- Meric C. (2009b). Calcium oxalate crystals in *Aster squamatus* and *Bellis perennis* (Asteraceae: Astereae). *Phytol Balc* 15:255–259.



- Metcalf CR, Chalk L (1950). *Anatomy of Dicotyledones I*. Clarendon Press. Oxford.
- Metcalf CR, Chalk L (1957). *Anatomy of the Dicotyledons. Vol. 2*. Clarendon Press. Oxford.
- Milan P, Hayashi AH, Appezzato-da-Glória B (2006). Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. *Braz Arch Biol Techn* 49:135–144.
- Miller WH (1839). *A treatise on crystallography*. J. & J. J. Deighton, Cambridge.
- Milosavljević S, Bulatović V, Stefanović M (1999). Sesquiterpene lactones from the Yugoslavian wild growing plant families Asteraceae and Apiaceae. *J Serb Chem Soc* 64:397–442.
- Molano-Flores B (2001). Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Ann Bot-London* 88:387–391.
- Monje PV, Baran EJ (2002). Characterization of calcium oxalates generated as biominerals in cacti. *Plant Physiol* 128:707–713.
- Morris Lj, Marshall MO, Hammond EW (1968). Trans-3-enoic acids of *Aster alpinus* and *Arctium minus* seed oils. *Lipids* 3:91–95.
- Mukherjee SK, Nordenstam B (2008). Diversity of pappus structure in some tribes of the Asteraceae. *Phytotaxonomy* 8:32–46.
- Murbeck S (1891). Beiträge zur Kenntnis der Flora von Südbosnien und der Hercegovina. *Acta Univ Lund* 27:1–182.
- Nahrstedt A, Schwind P (1992). Phenylalanine is the biogenetic precursor of meta-hydroxylated zierin, the aromatic cyanogenic glucoside of unripe akenes of *Xeranthemum cylindraceum*. *Phytochemistry* 31:1997–2001.
- Nakata PA (2003). Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Sci* 164:901–909.
- Nakhutsrishvili G (1999). The vegetation of Georgia (Caucasus). *Braun-Blanquetia*, Vol. 15, pp 1–74.



- Nieto Feliner G (2014). Patterns and processes in plant phylogeography in the Mediterranean Basin. A review. *Perspect Plant Ecol Syst* 16:265–278.
- Niketić M, Tomović G, Melovski L, Stevanović V, Matevski V (2014). New species for the vascular flora of Republic of Macedonia and their distribution in the Balkan Peninsula. *Bot Serb* 38:57–67.
- Nikolić T (2013) *Sistematska botanika. Raznolikost i evolucija biljnog sveta*. ALFA d.d. Zagreb.
- Nikolova M (2011). Screening of radical scavenging activity and polyphenol content of Bulgarian plant species. *Pharmacognosy Res* 3:256–259.
- Nowak G (1993). Chromatography of twenty six sesquiterpene lactones from *Centaurea bella*. *Chromatographia* 35:325–328.
- Nowak G, Dro`d` B, Georgiadis T (1984). Sesquiterpene lactones. XXIX. Cnicin in species of the subgenus *Acrolophus* (Cass.) Dobroc. *Acta Soc Bot Pol* 53:199–205.
- Nowak G, Dro`d` B, Holub M (1996). Sesquiterpene lactones of the Cardueae, subtribe Centaureine. In: Hind DJN, Beentje HJ (eds) *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, (1994), (Hind DJN, Editor-in-chief, vol 1. Royal Botanic Gardens, Kew, pp 219–227.*
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373.
- Oliveira AMA, Santos VLP, Franco CRC, Farago PV, Duarte MR, Budel JM (2011). Comparative morpho-anatomical study of *Baccharis curitybensis* Heering ex Malme and *Baccharis spicata* (Lam.) Baill. *Lat Am J Pharm* 30:1560–1566.
- Omer LS, Moseley Jr MF (1981). The vegetative anatomy of *Jaumea carnosa* (Less.) Gray (Asteraceae), a salt marsh species. *Am J Bot* 68:312–319.
- Orhan IE, Gulyurdu F, Kupeli Akkol E, Senol FS, Arabaci Anul S, Tatli II (2016). Anticholinesterase, antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activity assessment of



- Xeranthemum annuum* L. and isolation of two cyanogenic compounds. *Pharm Biol* 54:2643–2651.
- Ortiz S, Bonifacino MJ, Crisci VJ, Funk AV, Hansen VH, Hind NJD, Katinas L, Roque N, Sancho G, Susanna A, Telleria SM (2009). The basal grade of the Compositae: Mutisieae (sensu Cabrera) and Carduoideae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ (eds) *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. IAPT, Vienna, pp 194–213.
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 34:401–437.
- Ozaydin S, Dirmenci T, Tumen G, Baser KHC (2006). Plants used as analgesic in the folk medicine of Turkey. *Proceedings of the IVth International Congress of Ethnobotany (ICEB 2005)*, pp 1–5.
- Ozcan M, Ayaz FA, Ozogul Y, Glew R, Ozogul F (2016). Fatty acid composition of achenes of *Cirsium* taxa (Asteraceae, Carduoideae) from Turkey. *Z Naturforsch C* 71:45–54.
- Ozcan M (2017). Cypselae micromorphology and anatomy in *Cirsium* sect. *Epitrachys* (Asteraceae, Carduoideae) and its taxonomic implications. *Nord J Bot* 35:653–668.
- Ozcan M, Akinci N (2019). Micromorpho-anatomical fruit characteristics and pappus features of representative Cardueae (Asteraceae) taxa: Their systematic significance. *Flora* 256:16–35.
- Pagni AM, Orlando R, Masini A, Ciccarelli D (2003). Secretory structures of *Santolina ligustica* Arrigoni (Asteraceae), an Italian endemic species. *Isr J Plant Sci* 51:185–192
- Palser B (1975). The bases of angiosperm phylogeny: embryology. *Ann Mo Bot Gard* 62:621–646.
- Pandey AK, Singh RP (1982). Development and structure of seeds and fruits in the Compositae, tribe Senecioneae. *Bot Jahrb Syst* 103:413–422.



- Pătruț DI, Pop A, Coste I (2005). Biodiversitatea halofitelor din Câmpia Banatului. Eurobit, Timișoara.
- Pennisi SV, McConnell DB (2001). Taxonomic relevance of calcium oxalate cuticular deposits in *Dracaena* Vand. ex L. Hortscience 36:1033–1036.
- Pennisi SV, McConnell DB, Gower LB, Kane ME, Lucansky T (2001). Periplasmic cuticular calcium oxalate crystal deposition in *Dracaena sanderiana*. New Phytol 149:209–218.
- Petit DR (1988a). Le genre *Echinops* L. 1. Position phyléique et interprétation de l'incapitulescence. Candollea 43:467–481.
- Petit DP (1997). Generic interrelationships of the Cardueae (Compositae): a cladistic analysis of morphological data. Plant Syst Evol 207:173–203.
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu JL, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Müller-Starck G, Demesure-Musch B, Palme A, Martin JP, Rendell S, Vendramin GG (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. Science 300(5625):1563–1565.
- Petković B, Merkulov Lj, Duletić-Laušević S (2012) Anatomija i morfologija biljaka sa praktikumom. Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet. Beograd.
- Polunin O (1987). Flowers of Greece and the Balkans - a field guide. Oxford: Oxford University Press.
- Powell RG, Smith Jr CR, Wolff IA (1967). cis-5, cis-9, cis-12-octadecatrienoic and some unusual oxygenated acids in *Xeranthemum annuum* seed oil. Lipids 2:172–177.
- Prychid CJ, Rudall PJ (1999). Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. Ann Bot-London 84:725–739.
- Prychid CJ, Furness CA, Rudall PJ (2003). Systematic significance of cell inclusions in Haemodoraceae and allied families: silica bodies and tapetal raphides. Ann Bot-London 92:571–580.



- Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx C, Cazin M, Cazin JC, Bailleul F, Trotin F (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*F. esculentum* Moench) Hulls and Flour. *J Ethnopharmacol* 72:35–42.
- Quézel P (1978). Analysis of the flora of Mediterranean and saharan Africa. *Ann Mo Bot Gard* 65:479–534.
- Radojević ID, Stanković MS, Stefanović OD, Topuzović MD, Čomić LjR (2011). Anti-*Aspergillus* properties of different extracts from selected plants. *Afr J Microbiol Res* 5:3986–3990.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol* 67:901–904.
- Raola VK, Chakraborty K (2017). Biogenic guaianolide-type sesquiterpene lactones with antioxidative and anti-inflammatory properties from natural mangrove hybrid *Rhizophora annamalayana*. *Nat Prod Res* 31:2719–2729.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 26:1231–1237.
- Reisch J, Spitzner W, Schulte KE (1967). Zur Frage der mikrobiologischen wirksamkeit einfacher acetylen verbindungen. *Arzneimittelforsch* 17:816–825.
- Repetto MG, Boveris A (2010). Bioactivity of sesquiterpenes: compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage. *Mini Rev Med Chem* 10:615–623.
- Repetto MG, Llesuy S (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 35:523–534.
- Richards AJ (1986). *Plant breeding systems*. London: George Allen & Unwin.
- Robinson H, Funk VA (1987). A phylogenetic analysis of *Leiboldia*, *Lepidonia*, and a new genus *Stramentopappus* (Vernonieae: Asteraceae). *Bot Jahrb Syst* 108:213–228.



- Robinson H (2009). An introduction to micro-characters of Compositae. In Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ (eds) *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. IAPT, Vienna, pp 89–100.
- Rohlena J (1907). Beitrag zur Flora von Montenegro. *Magyar Botanikai Lapok*, 6, 158.
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539–542.
- Ruzin SE (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, Oxford.
- Sahu TR (1982) Trichome studies in *Parthenium hysterophorus* and their taxonomic importance. *Feddes Repert* 93:437–441.
- Sajjadi SE, Ghanadian M, Haghighi M (2017). Isolation and identification of two phenolic compounds from a moderately cytotoxic fraction of *Cousinia verbascifolia* Bunge. *Adv Biomed Res* 6:66–74.
- Sakamoto HT, Gobbo-Neto L, Cavalheiro AJ, Lopes NP, Lopes JLC (2005). Quantitative HPLC analysis of sesquiterpene lactones and determination of chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). *J Brazil Chem Soc* 16:1396–1401.
- Samek Z, Holub M, Drożdż B, Grabarczyk H, Hładoń B (1977). Xerantholide - A new cytotoxically active sesquiterpenic lactone from *Xeranthemum cylindraceum* Sibth. et Smith. *Collect Czech Chem C* 42:2441–2447.
- Schatz G, Shulkina T, Nakhutsrishvili G, Batsatsashvili K, Tamanyan K, Ali-zade V, Kikodze D, Geltman D, Ekim T (2009). Development of plant red list assessments for the Caucasus biodiversity hotspot. In: Zazanashvili N, Mallon D (eds) *Status and protection of globally threatened species in the Caucasus*. Tbilisi: CEPF, WWF. Contour Ltd, pp 188–192.
- Schmidt-Thomé J (1950). Über die antibakterielle Wirkung der Silberdistelwurzel. *Z Naturforsch B* 5:409–412.



- Schwarz O (1970). Eine bemerkenswerte neue *Amphoricarpos*-Art aus Südwest-Anatolien. *Phyton* 14:125–133.
- Schwind P, Wray V, Nahrstedt A (1990). Structure elucidation of an acylated cyanogenic triglycoside, and further cyanogenic constituents from *Xeranthemum cylindraceum*. *Phytochemistry* 29:1903–1911.
- Scotti MT, Emerenciano V, Ferreira MJ, Scotti L, Stefani R, da Silva MS, Junior FJBM (2012). Self-organizing maps of molecular descriptors for sesquiterpene lactones and their application to the chemotaxonomy of the Asteraceae family. *Molecules* 17:4684–4702.
- Sears PB (1922). Variations in cytology and gross morphology of *Taraxacum*. II. Senescence, rejuvenescence, and leaf variation in *Taraxacum*. *Bot Gaz* 73:425–446.
- Serkerov SV, Tairov IT (1978). A triterpene alcohol from *Xeranthemum cylindraceum*. *Chem Nat Compd* 14:696–696.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JB, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small R (2005). The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92:142–166.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *Am J Bot* 94:275–288.
- Shaw J, Shafer HL, Leonard OR, Kovach MJ, Schorr M, Morris AB (2014). Chloroplast DNA sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in angiosperms: The tortoise and the hare IV. *Am J Bot* 101:1987–2004.
- Shetekauri S, Kutateladze L (2017). Diversity, ecotopology and hypsometric distribution of the endemic flora in high-mountain phytolandscapes of the Caucasus. *Earth* 6:38–48.
- Shishkin BK, Bobrov EG (1997). *Flora of the USSR*. Dehra Dun: Bishen Singh Mahendra Pal Singh and Koeltz Scientific Books.





- Shorland FB (1963). The distribution of fatty acids in plant lipids. In: Swain T (ed) Chemical Plant Taxonomy. Academic Press, New York, pp 253–311.
- Sidhu MC, Saini P (2011). Anatomical investigations in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. J Res Biol 8:603–608.
- Smets E. (1986). Localization and systematic importance of the floral nectaries in the Magnoliatae (Dicotyledones). Bull Jard Bot Belg 56:51–76.
- Sulborska A. (2011). Micromorphology of flowers, anatomy and ultrastructure of *Chamomilla recutita* (Asteraceae) nectary. Acta Agrobot 64:23–34.
- Šilić Č (1990). Endemične biljke, SP „Svijetlost“, Sarajevo, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Šilić Č (2006). Botanička bašta planinske flore Crne Gore Kolašin (Dulovine), Agencija Valjevac, Valjevo.
- Singh RP, Pandey AK (1984). Development and structure of seeds and fruits in Compositae - Cynareae. Phytomorphology 34:1–10.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent oxidants and antioxidants. Method Enzymol 299:152–78.
- Skaltsa HD, Lazari DM, Constantinidis T (2000). Composition of the essential oil of *Xeranthemum annuum* L. from Greece. J Essent Oil Res 12:742–744.
- Small J (1919). The origin and development of the Compositae. New Phytol 18:129–176.
- Sokovic M, Ciric A, Glamoclija J, Skaltsa H (2017). Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from the genus *Centaurea* L. (Asteraceae). Curr Pharm Design 23:2767–2786.
- Spencer GF, Kleiman R, Earle FR, Wolff IA (1969). Cis-5-monoenoic fatty acids of *Carlina* (Compositae) seed oils. Lipids 4:99–101.



- Spring O, Benz T, Ilg M (1989). Sesquiterpene lactones of the capitate glandular trichomes of *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* 28:745–749.
- Spring O, Zipper R, Reeb S, Vogler B, Da Costa FB (2001). Sesquiterpene lactones and a myoinositol from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry* 57:267–272.
- Spring O (1991). Trichome microsampling of sesquiterpene lactones for the use of systematic studies. *Recent Adv Phytochem* 25:319–345.
- Spring O (2000). Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. *Adv Bot Res* 31:153–174.
- Stanković MS, Radojević ID, Stefanović OD, Topuzović MD, Čomić LR, Branković SR (2011). Immortelle (*Xeranthemum annuum* L.) as a natural source of biologically active substances. *EXCLI J* 10: 230–239.
- Stebbins GL (1971). *Chromosomal evolution in Higher Plants*. London: Arnold Pub.
- Stebbins GL (1953). A new classification of the tribe Cichoriae, family Compositae. *Madroño* 12:65–81.
- Stenglein SA, Arambarri AM, Menendez Sevillano MC, Balatti PA (2005). Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens vary among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Leguminosae–Phaseoleae). *Flora* 200:285–295.
- Stevanović V (1996). Analysis of the central European and Mediterranean orophytic element on the mountains of the w. and central Balkan Peninsula, with special reference to endemics. *Bocconea* 5:77–97.
- Stevanović V, Kit T, Petrova A (2007). Mapping the endemic flora of the Balkans - a progress report. *Bocconea* 21:131–137.
- Strid A, Tan K (1991). *Mountain flora of Greece, vol. 2*. Edinburgh: Edinburgh University Press.



- Stuessy TF (2009). Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data. Columbia Univ. Press. New York.
- Sundberg S (1985). Micromorphological characters as generic markers in the Asteraceae. *Taxon* 34:31–37.
- Surina B, Pfanzelt S, Einzmann HJR, Albach DC (2014). Bridging the Alps and the Middle East: evolution, phylogeny and systematics of the genus *Wulfenia* (Plantaginaceae). *Taxon* 63:843–858.
- Surina B, Schönswetter P, Schneeweiss GM (2011). Quaternary range dynamics of ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, Campanulaceae) within the Balkan refugium. *J Biogeogr* 38:1381–1393.
- Susanna A, Garcia-Jacas N, Hidalgo O, Vilatersana R, Garnatje T (2006). The Cardueae (Compositae) revisited: insights from ITS, *trnL-trnF*, and *matK* nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann Mo Bot Gard* 93:150–171.
- Susanna A, Garcia-Jacas N (2007). Tribe Cardueae. In: Kadereit JW, Jeffrey C (eds) *The Families and Genera of Vascular Plant*, vol. 8, Flowering Plants. Eudicots. Asterales. Springer, Berlin, pp 123–146
- Susanna A, Garcia-Jacas N (2009). Cardueae (Carduoideae). In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ (eds) *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. IAPT, Vienna, pp 293–313.
- Susanna A, Galbany-Casals M, Romashchenko K, Barres L, Martín J, Garcia-Jacas N (2011). Lessons from *Plectocephalus* (Compositae, Cardueae-Centaureinae): ITS disorientation in annuals and Beringian dispersal as revealed by molecular analyses. *Ann Bot-London* 108:263–277.
- Takhtajan A (1986). *Floristic regions of the world*. University of California Press, Berkeley, California, USA.
- Taleb-Contini HS, Schorr K, Da Costa BF, Camilo D, de Oliveira R (2007). Detection of flavonoids in glandular trichomes of *Chromolaena* species (Eupatorieae, Asteraceae) by



- reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Braz J Pharm Sci* 43:315–321.
- Tekao T, Watanabe N, Yagi I, Sakata K (1994). A simple screening method for antioxidant and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:1780–3.
- Tel-Zur, N., Abbo, S., Mysladbodksi, D. & Mizrahi, Y. (1999). Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (*Cactaceae*). *Plant Biology Biological Reporter* 17: 249–254.
- Thiers B (2019). Index Herbariorum: A Global Directory of Public Herbaria and Associated Staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/> (pristupljeno u avgustu 2019).
- Thompson DL, Jellum MD, Young CT (1973). Effect of controlled temperature environments on oil content and on fatty acid composition of corn oil. *J Am Oil Chem Soc* 50:540–542.
- Tilton VR, Horner Jr HT (1980). Calcium oxalate raphide crystals and crystalliferous idioblasts in the carpels of *Ornithogalum caudatum*. *Ann Bot-London* 46:533–539.
- Torrell M, Vallès J (2001). Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary and ecological implications. *Genome* 44:231–238.
- Tremolieres A, Dubacq JP, Drapier D (1982). Unsaturated fatty acids in maturing seeds of sunflower and rape: regulation by temperature and light intensity. *Phytochemistry* 21:41–45.
- Tsevegsüren N, Aitzetmüller K, Vosmann K (1997). Unusual fatty acids in Compositae:  $\gamma$ -linolenic acid in *Saussurea* spp. seed oils. *J High Res Chromatog* 20:315–320.
- Tsevegsüren N, Aitzetmüller K, Brühl L, Werner G (2000). Seed oil fatty acids of Mongolian Compositae: the trans-fatty acids of *Heteropappus hispidus*, *Asterothamnus centrali-asiaticus* and *Artemisia palustris*. *J High Res Chromatog* 23:360–366.



- Turrill WB (1929). The plant life of the Balkan peninsula: a phytogeographical study. Oxford: Clarendon.
- Tuzlaci E, Dogan A (2010). Turkish folk medicinal plants, IX: ovacik (Tunceli). Marmara Pharm J 14:136–143.
- Uzunova K, Bancheva S, Raimondo FM (2007). Studies on the leaf epidermal structure of genus *Cyanus*, sect. *Napuliferae* (Compositae). Bocconea 21:249–256.
- Vallejo JR, Pardo de Santayana M, Peral D, Carrasco MC, López D (2008). Uso medicinal de *Atractylis gummifera* L. en Guadiana del Caudillo (Badajoz, Espana). Toxicidad y especies afines. Rev Fitoterapia 8:161–169.
- Vallejo JR, Peral D, Gemio P, Carrasco MC, Heinrich M, Pardo de Santayana M (2009). *Atractylis gummifera* and *Centaurea ornata* in the province of Badajoz (Extremadura, Spain). Ethnopharmacological importance and toxicological risk. J Ethnopharmacol 126:366–370.
- Vanderhoeven S, Hardy O, Vekemans X, Lefebvre C, Loose de M, Lambinon J, Meerts P (2002). A morphometric study of populations of the *Centaurea jacea* complex (Asteraceae) in Belgium. Plant Biol 4:403–412.
- Vanhaelen-Fastre R (1972). Antibiotic and cytotoxic activity of cnicin isolated from *Cnicus benedictus* L. J Pharm Belg 27:683–688.
- Vignais PV, Vignais PM, Stanislas E (1962). Action of potassium atractylate on oxidative phosphorylation in mitochondria and in submitochondrial particles. Biochim Biophys Acta 60:284–300.
- Visiani R (1844). De un nuovo genere della tribù delle Xerantemee. Giorn Bot Ital 1:194–199.
- Visiani R (1842). Flora Dalmatica. Vol. I. Lipsiae
- Visiani R (1847). Flora Dalmatica. Vol. II. Lipsiae.
- Visiani R (1852). Flora Dalmatica. Vol. III. Lipsiae.



- Vogl-Lukasser B, Vogl CR (2004). Ethnobotanical research in homegardens of small farmers in the alpine region of Osttirol (Austria): An example for bridges built and building bridges. *Ethnobot Res Appl* 2:111–37.
- Volcani BE (1983). Aspects of silicification in biological systems. In: Westbroeck P, De Jong EW (eds) *Biomineralization and Biological Metal Accumulation*. D. Reidel Publishing Co., Dordrecht, The Netherlands, pp 389–405.
- Volk GM, Lynch-Holm VJ, Kostman TA, Goss LJ, Franceschi VR (2002). The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biol* 4:34–45.
- Volovnik SV (2016). On oviposition in weevils of the genus *Larinus* Dej. (Coleoptera, Curculionidae). *Entomol Rev* 96:309–317.
- Vučković I, Vujisić L, Vajs V, Tešević V, Macura S, Janačković P, Milosavljević S (2006). Sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Anthemis arvensis* L. *Biochem Syst Ecol* 34:303–309.
- Wagenitz G (1976). Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae). *Plant Syst Evol* 125:29–46.
- Wagner H (1977). Cynareae chemical review. *Biology and Chemistry of the Compositae*.
- Wang YJ, Raab-Straube E, Susanna A, Liu JQ (2013). *Shangwua* (Compositae), a new genus from the Qinghai-Tibetan Plateau and Himalayas. *Taxon* 62:984–996.
- Watson R, Preedy VR (2008). *Botanical medicine in clinical practice*. Trowbridge, UK: CAB International.
- Webb DA (1972). *Amphoricarpos* Vis. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) *Flora Europaea*, vol. 4. University Press, Cambridge, MA, p 208.
- Webb DA (1976). *Amphoricarpos* Vis. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) *Flora Europaea*, vol. 4,



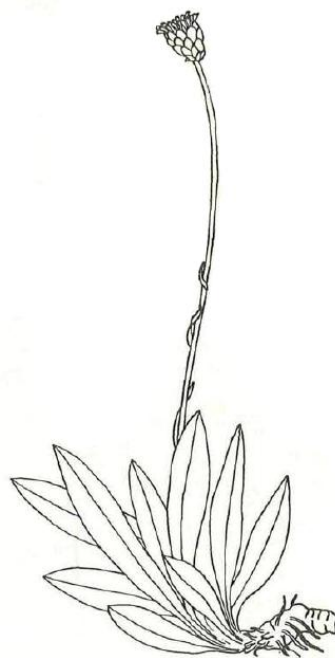
- Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae). Cambridge: Cambridge University Press, p 243.
- Weising K, Gardner R (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genoma* 42:9–19.
- Wendel JF (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol* 42:225–249.
- Werker E, Fahn A (1981). Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait. – development, ultrastructure, and secretion. *Bot Gaz* 142:461–476.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand D, Sninsky J, White T (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press: San Diego, pp 315–322.
- Wiley N (2016). *Environmental Plant Physiology*. New York, USA: Garland Science.
- Williams BC (1947). The structure of the meristematic root tip and origin of the primary tissues in the roots of vascular plants. *Am J Bot* 34:455–462.
- Williams BC (1954). Observations on intercellular canals in root tips with special reference to the Compositae. *Am J Bot* 41:104–106.
- Wu CC, Kuo-Huang LL (1997). Calcium crystals in the leaves of some species of Moraceae. *Bot Bull Acad Sinica* 38:97–104.
- Wurdack JJ (1986). Atlas of hairs for neotropical Melastomataceae. *Smithsonian Contrib. Bot.* 63:1–80.
- Zabka M, Pavela R, Gabrielova-Slezakova L (2011). Promising antifungal effect of some Euro-Asiatic plants against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *J Sci Food Agr* 91:492–497.
- Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E, Billups K (2001). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292:686–693.



- Zarembo EV, Boyko EV (2008). Carpology of some east Asian Cardueae (Asteraceae). *Anales Jard Bot Madrid* 65:129–134.
- Zemtsova GN, Molchanova LP (1979). Flavonoids and triterpenoids of *Xeranthemum annuum*. *Chem Nat Compd* 15:762–762.
- Zhu SX, Qin HN, Shih C (2006). Achene wall anatomy and surface sculpturing of *Lactuca* L. and related genera (Compositae: Lactuceae) with notes on their systematic significance. *J Integr Plant Biol* 48:390–399.
- Zoldos V, Papes D, Brown SC, Panaud O, Siljak-Yakovlev S (1998). Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. *Genome* 41:162–168.



Ilustracija *Amphoricarpos autariatus* Blečić et Mayer: Habitus, Blečić i Mayer (1967). Die europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos* VISIANI. Phytion, 12, 150-158

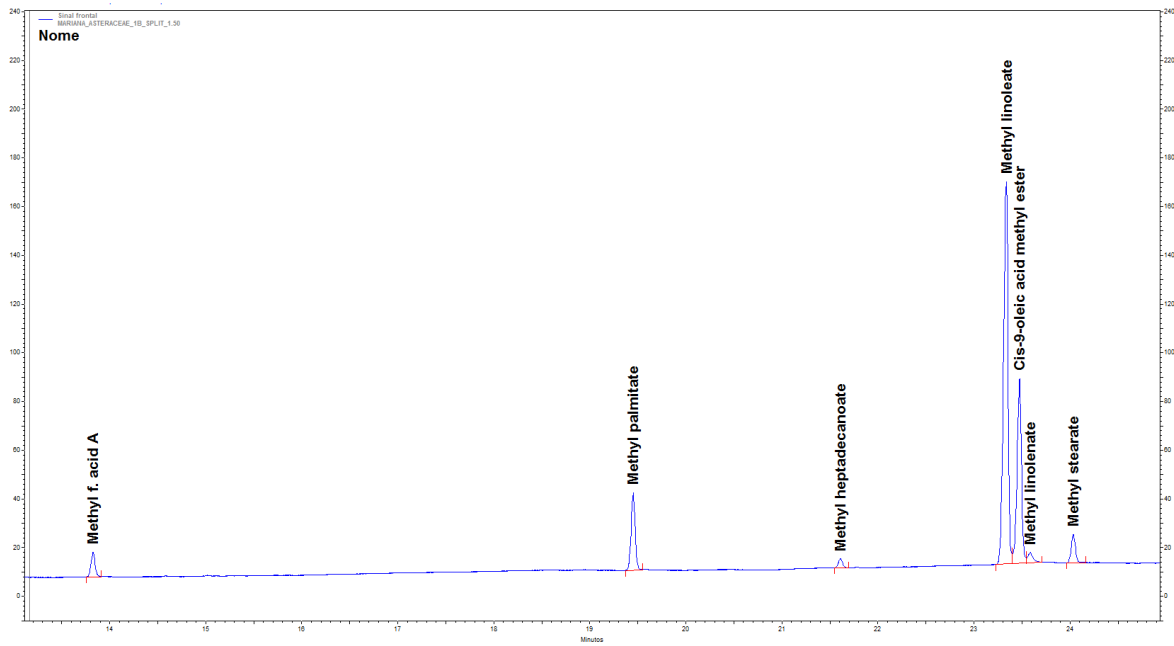


## 8 PRILOZI



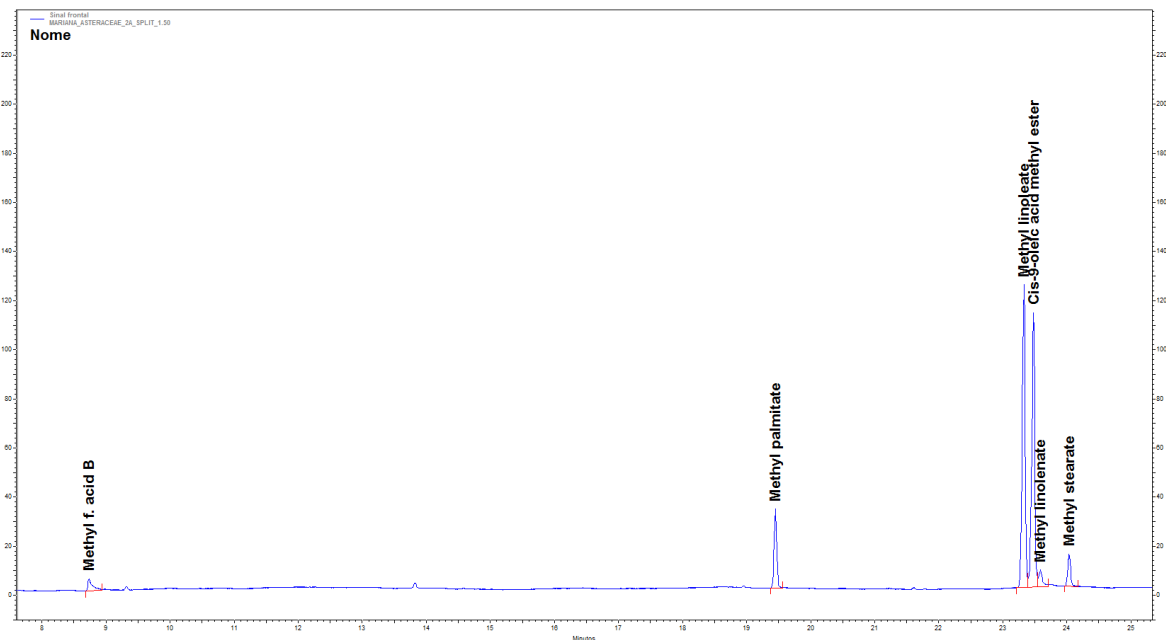
## 8. PRILOZI

Prilog 1. GC-FID hromatogram profila masnih kiselina iz obodnih cipsela taksona *Amphoricarpos neumayerianus* subsp. *neumayerianus*



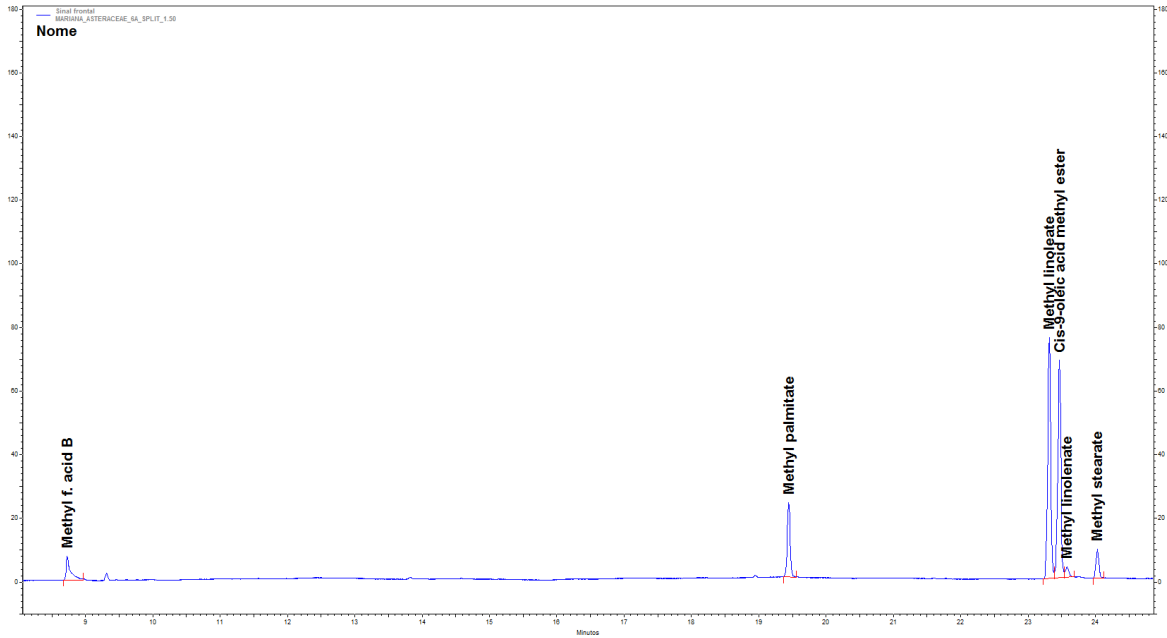


Prilog 2. GC-FID hromatogram profila masnih kiselina iz centralnih cipsela taksona *A. neumayerianus* subsp. *neumayerianus*



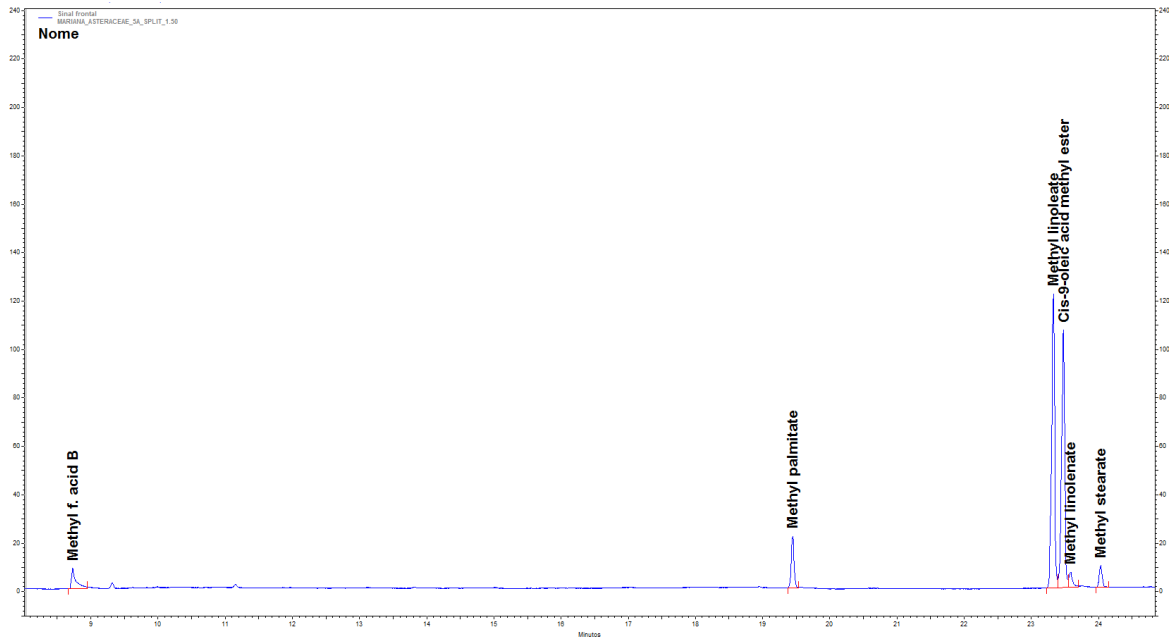


Prilog 3. GC-FID hromatogram profila masnih kiselina iz obodnih cipsela taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*



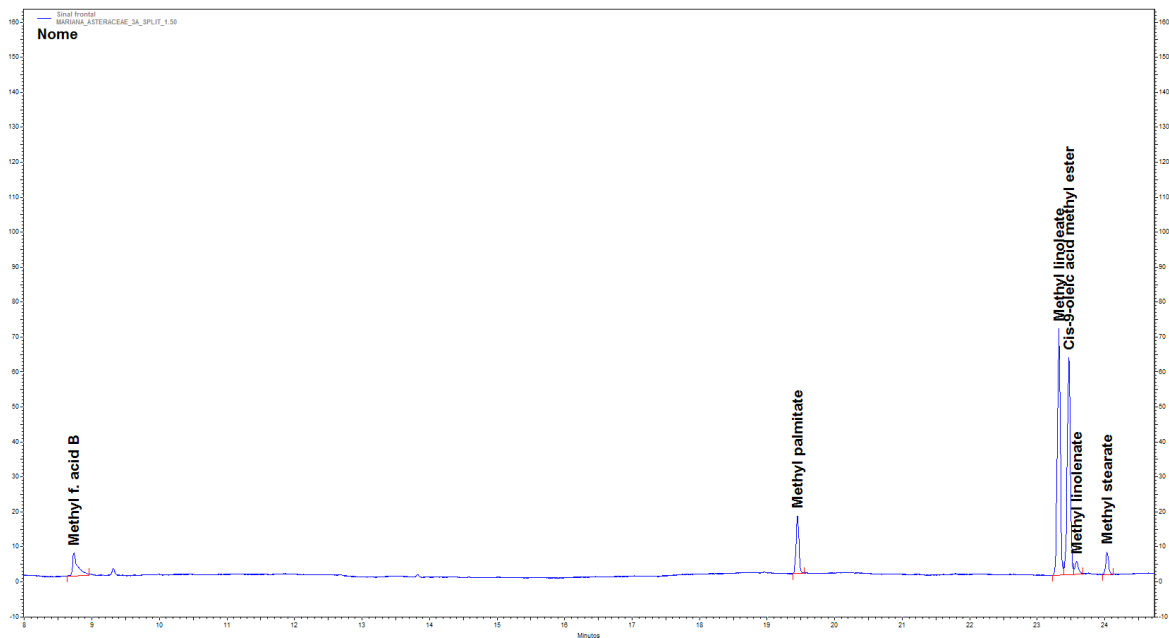


Prilog 4. GC-FID hromatogram profila masnih kiselina iz centralnih cipsela taksona *A. neumayerianus* subsp. *murbeckii*



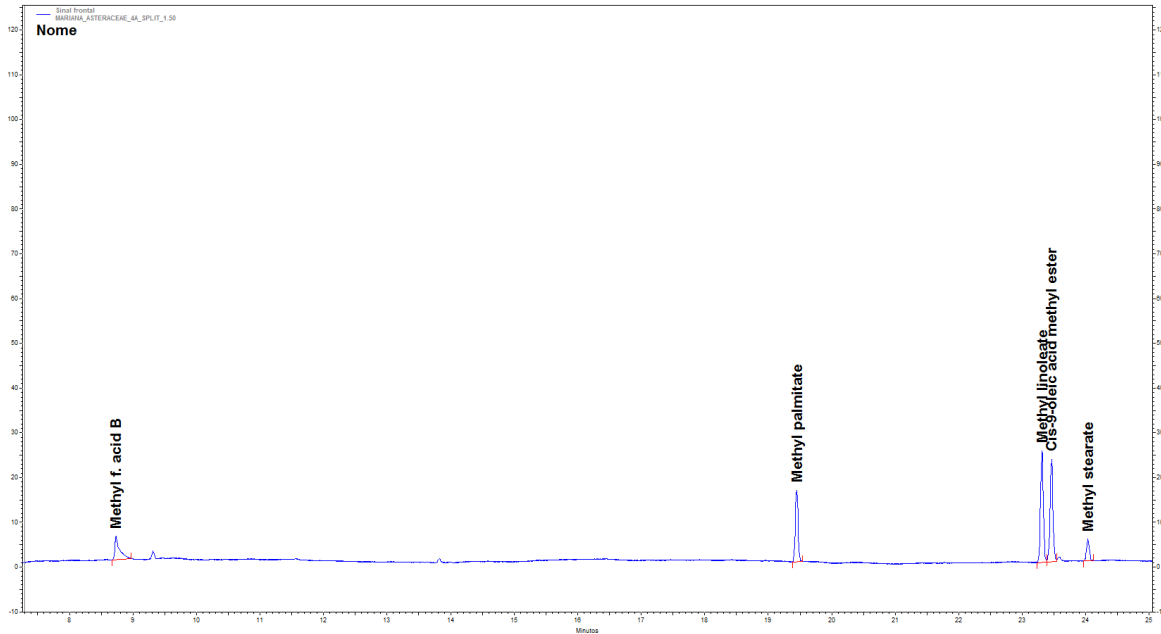


Prilog 5. GC-FID hromatogram profila masnih kiselina iz obodnih cipsela taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus*



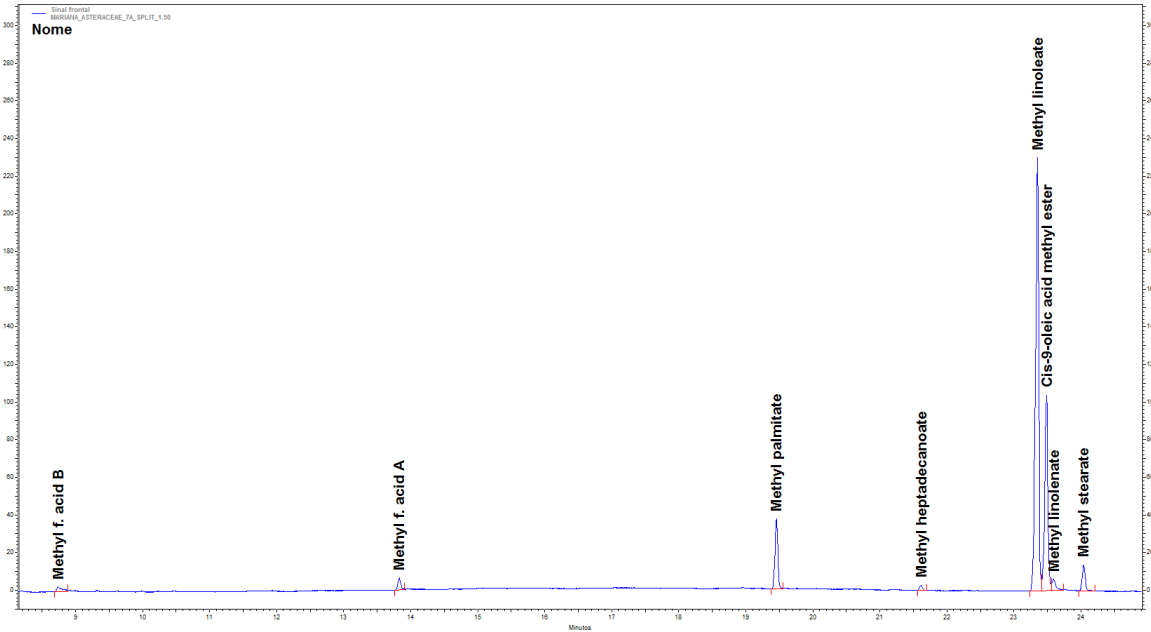


Prilog 6. GC-FID hromatogram profila masnih kiselina iz centralnih cipsela taksona *A. autariatus* subsp. *bertisceus*





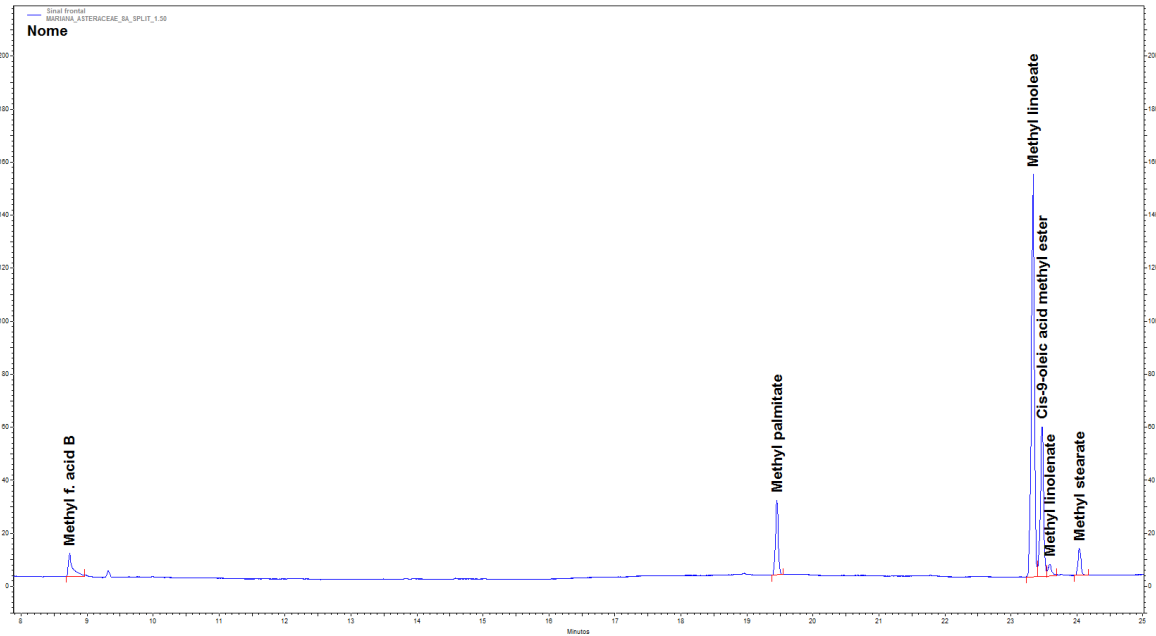
Prilog 7. GC-FID hromatogram profila masnih kiselina iz obodnih cipsela taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus*





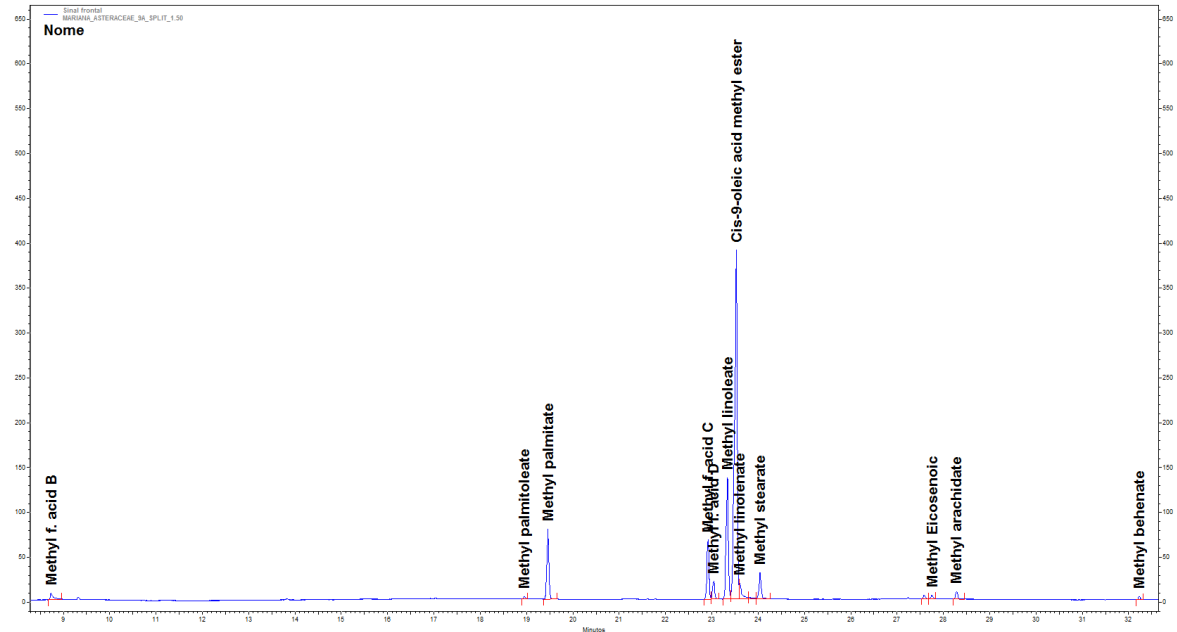


Prilog 8. GC-FID hromatogram profila masnih kiselina iz centralnih cipsela taksona *A. autariatus* subsp. *autariatus*



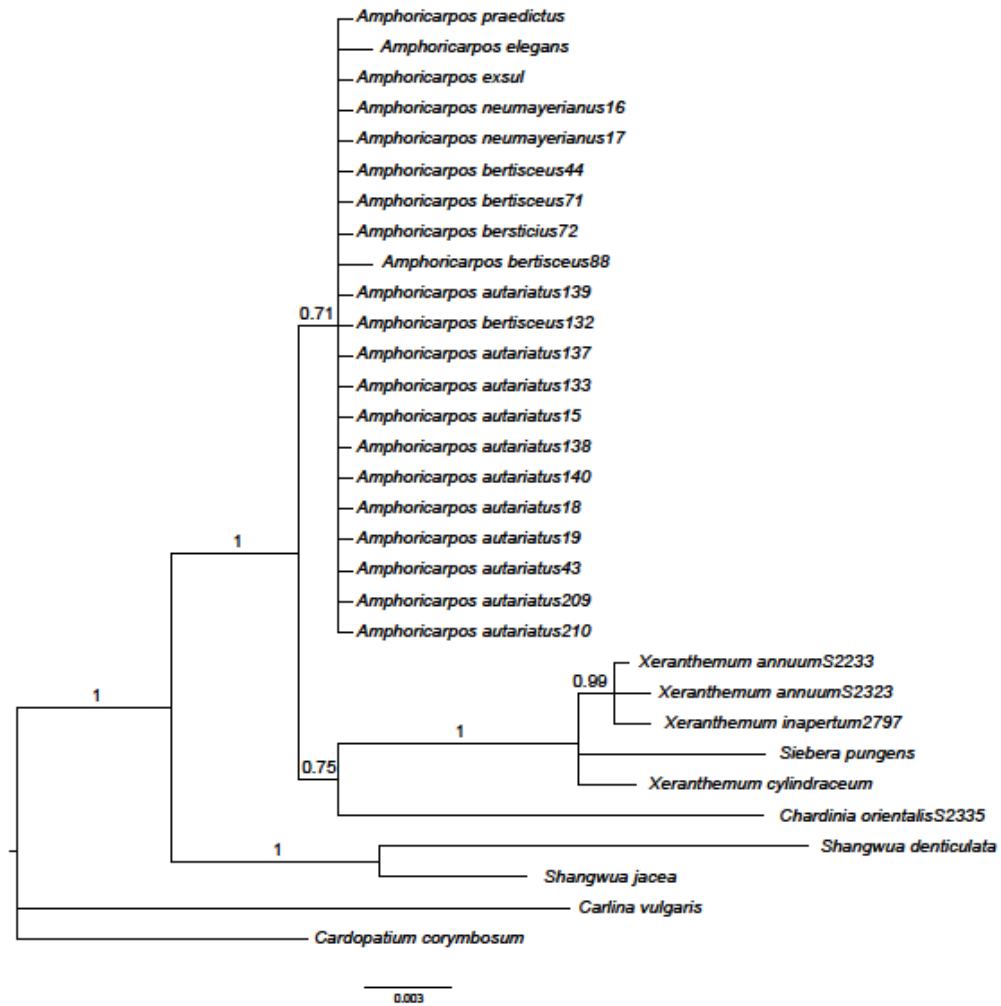


Prilog 9. GC-FID hromatogram profila masnih kiselina iz cipsela vrste *Xeranthemum cylindraceum*





Prilog 10. Filogenetsko stablo *Xeranthemum* grupe na osnovu plastidnog markera (*trnS*).



## BIOGRAFIJA

Milan Gavrilović rođen je 14.07.1989. godine u Zrenjaninu gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Nosioc je Vukove diplome za osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2008/2009. godine, a završio 2012. godine sa prosečnom ocenom 9.47. Master akademske studije na istom fakultetu (modul Eksperimentalna i primenjena botanika) upisao je školske 2012/2013. i završio 2013. godine sa prosečnom ocenom 10, odbranivši master rad pod nazivom "Mikromorfologija i sastav masnih kiselina cipsela vrsta roda *Amphoricarpus* Vis." sa ocenom 10. Doktorske akademske studije (isti modul) upisao je školske 2013/2014. Bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Bio je učesnik istraživačkih akcija BID „Josif Pančić”, boravio je na studentskoj praksi u Nemačkoj i Brazilu i bio na usavršavanju u Instituto Botánico de Barcelona u Španiji. Od 2015. godine zaposlen je na matičnom fakultetu na Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka (projekat 173029), gde je od početka angažovan u nastavi na većini predmeta (Istorija botanike, Sistematika i filogenija biljaka, Fitohemijiski praktikum, itd.). Koautor je Fitohemijiskog praktikuma (2017) za istoimeni predmet. Bio je član komisije za odbranu pet master i dva diplomatska rada na matičnom fakultetu. Stručni je vodič u Botaničkoj bašti "Jevremovac". Zamenik je potpredsednika u Udruženju građanja „Kormilo“ Zrenjanin. Stručni je saradnik Istraživačke stanice Petnica. Član je Srpskog biološkog društva. Učestvovao je na projektu „Noć istraživača“. Govori engleski jezik i koristi standardne računarske programe. Rezultate svog dosadašnjeg naučnog rada objavio je u 11 radova u časopisima međunarodnog i nacionalnog značaja, kao i u 26 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Милан М. Гавриловић**

Број индекса **Б3057/2013**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Таксономија и филогенија *Xeranthemum* групе (Asteraceae) – морфолошки, анатомски, фитохемијски и молекуларни аспекти**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 28.08.2019.

---

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског  
рада**

Име и презиме аутора **Милан М. Гавриловић**

Број индекса **Б3057/2013**

Студијски програм **Експериментална и примењена ботаника**

Наслов рада **Таксономија и филогенија *Xeranthemum* групе (Asteraceae) – морфолошки, анатомски, фитохемијски и молекуларни аспекти**

Ментор **Проф. др Пеђа Јанаћковић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 28.08.2019.

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Таксономија и филогенија *Xeranthemum* групе (Asteraceae) – морфолошки, анатомски, фитохемијски и молекуларни аспекти**

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

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

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

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 28.08.2019.

---

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

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

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

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

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

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.