

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET



Tatjana Lj. Sekulić

**Ontogenetska, specijska i generička  
karakterizacija odbrambenih supstanci  
kod nekih predstavnika familije  
Julidae Leach, 1814 (Myriapoda,  
Diplopoda, Julida) iz Srbije**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY



Tatjana Lj. Sekulić

**Ontogenetic, species and generic  
characterization of defensive substances  
in some representatives of family  
Julidae Leach, 1814 (Myriapoda,  
Diplopoda, Julida) from Serbia**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2014.

**Mentor:** Dr. Slobodan Makarov, redovni profesor  
Biološkog Fakulteta Univerziteta u  
Beogradu

**Članovi komisije:** Dr. Slobodan Makarov, redovni profesor  
Biološkog Fakulteta Univerziteta u  
Beogradu

Dr. Božidar Ćurčić, redovni profesor  
Biološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr. Vladimir Tomić, vanredni profesor  
Biološkog Fakulteta Univerziteta u  
Beogradu

Dr. Slobodan Milosavljević, profesor  
emeritus Hemijskog Fakulteta Univerziteta  
u Beogradu i dopisni član SANU

Dr. Vesna Lačković, redovni profesor  
Medicinskog Fakulteta Univerziteta u  
Beogradu

**Datum odbrane doktorske disertacije:**

*Koristim ovu priliku kako bih se zahvalila svom mentoru dr Slobodanu Makarovu, na velikoj pomoći i izvanrednoj saradnji tokom izrade ove doktorske disertacije. Njegovo iskustvo i znanje su mi u najvećoj meri doprineli i omogućili savladavanje svakog koraka tokom čitavih doktorskih studija, a posebno u pisanju i izradi teze.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Božidaru Ćurčiću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u razjašnjavanju kompleksnih problema koji su se javljali tokom izrade ove teze. Zahvaljujem se dr Slobodanu Milosavljeviću, profesoru emeritusu Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dopisnom članu SANU, čiji su precizni komentari i ispravke u mnogome učinili moju doktorsku disertaciju kvalitetnijom. Veliki doprinos u sagledavanju analizirane problematike i donošenju konačnih zaključaka doprineli su dr Vesna Lačković, redovan profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Vladimir Tomić, vanredan profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem kolegi sa Hemijskog fakulteta dr Ljubodragu Vujisiću, čija su strpljivost, znanje i posvećenost radu zadivljujuće, i koji mi je svojim brojnim idejama i sugestijama pomogao u izradi disertacije.*

*Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za dinamiku razvića životinja Instituta za Zoologiju Biološkog fakulteta dr Luki Lučiću, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dr Bojanu Mitiću, docentu Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, asistentu mr Borisu Dudiću i studentima doktorskih studija Bojanu Iliću i Draganu Antiću, na pomoći prilikom sakupljanja i determinacije materijala, disekcija i izradi fotografija, a ujedno i na njihovoj nesebičnoj i iskrenoj pomoći, kao i brojnim savetima tokom doktorskih studija.*

*Veliko hvala i kolegama sa Visoke tehničke škole strukovnih studija u Požarevcu: dr Vladanu Đulakoviću, mr Zvonimiru Mitiću, mr Draganu Šaleru i Milanu Grujiću, na razumevanju i izvanrednoj saradnji.*

*Na kraju bih istakla da najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima i sestri, koji su mi tokom života pružali samo bezgraničnu ljubav i podršku u svim zacrtanim ciljevima i naučili me poštovanju pravih i iskrenih životnih vrednosti.*

# **Ontogenetska, specijska i generička karakterizacija odbrambenih supstanci kod nekih predstavnika familije Julidae Leach, 1814 (Myriapoda, Diplopoda, Julida) iz Srbije**

Rezime:

Predstavnici reda Julida poseduju hemijsku odbranu od predatora, koji uključuje raznovrsne hinonske derivate, ali i brojne nehinonske komponente. Do danas je analiziran mali broj vrsta u odnosu na ukupan broj julidnih diplopoda. Stoga je ovom tezom bila obuhvaćena analiza odbrambenog sekreta kod sedam vrsta iz familije Julidae: *Unciger transsilvanicus*, *Pachyiulus hungaricus*, *Typhloiulus nevoi*, *T. serborum*, *Serboiulus kresnik*, *S. lucifugus*, *S. deelemani*, kao i dve vrste iz familije Blaniulidae: *Nopoiulus kochii* i *Cibiniulus phlepsii*. Takođe je urađena i ontogenetska karakterizacija odbrambenog sekreta vrste *Cylindroiulus boleti* iz familije Julidae, odnosno identifikacija sastava sekreta različitih postembrionalnih stupnjeva pomenute vrste (od III do XI stupnja).

Ciljevi istraživanja su se prevashodno odnosili na preciznu identifikaciju sastava odbrambenog sekreta navedenih vrsta, odnosno karakterizaciju hinonskih i nehinonskih komponenti u odbrambenom sekretu, a poseban akcenat je stavljen na utvrđivanje prisustva/odsustva intraspecijske, interspecijske, intrageneričke i intergeneričke razlike u sastavu alomona kod julidnih taksona u cilju utvrđivanja mogućih parametara za hemotaksonomsku karakterizaciju, odnosno definisanja alomonskog hemoprofila svakog taksona ponaosob. Savremena instrumentalna metoda korišćena za identifikaciju odbrambenih supstanci korišćena u ovoj tezi bila je gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC-MS). Za određivanje strukture najzastupljenijih komponenti odbrambenih sekreta korišćene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija, zajedno i sa višepulsnim 2D tehnikama kao što su, COSY, NOESY, DOSY, DEPT HSQC i HMBC. Metilen-hlorid je korišćen kao rastvarač prilikom pripreme uzoraka za GC-MS tehniku.

Hemijskim analizama odabranih vrsta stonoga iz familija Julidae i Blaniulidae okarakterisano je ukupno 26 jedinjenja. Od toga su identifikovana 23 različita hinonska derivata: 1,4-benzohinon (**1**), 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon

(7), hidrohinon (8), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (10), 2-metilhidrohinon (11), 2,3-dimetoksihidrohinon (12), etil-metil-1,4-benzohinon (13), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (14), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (16), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (17), 2,3-dimetilhidrohinon (18), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (19), 2-etilhidrohinon (20), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (21), 2,3,5,6-tetrametilhidrohinon (22), 2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (23), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (24), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (25) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (26), i tri jedinjenja u okviru krezolne komponente sekreta: *p*-krezol (5), fenol (3) i *p*-etilfenol (9).

Analizama je potvrđeno i prisustvo nehinonskih jedinjenja u odbrambenom sekretu, ali je njihova procentna zastupljenost u ukupnom sastavu sekreta generalno manja od zastupljenosti hinonske komponente i uglavnom su bila predstavljena heksil- i izopentil-estrima zasićenih i nezasićenih C<sub>14</sub>–C<sub>20</sub> kiselina.

Kod svih analiziranih vrsta, kako epigejskih, tako i kavernikolnih, registrovani su 2-metil-1,4-benzohinon (2), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (4), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7) i 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15) (izuzetak je vrsta *S. deelemani* kod koje nije identifikovano jedinjenje 4). U odbrambenom sekretu epigejskih vrsta jedinjenja 2-metil-1,4-benzohinon (2) i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7) su predstavljala dominantnu komponentu sekreta, dok je kod kavernikolnih predstavnika to bio bio hinon 2-etil-1,4-benzohinon (6). Kod analiziranih postembrionalnih stadijuma vrste *C. boleti* dominantu frakciju odbrambenog sekreta od stadijuma IV činilo je jedinjenje 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7). Krezolna jedinjenja izolovana su iz sekreta jedino kod tri julidna taksona: *U. transsilvanicus*, *S. deelemani* i *T. serborum*.

Hidrohinon (8) je izolovan jedino iz sekreta vrsta *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus*, i ovo je ujedno prva identifikacija ovog hinona kod predstavnika reda Julida. 2-Metoksi-3-metilhidrohinon (17) registrovan je jedino kod epigejske vrste *P. hungaricus*, dok je jedinjenje 2-metoksi-5-metilhidrohinon (16) identifikovano kod jedne vrste iz familije Blaniulidae (*C. phlepsii*), ali i kod vrste *S. kresnik*, kao i kod adultnih stadijuma vrste *C. boleti*. Ovaj hinon do sada nije nađen kod predstavnika redova Spirobolida i Spirostreptida, tako da se za sada može posmatrati kao hemotaksonomski marker julidnih vrsta. 2,3,5,6-Tetrametilhidrohinon (22) izolovan je

jedino iz sekreta vrste *T. serborum*, a ovo je ujedno i nova komponenta, po prvi put potvrđena u sastavu odbrambenog sekreta kod diplopoda. 2,3-Dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (**24**) identifikovan je jedino kod vrste *S. kresnik*. U okviru nehinonske komponente vrste *U. transsilvanicus* po prvi put je identifikovan izopentil-heksakozatetranoat i izopentil-estri zasićenih i nezasićenih masnih kiselina C<sub>14</sub> - C<sub>20</sub>. Kod blanjulidnih vrsta nije identifikovana krezolna komponenta sekreta.

Ovom tezom potvrđena je hinonska konzistentnost juliformnih diplopoda u pogledu sastava odbrambenog sekreta, odnosno homogenost pre svega među dominantim komponentama sekreta. Međutim, svaka analizirana vrsta u ovoj tezi pokazuje svoj specifičan hinonski hemoprofil koji ni jednom slučaju nije bio identičan, pri čemu su minorne hinonske komponente odbrambenog sekreta bile pokazatelj specijskih i generičkih razlika. Dobijeni rezultati ukazuju i na mogućnost da nehinonske komponente odbrambenog sekreta mogu poslužiti kao potencijalni hemotaksonomski marker.

**Ključne reči:** Diplopoda, semiohemikalije, odbrambeni sekret, alomoni, Julidae, GC-MS, hinonski derivati, nehinonski derivati, krezolna jedinjenja

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Biologija razvića životinja

**UDK:** 591. 572. 5: 595. 61 (497. 11) (043. 3)

# **Ontogenetic, species and generic characterization of defensive substances in some representatives of family Julidae Leach, 1814 (Myriapoda, Diplopoda, Julida) from Serbia**

Abstract:

Representatives of the order Julida secrete a large number of both quinone and non-quinone compounds. So far only a small number of species have been analyzed in relation to the total number of juliform diplopoda. Therefore, this dissertation was focused on seven species of the family Julidae: *Unciger transsilvanicus*, *Pachyiulus hungaricus*, *Typhloiulus nevoi*, *T. serborum*, *Serboiulus kresnik*, *S. lucifugus*, *S. deelemani*, two species of the family Blaniulidae: *Nopoiulus kochii* and *Cibiniulus phlepsii*, and on ontogenetic characterization of defensive secretions of postembryonic stadia (from stadia III to stadia XI) of julid species *Cylindroiulus boleti*.

The aim of the research was to identify quinone and non-quinone compounds of the defensive secretion of selected species, and to determine the presence/ absence of intraspecific, interspecific, intrageneric and intergeneric differences in the composition of defensive fluids, which could be used as the potential parameters for the chemotaxonomic characterization.

Modern instrumental method, used for the identification of substances, was gas chromatography/ mass spectrometry (GC-MS), together with the following techniques:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, 2D techniques such as COSY, NOESY, DOSY, DEPT HSQC and HMBC, which were used for the determination of the structure of the most abundant components of the defensive secretions. Methylene-chloride was used as solvent in the preparation of samples for GC-MS technique.

Chemical analysis of julid and blaniulid species showed presence of 26 compounds [23 different quinones: 1,4-benzoquinone (**1**), 2-methyl-1,4-benzoquinone (toloquinone) (**2**), 2-hydroxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (**4**), 2-ethyl-1,4-benzoquinone (**6**), 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (**7**), hydroquinone (**8**), 2-ethyl-3-methoxy-1,4-benzoquinone (**10**), 2-methylhydroquinone (**11**), 2,3-dimethoxyhydroquinone (**12**), ethyl-methyl-1,4-benzoquinone (**13**), 2,3-dimethoxy-



1,4-benzoquinone (14), 2-methyl-3,4-methylenedioxyphenol (15), 2-methoxy-5-methylhydroquinone (16), 2-methoxy-3-methylhydroquinone (17), 2,3-dimethylhydroquinone (18), 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (19), 2-ethylhydroquinone (20), 2,3-dimethoxy-5-methylhydroquinone (21), 2,3,5,6-tetramethylhydroquinone (22), 2,5-dimethoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (23), 2,3-dimethoxy-5,6-dimethyl-1,4-benzoquinone (24), 2,3-dimethoxy-5,6-dimethylhydroquinone (25) and 2-methoxy-1,4-benzoquinone (26), and three cresol components: *p*-cresol (5), phenol (3), and *p*-ethylphenol (9)]. Analysis also confirmed the presence of non-quinone compounds, which were mainly represented by isopentyl and hexyl esters of saturated and unsaturated C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> acid.

2-Methyl-1,4-benzoquinone (2), 2-hydroxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (4), 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (7) and 2-methyl-3,4-methylenedioxyphenol (15) were registered in all analyzed species (with the exception of *S. deelemani* which lacks compound 4). Compounds 2-methyl-1,4-benzoquinone (2) and 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (7) represented the dominant component of the secretion of epigeal species, whereas in the cavernicolous representatives the dominant quinone was 2-ethyl-1,4-benzoquinone (6). The dominant fraction in defensive fluids of postembryonic stadia of species *C. boleti* (from stadia IV to stadia XI) was quinone 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (7). Cresol compounds were isolated only from three species: *U. transsilvanicus*, *S. deelemani* and *T. serborum*.

Hydroquinone (8) was registered in *U. transsilvanicus* and *P. hungaricus*, and this is the first report of the presence of this quinone within representatives of the order Julida. 2-Methoxy-3-methylhydroquinone (17) has been confirmed only in the secretion of epigeal species *P. hungaricus*, while the compound 2-methoxy-5-methylhydroquinone (16) has been identified in *C. phlepsii*, *S. kresnik* and *C. boleti*. 2,3,5,6-Tetramethylhydroquinone (22) was isolated only from *T. serborum*, and this is also a new component, for the first time reported as millipede allomone. 2,3-Dimethoxy-5,6-dimethyl-1,4-benzoquinone (24) has been identified in *S. kresnik*, while among non-quinone compounds of species *U. transsilvanicus*, isopentyl-cosa-tetraoat has been registered for the first time in millipede defensive secretion.

The results of this dissertation confirmed presence of quinone consistency among major defensive compounds within juliform diplopoda. It was also noted that

each of the analyzed species showed its specific quinone chemoprofile, and that the minor quinone components indicated species and generic difference, and that a great variety of non-quinone compounds could serve as potential chemotaxonomic marker.

**Keywords:** Diplopoda, semiochemicals, defensive secretions, allomones, Julidae, GC-MS, quinones, non-quinones, cresol.

**Academic Expertise:** Biology

**Field of Academic Expertise:** Animal Development

**UDK:** 591. 572. 5: 595. 61 (497. 11) (043. 3)

## Sadržaj:

<b>1.Uvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Hemijski mehanizmi odbrane kod artropoda .....</b>	<b>4</b>
2.1. Hemijski sastav odbrambenih sekreta i njihova efikasnost .....	11
2.2. Opšte karakteristike predstavnika klase Diplopoda .....	15
2.3. Mehanizmi odbrane kod predstavnika klase Diplopoda.....	18
2.4. Hemijski mehanizmi odbrane kod predstavnika familije Julidae Leach, 1814. ....	22
<b>3. Materijal i metode .....</b>	<b>26</b>
3.1. Eksperimentalni deo .....	26
3.1.1. Aparati i rastvarači.....	26
3.2. Sakupljanje i čuvanje materijala.....	27
3.2.1. Sakupljanje odabranih predstavnika familija Julidae i Blaniulidae.....	27
3.2.2. Sakupljanje i determinacija postembrionalnih stupnjeva .....	29
3.3. Priprema uzoraka.....	31
3.3.1. Ekstrakcija organskim rastvaračima.....	31
3.3.2. Derivatizacija jedinjenja iz odbrambenog sekreta–reakcija silanizovanja.....	32
3.3.3. Diskovanje vezikula i ekstrakcija organskim rastvaračima.....	32
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>34</b>
4.1. Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu odabranih taksona .....	36
4.2. Sastav odbrambenog sekreta analiziranih taksona .....	37
4.3. Odbrambene supstance predstavnika familije Julidae.....	40
4.3.1. Odbrambene supstance vrste <i>Pachyiulus hungaricus</i> .....	41
4.3.1.1. Građa juliformnog tipa ozadena vrste <i>Pachyiulus hungaricus</i> .....	42
4.3.2. Odbrambene supstance vrste <i>Unciger transsilvanicus</i> .....	47
4.3.3. Odbrambene supstance vrste <i>Serboiulus lucifugus</i> .. ..	49
4.3.4. Odbrambene supstance vrste <i>Serboiulus deelemani</i> .....	53
4.3.5. Odbrambene supstance vrste <i>Serboiulus kresnik</i> .....	57
4.3.6. Odbrambene supstance vrste <i>Typhloiulus nevoi</i> .....	60
4.3.7. Odbrambene supstance vrste <i>Typhloiulus serborum</i> . ....	63
4.4. Odbrambene supstance predstavnika familije Blaniulidae.....	65
4.4.1. Odbrambene supstance vrste <i>Nopoiulus kochii</i> .....	66
4.4.2. Odbrambene supstance vrste <i>Cibiniulus phlepsii</i> .....	69
4.5. Odbrambene supstance različitih postembrionalnih stupnjeva vrste <i>Cylindroiulus boleti</i> . ....	72

**5. Diskusija..... 82**

- 5.1. Taksonomske implikacije hemijske identifikacije odbrambenih  
supstanci kod juliformnih diplopoda ..... 85
- 5.2. Ontogenetski aspekti semiohemije odbrambenih supstanci kod  
analiziranih julida... .....105
- 5.3. Filogenetski značaj semiohemije odbrambenih supstanci diplopoda..... 111

**6. Zaključak..... 114**

**7. Literatura..... 118**

## 1. Uvod

Svi živi organizmi su hemosenzitivni i u interakciji sa drugim organizmima u svom okruženju, koristeći različite hemijske signale, bilo da ih emituju ili primaju. Hemijske interakcije između organizama iste vrste, ali i različitih vrsta su od ključnog značaja za njihov uspešan opstanak i evoluciju. Biofunktionalni molekuli koji prenose različite informacije između jedinki se nazivaju semiohemikalije. Oni se mogu podeliti na feromone i alelohemikalije. Feromoni su semiohemikalije koje se koriste za komunikaciju između pripadnika iste vrste. Ovakvi hemijski signali su produkovani od strane jedne individue u cilju indukovanja određenog fiziološkog, ponašajnog ili razvojnog odgovora kod individua iste vrste. Feromoni mogu biti isparljivi i na taj način se detektuju kao mirisi, čak i na velikim udaljenostima, ili mogu biti i ne isparljivi, zahtevajući fizički kontakt između individua kako bi došlo do razmene. Feromoni mogu biti izuzetno specifični, tako da samo jedan izomer indukuje reakciju ciljane vrste. Najčešće se oslobađaju pod određenim stimulusima sredine i na osnovu funkcije koju obavljaju podeljeni su u više kategorija: seksualni feromoni, feromoni koji regulišu odnose unutar "kaste" (eng. caste-regulating), agregacioni feromoni, alarmni feromoni, feromoni koji pomažu u međusobnom pronalaženju i raspoznavanju (eng. trail-marking) i prostorni feromoni (Cedric, 2005).

Alelohemikalije su biofunktionalni molekuli koji se koriste za komunikaciju između jedinki koje pripadaju različitim vrstama. Oni se mogu podeli na alomone, kairomone i sinomone. Alomoni su biofunktionalni molekuli čije lučenje rezultuje u određenoj povoljnosti za organizam koji ga produkuje. Kairomoni su alelohemikalije koje indukuju povoljan odgovor za vrstu koja ih prima. Kairomoni su od posebnog značaja za mnoge predatore i parazitoide, koji koriste feromone ili alomone oslobođene od strane plena kao signale, koji im omogućavaju lociranje svojih domaćina. Sinomoni su biofunktionalni molekuli koji izazivaju povoljni odgovor i kod organizma koji ga proizvodi i kod onog koji ga prima. Alomoni se koriste prvenstveno kao odbrambene supstance, koje se oslobađaju u slučaju napada na vrstu emitera; međutim, kod nekih vrsta alomoni se koriste u cilju privlačenja plena do emitera, ili, kao što je to slučaj kod nekih mrava i pčela, da zbune domaćina (Cedric, 2005).

Hemijska supstance koje organizmi koriste za odbranu su esencijalni hemijski signali, s obzirom da određuju odnos predator-plen. Ove hemijske supstance su najčešće produkti sekundarnog metabolizma i uglavnom su karakteristični za slobodno živeće organizme sa ograničenom sposobnošću kretanja ili ograničenom kontrolom nad svojim kretanjem. Hemijska odbrana je veoma retka kod organizama na vrhu lanaca ishrane, jer su ovi organizmi u malom riziku da i sami budu konzumirani (recimo krupni kičmenjaci). Sa druge strane, korišćenje hemijskih supstanci za odbranu je široko rasprostranjeno među beskičmenjacima, kao i biljkama (Eisner & Meinwald, 1995).

Mnoge grupe terestričnih artropoda koriste hemijsku odbranu. Jedna od raznovrsnijih grupa zemljišnih beskičmenjaka je klasa Diplopoda. Kod nekoliko redova diplopoda je prisutna hemijska odbrana. Smatra se da je između ostalog i prisustvo alomona omogućilo mnogim diplopodama uspešnu kolonizaciju i divergentnu diverzifikaciju u različitim terestričnim staništima. Odbrambene supstance kod diplopoda se uglavnom mogu svrstati u nekoliko kategorija: hinoni, alkaloidi, krezoli i cijanogena jedinjenja. Međutim, pored navedenih semiohemikalija, registrovan je čitav niz dodatnih komponenti u odbrambenim sekretima čija funkcija nije dovoljno proučena.

U okviru klase Diplopoda, red Julida se karakteriše velikim brojem komponenti u odbrambenom sekretu, koji uključuje raznovrsne hinone, ali i brojne nehinonske komponente. Do danas je analiziran mali broj vrsta u odnosu na ukupan broj julidnih diplopoda. Stoga je ovaj rad fokusiran na analizu odbrambenog sekreta kod odabranih julidnih taksona. Istraživanjima u ovoj tezi obuhvaćeno je sedam vrsta iz familije Julidae: *Unciger transsilvanicus* (Verhoeff, 1899), *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881), *Typhloiulus nevoi* Makarov, Mitić & Ćurčić, 2002, *T. serborum* Ćurčić & Makarov, 2005, *Serboiulus kresnik* Makarov, 2013, *S. lucifugus* Strasser, 1962, *S. deelemani* Strasser, 1972. Ciljevi istraživanja bili su usmereni u nekoliko pravaca, a prevashodno su se odnosili na preciznu identifikaciju sastava odbrambenog sekreta navedenih vrsta, odnosno karakterizacija hinonskih i nehinonskih komponenti u odbrambenom sekretu. Dalje, od posebnog interesa je bilo ustanoviti prisustvo/odsustvo intraspecijske, interspecijske, intrageneričke i intergeneričke razlike u sastavu alomona kod julidnih taksona u cilju utvrđivanja mogućih parametara za hemotaksonomsku karakterizaciju svakog taksona ponaosob, odnosno definisanja alomonskog hemoprofila

taksona, kao i dobijanje relevantnih podataka koji su od velikog značaja u budućim "hemofilogenetskim" razmatranjima. Ovakva istraživanja su do sada bila veoma retka i ograničena poglavito na insekatske taksone i neke arahnije, a imaju širi značaj, između ostalog i u savremenoj integrativnoj taksonomiji, kao i u evo-devo konceptu. Posebna pažnja posvećena je komparaciji hemijskog sastava odbrambenog sekreta kod epigejskih i kavernikolnih vrsta, u cilju razumevanja složenih hemijskih interakcija koji postoje između organizama u terestričnim ekosistemima, kao i utvrđivanje značaja semiohemijskih istraživanja u razumevanju i razjašnjavanju evolucije različitih filetičkih linija tokom istorije. Istraživanjima je obuhvaćena i ontogenetska karakterizacija odbrambenog sekreta vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847), odnosno precizna identifikacija ozadenskog sastava različitih postembrionalnih stupnjeva. U cilju suprageneričke karakterizacije, odnosno utvrđivanja razlika između familija reda Julida, odabrane su dve vrste iz familije Blaniulidae: *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) i *Cibiniulus phlepsii* (Verhoeff, 1897). Dobijeni rezultati na odabranim model sistemima u ovoj doktorskoj tezi su komparirani sa relevantnim literaturnim podacima koji su do danas rađeni na juliformnim diplopodama, ali i diplopodama generalno.

## 2. Hemijski mehanizmi odbrane kod artropoda

Zglavkari [Arthropoda, od grčkih reči ἄρθρον (artron) članak i ποδός (podos) noga] predstavljaju najmnogobrojniji filum u svetu životinja. Do danas je opisano negde oko 1.500.000 vrsta ovog životinjskog filuma, što čini 80% svih do sada poznatih recentnih vrsta životinja, odnosno po nekim procenama više od dve trećine svih vrsta životinja na Zemlji. Zglavkari naseljavaju sva vodena i suvozemna staništa, gde se temperatura penje iznad 0°C i to u periodu dovoljno dugom, da bi im bilo omogućeno razmnožavanje. To su jedine životinje, osim još nekih kičmenjaka, koje su se u znatnom broju vrsta adaptirale na letenje. Svrstani su u četiri subfiluma: Chelicerata, Myriapoda, Crustacea i Hexapoda. Predstavnici subfiluma Chelicerata uključuju veći broj redova, među kojima su Opiliones, Pseudoscorpiones, Scorpiones, Solifugae, Amblypygi, Araneae, Palpigradi, Uropygi, kao i infraklasu Acari. Myriapoda se dele u četiri klase: Chilopoda, Diplopoda, Pauropoda i Symphyla. Subfilum Crustacea uključuju klase Branchiopoda, Malacostraca, Maxillopoda i Ostracoda. Najveću raznovrstnost u okviru grupe zglavkara pokazuju predstavnici subfiluma Hexapoda koji uključuje klase Entognatha i Insecta (Radović & Petrov, 2003).

Osnovne karakteristike zglavkara su bilateralna simetrija, tvrdi egzoskelet koji pruža mehaničku zaštitu njihovom segmentisanom telu, člankoviti ekstremiteti i veći broj nogu za hodanje. Kao posledica međusobnog srastanja segmenata kod zglavkara se javlja regionalna diferencijacija tela, tako da na telu ovih životinja razlikujemo: glavu (cephalon), grudi (thorax) i trbuh (abdomen). Važno je istaći da kod pojedinih grupa dolazi do drugačijeg srastanja telesnih segmenata, tako kod rakova (Crustacea) razlikujemo: glaveno-grudni region (cephalothorax) i trbuh (abdomen), dok su kod paukolikih formi segmenti spojeni u prozomu i opistozomu.

U okviru filuma artropoda, posebno terestričnih artropoda, hemijska odbrana je široko rasprostranjena i može se reći da je spektar njihovih odbrambenih hemijskih signala jedan od najbogatijih u celom živom svetu.

U okviru više od polovine redova terestričnih artropoda spadaju vrste koje koriste hemijske supstance za odbranu od predatora (Tabela 1.). Jedan od načina hemijske odbrane je putem odbrambenih žlezda, koji je dobro razvijen i relativno



proučen kod redova Hymenoptera, Opiliones, Diplopoda, Isoptera, Hemiptera i Coleoptera.

Opiliones (Phalangida) poseduju parne egzokrine prozomalne žlezde iz kojih, u slučaju napada od strane predatora, izlučuju sekrete neprijatnog mirisa, koji imaju odbrambenu ulogu. Ovaj tip žlezda, kod pojedinih taksona, ima i dodatne funkcije, kao što su mikrobicidna, ili služe za feromonsku komunikaciju između vrsta (Holmberg 1970; Machado et. al., 2002; Schaidler & Raspotnig, 2009).

U slučaju termita (Isoptera) odbrana čitave kolonije se najčešće oslanja na specijalizovanu “vojničku kastu” (Prestwich, 1975, 1979, 1984; Deligne et al., 1982; Howse, 1984). “Vojnici” su najčešće veći i snažniji od radnika i poseduju veliki broj hemijskih i mehaničkih odbrambenih mehanizama. Neke vrste koriste svoje oštre mandibule u borbi sa predatorima, dok ujedno iz frontalnih žlezda izbacuju toksične monoterenske ugljovodonike ili ketone (Moore, 1969; Prestwich, 1979, 1984; Blum et al., 1982; Quennedey, 1984). Mnoge vrste iz familije Apicotermitinae u slučaju napada izlučuju pljuvačne sekrete, dok druge snažno kontrahujući svoj abdomen uvlače predatora u viskoznu tečnost u unutrašnjost svog tela (Noirot, 1969; Sands, 1982).

Predstavnici reda Hemiptera za svoju odbranu koriste repelente najčešće male molekulske težine i visoke isparljivosti, koji obuhvataju širok spektar najrazličitijih hemijskih supstanci, kao što su aldehidi, ketoni, alkoholi, kiseline, terpeni, i estri ugljenih hidrata kratkih lanaca (Blum, 1981; Aldrich, 1988). Kod adultnih jedinki, ove supstance se nalaze u rezervoarima parnih metatoraksnih žlezda, koje se otvaraju na metapleuralnim žlebovima, ponekad povezanim sa specijalizovanom evaporativnom zonom (Remold, 1962, 1963; Filshie & Waterhouse, 1968; Carayon, 1971; Weatherson & Percy, 1978). Za razliku od ovog tipa žlezda, mnogi adulti, kao i larve, poseduju dorzalne abdominalne žlezde, ili produkuju potentne pljuvačne toksine, koji veoma efikasno odvrćaju potencijalne predatorne kičmenjake (Edwards, 1962; Aldrich, 1988).

Tabela 1. Hemijski mehanizmi odbrane kod nekih grupa terestričnih artropoda.

Klasa	Red	Nepoznata	Unutrašnji toksini	Otrovni:		Refleksno izlučivanje hemolimfe	Unutrašnje izlučivanje	Žlezdana odbrana
				ujed	ubod			
<b>ARACHNIDA</b>								
	Scorpionida	-	-	-	+	-	-	-
	Pseudoscorpiones	+	-	-	-	-	-	-
	Opiliones	-	-	-	-	-	+	+
	Acan	+	-	-	-	-	-	-
	Thelyphonida	-	-	-	-	-	-	+
	Schizomida	+	-	-	-	-	-	-
	Amblypygida	+	-	-	-	-	-	-
	Palpigrada	+	-	-	-	-	-	-
	Ricinuleida	+	-	-	-	-	-	-
	Solpugia	+	-	-	-	-	-	-
	Aranetda	-	-	+	-	-	-	+
<b>CRUSTACEA</b>								
	Isopoda	-	-	-	-	-	-	+
	Decapoda	+	-	-	-	-	-	-
<b>DIPLOPODA</b>								
	Polyxenida	+	-	-	-	-	-	-
	Glomeridesmida	+	-	-	-	-	-	-
	Glomerida	-	-	-	-	-	-	+
	Sphaerotheriida	+	-	-	-	-	-	-
	Polydesmida	-	-	-	-	-	-	+
	Platydesmida	+	-	-	-	-	-	-
	Polyzoniida	-	-	-	-	-	-	+
	Chordeumida	+	-	-	-	-	-	-
	Julida	-	-	-	-	-	-	+
	Spirobolida	-	-	-	-	-	-	+
	Callipodida	-	-	-	-	-	-	+
	Stemmiulida	+	-	-	-	-	-	-
	Siphonophorida	+	-	-	-	-	-	-
	Spirostreptida	-	-	-	-	-	-	+
<b>CHILOPODA</b>								
	Scutigermorpha	-	-	+	-	-	-	-
	Lithobiomorpha	-	-	+	-	-	-	+
	Scolopendromorpha	-	-	+	-	-	-	+
	Geophilomorpha	-	-	+	-	-	-	+
<b>PAUROPODA</b>								
		+	-	-	-	-	-	-
<b>SYMPHYLA</b>								
		+	-	-	-	-	-	-

Tabela 1. Hemijski mehanizmi odbrane kod nekih grupa terestričnih artropoda (nastavak).

INSECTA								
Protura	+	-	-	-	-	-	-	-
Collembola	-	-	-	-	-	-	-	+
Diplura	+	-	-	-	-	-	-	-
Thysanura	+	-	-	-	-	-	-	-
Ephemeroptera	-	-	-	-	-	-	-	+
Odonata	+	-	-	-	-	-	-	-
Orthoptera	-	+	-	-	+	+	+	+
Dictyoptera	-	-	-	-	-	-	-	+
Isoptera	-	-	-	-	-	+	+	+
Embioptera	+	-	-	-	-	-	-	-
Plecoptera	-	-	-	-	+	-	-	-
Zoraptera	+	-	-	-	-	-	-	-
Psocoptera	+	-	-	-	-	-	-	-
Mallophaga	+	-	-	-	-	-	-	-
Anoplura	+	-	-	-	-	-	-	-
Thysanoptera	-	-	-	-	-	+	+	+
Hemiptera	-	+	+	-	-	+	+	+
Homoptera	-	+	-	-	-	-	-	+
Neuroptera	-	-	-	-	-	+	+	+
Coleoptera	-	+	+	-	+	+	+	+
Strepsiptera	+	-	-	-	-	-	-	-
Mecoptera	+	-	-	-	-	-	-	-
Trichoptera	-	-	-	-	-	-	-	+
Lepidoptera	+	-	-	+	+	+	+	+
Diptera	-	+	+	-	-	+	+	+
Siphonaptera	+	-	-	-	-	-	-	-
Hymenoptera	-	-	+	+	+	+	+	+
Dermaptera	-	-	-	-	-	-	-	+

Jedna od najbolje proučenih grupa zglavkara koji poseduju hemijsku odbranu je red Coleoptera (Weatherson & Percy, 1978; Dettner, 1987). U okviru ovog reda zabeležen je najveći broj vrsta koje poseduju hemijsku odbranu, kao i najveća raznovrsnost odbrambenih supstanci i žlezda. Posebno su dobro poznate i analizirane vrste iz familije Tenebrionidae, koje u slučaju napada imaju specifično ponašanje, spuštaju svoju glavu i iz parnih abdominalnih žlezda izlučuju odbrambene sekrete sa hinonskim jedinjenjima (Meinwald et al., 1966; Tschinkel, 1975).

Pripadnici familije Carabidae emituju veoma heterogen spektar hemijskih odbrambenih supstanci (ugljene hidrate, aldehide, fenole, kinone, estre, kao i kiseline) iz svojih parnih pigidijalnih žlezda (Eisner et al., 1963a; Moore, 1968; Schildknecht & Kornig, 1968; Blum, 1981; Dettner, 1987).

*Unutrašnje izlučivanje.* Mnoge vrste artropoda izbacuju različite sadržaje iz svoje utrobe prilikom napada od strane predatora. Skakavci, kao i neke druge vrste iz reda Orthoptera, ali i mnoge larve iz reda Hymenoptera kao i gusenice imaju sposobnost da povrate sadržaj iz svog želudca. Ove izlučevine su kompleksna mešavina digestivnih enzima, pljuvačnih sekreta, kao i delimično svarene hrane. U pojedinim slučajevima ovakvi unutrašnji sadržaji imaju pojačano dejstvo i koncentrovani su usled prisustva biljnih komponenti, kao i produkata odbrambenih žlezda. Recimo, larve roda *Neodiprion* (Rohwer, 1918) skladište borove terpene u modifikovanoj divertikuli u utrobi i izbacuju ih, kada su ugroženi od strane predatora (Morrow et al., 1976), dok pojedine gusenice svoje unutrašnje sadržaje koje izbacuju prilikom napada predatora ojačavaju produktima ventralnih protoraksnih žlezda (Weatherson et al., 1979).

Neke druge terestrične artropode izbacuju svoj feces kada su u opasnosti. Moljci i leptiri akumuliraju krajnje produkte procesa varenja (mekonijum) tokom pupacije i mogu ih veoma snažno izbacivati na predatore tokom ovog kratkog i osetljivog perioda, kada je kutikula mekana i krila nisu još uvek razvijena. Pripadnici familije Silphidae su u ovakvoj vrsti hemijske odbrane otišli i korak dalje; oni poseduju rektalne žlezde koje se otvaraju anteriorno od analnog otvora. Kod roda *Necrodes* (Leach, 1815) produkti ovih žlezda pomešani sa fekalnim fluidima se raspršuju na predatora (Eisner & Meinwald, 1982; Eisner et al., 1986).

Umesto izbacivanja fecesa u spoljašnju sredinu, pojedine larve iz familije Chrysomelidae ga pričvršćuju za svoja leđa i koriste bukvalno kao štit kako bi odvrćali pažnju sitnijim predatorima. Larve roda *Cassida* (Linnaeus, 1758) poseduju nastavak za koji se pričvršćuju i feces i ostaci kože od prethodnih presvlačenja (Eisner et al., 1967). Ovaj visoko fleksibilan nastavak može biti okrenut tako da blokira napade sa svih strana.

Tripsi su sitni izduženi insekti koji najčešće žive u agregacijama i na skrivenim staništima, kao što su latice cveća. Kada su napadnuti, oni izbacuju iz svog anusa kapljicu odbrambenih fluida, koju čuvaju pri vrhu abdomena u prstenu okruženom

dugim dlakama. Kako je njihov abdomen jako fleksibilan, ova kapljica se može veoma lako izbaciti i štiti od predatora sa svih strana.

*Unutrašnji toksini.* Kod mnogih terestričnih artropoda unutrašnji organi, kao i hemolimfa, sadrže toksične alomone. S obzirom da se ove hemijske supstance nalaze unutar tela, predatori ne dolaze u kontakt sa njima direktno, već tek kada je telesni integument razoren. U nekim slučajevima, kao što je to kod vrsta iz familije Coccinellidae, ovi unutrašnji alomoni se izlučuju refleksno putem hemolimfe. Za razliku od egzokrinih odbrambenih komponenti koje su najčešće visoko ispraljive, unutrašnji alomoni su uglavnom ne ispraljive komponente, neprijatnog ukusa, koje deluju na predatora tek nakon što je plen konzumiran.

*Refleksno izlučivanje hemolimfe.* Mnogi insekti refleksno izlučuju svoju hemolimfu u spoljašnju sredinu kada su napadnuti. Vrste iz familija Meloidae, Chrysomelidae, Lycidae, Cantharidae, Lampyridae, Coccinellidae, izlučuju hemolimfu sa alomonima kroz intersegmentalne membrane. Sa druge strane, hemolimfa pripadnika reda Plecoptera ne sadrži ove repelente, i verovatno se koristi kao fizički agens protiv sitnijih invertebrata (Blum, 1981).

Vrste iz familija Arctiidae i Ctenuchidae izlučuju kompleksnu mešavinu svoje hemolimfe i sekreta cervikalnih žlezda. (Rothschild, 1985). *Eugaster sp.* (Orthoptera, Tettigoniidae) reaguje na vizuelne stimuluse i može da izbacuje hemolimfu čak i do 40 centimetara visine.

*Bodlje i žarne dlake.* Kod nekih vrsta insekata, jedna sekretorna ćelija, ili agregacija ovih ćelija, izlučuje svoj sadržaj u oštre bodlje ili dlake, koje u kontaktu sa predatorom oslobađaju ove toksine ispod njihove kože. Ovakav tip hemijske odbrane je posebno karakterističan za larve Lepidoptera iz familije Saturniidae, Notodontidae, Arctiidae, Lymantriidae, Lasiocampidae, Limacodidae, Megalopygidae, i druge (De Jong & Bluemink, 1977; Frazer, 1965; Beard, 1963; Kawamoto & Kumada, 1984; Novak et al., 1987).

*Hemijska odbrana jaja.* Terestrične artropode ponekad štite svoja jaja i hemijskim mehanizmima. Protektivni alomoni su produkovani od strane ženki i najčešće se inkorporiraju u jaja tokom njihove sinteze, ili se izlučuju na površinu jaja tokom polaganja. Svetlo obojena jaja nekih predstavnika familije Chrysomelidae sadrže oleinsku kiselinu koja je repelent za mrave (Howard et al., 1982), dok vrste iz familije

Coccinellidae formiraju jaja koja sadrže alkaloidne. Jaja vrste komarca *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) na svom gornjem kraju imaju masne kapljice koje pružaju zaštitu od mrava. Ženke roda *Chauliognathus* (Hentz, 1830) poseduju reproduktivne žlezde koje su bogate dihidromatrikarijarnim voskovima koji najverovatnije oblažu jaja i na taj način ih ujedno štite od predatora i imaju bakteriostatičku aktivnost (Brown et al., 1988). Pojedine vrste insekata prekrivaju svoja jaja lepljivim i sluzavim ekskudatima. Predstavnici reda Neuroptera polažu fertilna jaja u skupinama na krajevima grančica, dok se prsten manjih abortivnih jaja, nazvanih repagula, polaže nekoliko milimetara ispod i prekrivena je sjajnim lepljivim fluidom. Ovakva struktura je veoma efikasna u odbrani od mrava.

*Odbrambene žlezde bez rezervoara.* Ovaj tip žleza je sastavljen od samo jedne sekretorne ćelije, ili pak agregacije sekretornih ćelija, koje izbacuju svoj sadržaj direktno na površinu tela. Ne postoji ekstracelularna zona za skladištenje sekreta, premda su ponekad vidljivi intracelularni rezervoari. Primeri ovakvih žleza mogu se naći među hilopodama, recimo rod *Geophilus* (Leach, 1814) (Jones et al., 1976), kao i u slučaju elitralnih i pronotalnih žleza vrsta iz porodice Chrysomelidae (Daloze et al., 1986). Polistine ose proizvode estere masnih kiselina u svojim sternalnim žlezdama bez rezervoara, i izlučuju ih u svoja gnezda, kao repelente za mrave (Hermann, 1984; Post et al., 1984).

Žuti ili narandžasti gorki sekreti koje izlučuju predstavnici porodice Coccinellidae su dugo smatrani primerom refleksnog izlučivanja hemolimfe. Nakon dodatnih analiziranja, sada je poznato da, barem u slučaju pojedinih vrsta, ova supstanca nije hemolimfa, već produkt jedne hipodermalne žlezdane ćelije ili agregacije ovih ćelija.

*Odbrambene žlezde sa rezervoarom.* Ovakve žlezde su integumentalni organi, izgrađene od unutrašnjosti telesnog zida. Tipično imaju rezervoar u kome se skladišti sekret i žlezdano tkivo koje može biti deo telesnog zida, deo rezervoara, ili se nalazi pored samog rezervoara i sa njim je povezano specijalnim kanalima. Žlezde se mogu javljati pojedinačno, u parovima, ili u više parova i nalaze se na glavi, toraksu ili abdomenu. Njihova izuzetna varijabilnost u broju, distribuciji, kao i morfologiji, nesumnjivo ukazuje na njihovo nezavisno evoluiranje.

U odnosu na način izlučivanja sekreta, žlezde sa rezervoarom se dele na tri tipa. Kod prvog tipa, najčešće prisutnog kod diplopoda, sekret se samo ispušta iz žlezde na površinu tela. Za drugi tip žlezda, pronađen kod nekih gusenica, karakteristično je izbacivanje sekreta evaginacijama čitave žlezde. Kod trećeg tipa žlezda se sekret raspršuje na površinu, ponekad i na značajnu udaljenost. Ovakav tip žlezda tipičan je za neke bubašvabe, gusenice iz familije Notodontidae, neke vrste iz familije Tenebrionidae, skakavce, pojedine predstavnike reda Hemiptera i Carabidae. Posebne adaptacije, kao i načini ponašanja omogućavaju ovim artropodama da izbacuju sekret sa maksimalnom efektivnošću i minimalnim gubicima. Mehanizmi izlučivanja sekreta veoma variraju. Ponekad se to odvija pokretima muskulature samog rezervoara, nekada se rezervoar aktivira pritiskom hemolimfe, a neke žlezde su povezane sa respiratornim trahejama i vazdušni pritisak uzrokuje izlučivanje sekreta. Drugi mogući mehanizmi su svakako predmet daljih istraživanja.

### **2.1. Hemijski sastav odbrambenih sekreta i njihova efikasnost**

Brojnost i raznovrsnost odbrambenih komponenti identifikovanih kod terestričnih zglavkara, posebno kod insekata, su izuzetni. Blum je 1981 naveo da ih ima preko 600, ali je ovaj broj danas svakako značajno veći. Većina ovih hemijskih komponenti su prirodni produkti, ranije izolovani iz biljaka i životinja, ali je identifikovan i veliki broj novih jedinjenja.

Odbrambena hemijska jedinjenja su uglavnom visoko isparljiva, male molekulske težine i spadaju u klase kiselina, estara, ketona, aldehida, fenola, ugljenih hidrata i benzohinona (pregled određenih hemijskih klasa kod pojedinih grupa terestričnih artropoda dat je u Tabeli 2). Uglavnom se javljaju u vidu kompleksnih smeša, pa tako odbrambeni sekret kod vrste *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) sadrži 18 alifatičnih komponenti, uključujući aldehide, ketone, estre i ugljene hidrate. Predstavnici reda Opiliones takođe izlučuju širok spektar odbrambenih jedinjenja: naftohinone, antrahinone, fenole, benzohinone, pirene, azotna jedinjenja, terpene, "gonileptidne" ketone (uglavnom vinil- ketone), "sklerosomatidne komponente" (grupa acikličnih komponenata, uglavnom etil- ketona, prvi put identifikovanih kod sklerosomatidnih predstavnika subreda Eupnoi) i metil ketone (Raspotnig et al., 2012).

Prilikom dosadašnjih analiza ovakvih mešavina uglavnom su identifikovane dominantne supstance, dok minorne supstance, kao i one koje se pojavljuju u tragovima su ostale nepoznate. Međutim upravo ova jedinjenja mogu pokazati kojim se hemijskim mehanizmima sintetišu sekreti.

Različite i filogentski udaljene grupe artropoda mogu sintetisati sekrete koji sadrže identične, ili slične grupe jedinjenja. Široko rasprostranjeni benzohinoni su zastupljeni u sekretima diplopoda, falangida, bubašvaba, dok je *trans*-2-heksenal identifikovan u sekretima bubašvaba, mrava i predstavnika Hemiptera.

Tabela 2. Karakteristične odbrambene supstance identifikovane kod pojedinih grupa terestričnih artropoda.

Takson	Klasa hemijskih jedinjenja	Karakteristične komponente
<b>ARACHNIDA</b>		
THELYPHONIDA	Karboksilne kiseline	Sirćetna kiselina
SCORPIONIDA		
Scorpionidae	Biogeni amini	Serotonin
OPILIONES		
Gonyleptidae	1,4-hinoni	2,3-Dimetil-1,4-benzohinon
Phalangiidae	Alifatični ketoni	4-Metil-3-heksanon
<b>DIPLOPODA</b>		
GLOMERIDA		
Glomeridae	Alkaloidi	1-Metil-2-etil-4-(3 <i>H</i> )-kinazolinon
JULIDA		
Julidae	Hinoni	2-Metil-1,4-benzohinon
POLYDESMIDA		
Euryuridae	Aromatični aldehidi	Benzaldehid
Polydesmidae	Aromatične kiseline	Prekursori HCN
	Fenoli	Fenol
	Aromatični nitrili	Benzol cijanid
<b>INSECTA</b>		
ORTHOPTERA		
Romaleidae	1,4-Hinoni	1,4-Benzohinon
Phasmidae	Monoterpen laktoni	Nepetalakton
DERMAPTERA		
Forficulidae	1,4-Hinoni	1-Etil-1,4-benzohinon
ISOPTERA		
Mastotermitidae	1,4-Hinoni	2-Metil-1,4-benzohinon
Rhinotermitidae	Ugljeni hidrati	Pentakozan
	Alifatični ketoni	1-Tetradeken-3-jedan
	Nitroalkeni	1-Nitro-1-pentadeken
Termitidae	Monoterpen ugljeni hidrati	$\alpha$ -Pinen
	Dipetren ugljeni hidrati	Kembren A
	Seskviterpen ugljeni hidrati	A-selinen
DICTYOPTERA		
Blaberidae	1,4-Hinoni	1,4-Benzohinon
Blattidae	Monoterpen keton	6-Metil-5-hepten-2-jedan



Tabela 2. Karakteristične odbrambene supstance identifikovane kod pojedinih grupa terestričnih artropoda (nastavak).

	Alifatični aldehidi	2-Metilen butanal
	Fenol	<i>p</i> -Krezol
THYSANOPTERA		
Phlaeothripidae	Lakton 1,4-Hinoni	$\gamma$ Dekalakton
HOMOPTERA		
Aphididae	Seskviterpen ugljeni hidrati	<i>E-B</i> -Farnesen
HEMIPTERA		
Pentatomidae	Alifatični ugljeni hidrati	Tridekan
	Alifatični aldehidi	<i>E-2</i> -Heksenal
Alydidae	Alifatični aldehidi	4-Okso- <i>E-2</i> -heksenal
Coreidae	Alifatični alkoholi	1-Heksanol
	Alifatični estri	Heksil acetat
	Alifatični aldehidi	Heksenal
COLEOPTERA		
Dytiscidae	Steroidi	Testosteron
	Aromatični aldehidi	<i>p</i> - Hidroksibenzaldehid
Staphylinidae	Monoterpen aldehidi	Citral
	Laktoni	$\gamma$ Dodekalakton
	Alkaloidi	Aktinidin
	Sekundarni amini	Pederin
Carabidae	Fenol	<i>m</i> -Krezol
	Aromatični aldehidi	Salicilaldehid
	Karboksilne kiseline	Metakrilna kiselina
Meloidae	Terpen anhidrid	Kantaridin
Coccinellidae	Alkaloidi	Kokocinelin
Tenebrionidae	Alkeni	1-Undekan
	1,4-Hinoni	6-Metil-1,4-naftohinon
	Aromatični laktoni	8-hidroksisokumarin
Gyrinidae	Seskviterpen aldehidi	Girinidal
Chrysomelidae	Monoterpen laktoni	Hzizomelidial
	1,4-Hinoni	1,8-Dihidroksi-9,10-antrihinon
	Steroidi	Perilogenin

Većina sekreta zadržava svoju fluidnu konzistenciju nakon izlučivanja, ali poneki u kontaktu sa vazduhom postaju viskozni i lepljivi.

Odbrambeni sekreti imaju dejstvo tipičnih iritanata, odvrćajući predatora od svoje žrtve. Predatori terestričnih artropoda su većinom beskičmenjaci, pre svega različite grupe insekata, mravi, karabide, ali i neki sitniji kičmenjaci: vodozemci, ptice, glodari ili sisari (Baker, 1985; Remy, 1950). Većina odbrambenih komponenti su veoma neprijatnog mirisa (na primer *E-2*-heksenal, salicilaldehid), ili su veoma reaktivni (na primer 1,4-benzohinon) (Blum, 1981). Neke komponente su izuzetno snažni citotoksini

(mravlja kiselina, hidrogen cijanid), ili imaju sposobnost izazivanja intenzivnog bola (kao što su kantaridin i pederin).

Najsnažniji dokaz da ove komponente zaista imaju odbrambenu ulogu je taj što je plen koji ih poseduje odbija predatore (Eisner & Meinwald, 1966; Blum, 1981; Duffey, 1977). Svega jedan susret sa jedinkom koja poseduje hemijsku odbranu je dovoljan da bi se uspostavila dugoročna averzija ka ponovnom napadu. Dokle god se kontinuirano izbacuju odbrambeni sekreti, artropode nastavljaju da odbijaju svoje predatore, dok po prestanku ove aktivnosti, one postaju lak plen (Eisner, 1965; Blum & Woodring, 1962). Predatori koji ignorišu prisustvo hemijskih odbrambenih supstanci mogu biti privremeno oslepljeni, paralizovani, ili čak ubijeni (Eisner, 1958, 1970). Pojedini predatori mogu biti odbijeni neprijatnim mirisom plena već pri prvom kontaktu (Eisner & Meinwald, 1966; Eisner 1970; Blum et al., 1973; Cane 1986), dok naivniji predatori odbijaju plen jedino na osnovu ukusa (Blum & Sannasi, 1974). Predatori među kičmenjacima na koje se deluje hemijskim mehanizmom raspršivanja sekreta u oči, nos ili druge senzitivne zone, će ispustiti svoj plen, trljati usta i nos u podlogu, suziti, treptati, ili pokazivati druge simptome bola i neprijatnosti (Eisner & Meinwald, 1966; Eisner, 1970).

Nakon što predatori iskuse neprijatnosti kontakta sa plenom koji ima određeni mehanizam hemijske odbrane, mogu se dogoditi određene promene u evolutivnim mehanizmima procene kojima se odbija ovakav plen. Oni mogu naučiti da povezuju određene mirise i ukuse sa neprijatnostima prilikom napada na određeni plen.

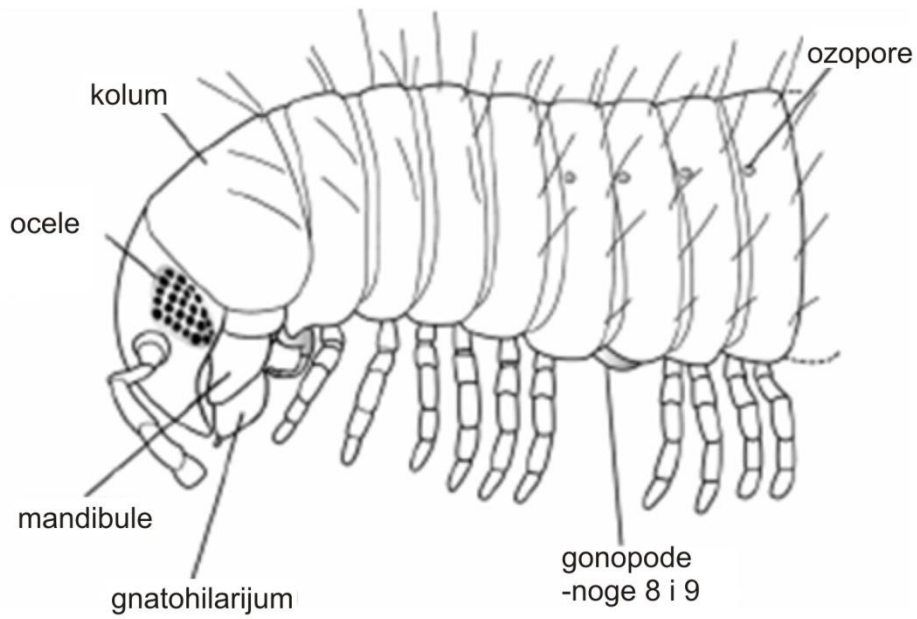
Pojedini sekreti, pored funkcije odbrane, poseduju i druge biološke uloge, odnosno imaju ulogu feromona. Vrsta mrava *Acanthomyops claviger* (Roger, 1862) sintetizuje sekrete u svojim mandibularnim žlezdama koji služe i za odbranu ali i kao alarmni feromoni.

Od interesa je pomenuti da se određene aktivne komponente iz odbrambenih sekreta kod artropoda, skoro uvek pojavljuju kao sekundarne supstance u biljkama (na primer 2-heksenal,  $\alpha$ -pinen, ciklopentanoidni monoterpeni: iridodial i iridomirmecin). Činjenica da odbrambeni sekreti artropoda tako efikasno odbijaju njihove predatore ukazuje na mogućnost da sekundarne supstance biljaka njima koriste u odbrani od herbivora.

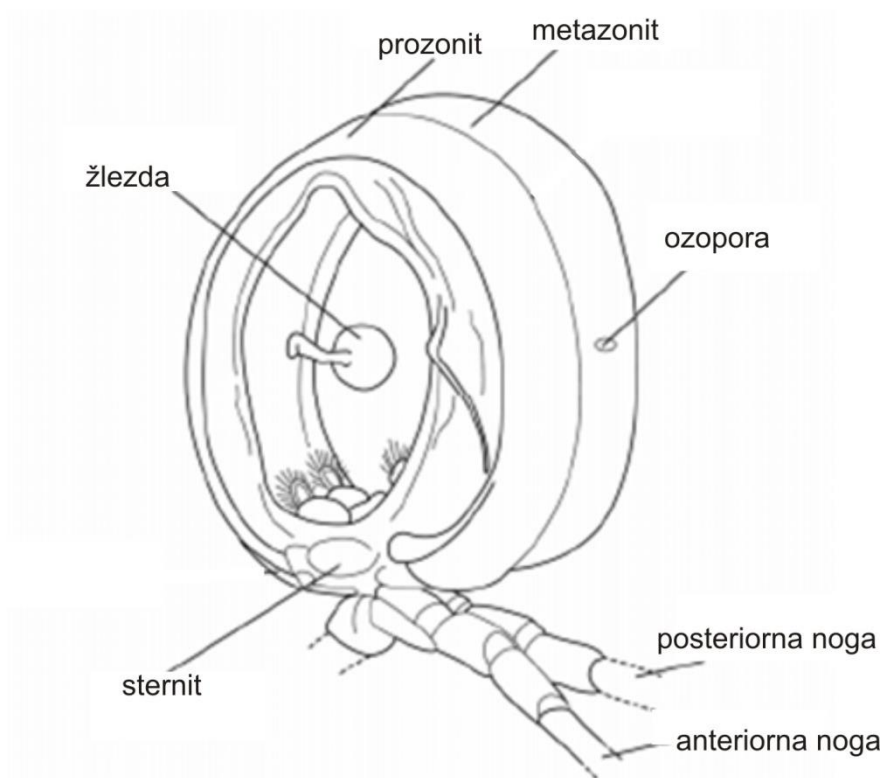
## 2.2. Opšte karakteristike predstavnika klase Diplopoda

Diplopode su stara grupa terestričnih artropoda, čiji su fosili poznati još iz Silura (Hopkin & Read, 1992). Sa preko 12.000 opisanih vrsta, svrstanih u 145 familija i 16 rodova (Golovatch, 2009) i procenjenog broja vrsta u svetu na oko 80.000, diplopode su treća po veličini klasa terestričnih artropoda, posle insekata i arahnida. Teritoriju Srbije naseljava 100 vrsta diplopoda, svrstanih u 44 roda, 16 familija i sedam redova (Antić et al., 2013). One su važna komponenta terestričnih ekosistema u umerenim zonama, ali i u tropskim i subtropskim zonama u svetu, gde igraju važnu ekološku ulogu kao detrivori (konzumenti uginulih ostataka biljaka). Diplopode, čija gustina populacija u šumskom zemljištu može da premaši i 1.000 jedinki po kvadratnom metru, mogu da konzumiraju na godišnjem nivou 10-15% ukupne uginule biljne mase. Najveći broj vrsta su detrivori, samo mali broj vrsta je omnivoran, a nekoliko vrsta su karnivori [*Apfelbeckia insculpta* (L. Koch, 1876) se hrani kišnim glistama], česta je i koprofagija. Većina vrsta živi na skrovitim mestima, ispod kamenja, oborenih stabala, u zemljištu, a mnoge vrste naseljavaju i pećine. Telesna veličina je veoma varijabilna. Vrste roda *Polyxenus* (Latreille, 1802) su duge do 2 mm, a neke tropske diplopode dostižu i do 30 cm dužine.

Najznačajnija morfološka odlika klase su udvojeni somiti, nastali spajanjem dva segmenta. Posledica ove pojave je prisustvo dva para nogu na većini trupnih somita, po čemu je i klasa dobila naziv; takođe, svaki somit ima dva para ganglija i dva para srčanih ostija. Glava je ispupčena dorzalno i spljoštena ventralno. Bočne delove glave pokrivaju veoma krupne mandibule; prve maksile srastaju i formiraju pločastu strukturu gnathohilarijum, koja čini dno preoralne komore. Diplopode nemaju druge maksile, kao ni odgovarajući glaveni segment. Trup diplopoda je dorzoventralno spljošten ili cilindričan i ima varijabilan broj somita, koji se kreće od 10 do preko 90. Prvi trupni segment je relativno širok i naziva se kolum, na njemu nema ekstremiteta. Drugi, treći i četvrti somiti imaju jedan par ekstremiteta, dok ostali nose po dva para ekstremiteta. Trup diplopoda se završava telzonom, koji se sastoji od epiprokta, hipoprokta i paraprokta.



Slika 1. Glava i anteriorni telesni segmenti [od I (kolum) do IX segmenta] mužjaka iz reda Julida, sa obeleženim odgovarajućim telesnim strukturama.



Slika 2. Struktura jednog somita (diplosegmenta).

Na udvojenim somitima imaju dva para trahejnih otvora koji su smešteni ventralno, na sternumu, za razliku od svih ostalih mandibulata. Parni Malpigijevi sudovi izlučuju u većoj meri amonijak nego ureu. Kao i druge stonoge, diplopode su vezane za vlažnija staništa, mada se neke vrste mogu naći i u relativno sušnijim sredinama. Gubitak vode u velikoj meri mogu sprečiti sklupčavanjem. Veliki broj vrsta nema oči; veoma često poseduju grupacije prostih očiju u osnovama antena (2-80), ili imaju fotoreceptore po trupu. Poseduju i Tömösváry-jeve organe (Hopkin & Read, 1992).

Treći trupni somit je genitalni. Ekstremiteti sedmog somita mužjaka su modifikovani i služe za prenošenje sperme do genitalnih otvora ženke, te se označavaju se kao gonopode. Građa gonopoda može da bude veoma kompleksna i od krucijalnog je značaja za specijsku, ali u nekim slučajevima i supraspecijsku identifikaciju. Spermatozoidi diplopoda su aflegalatni za razliku od drugih stonoga. Kod *Pselaphognatha* česta je partenogeneza. Oplođena jaja se polažu u stelju ili zemljište, a neke vrste prave i gnezda. Kod diplopoda se mogu razlikovati tri različita tipa postembrionalnog razvića: (a) Svako presvlačenje uključuje dodavanje novih somita, čak i posle sticanja polne zrelosti. Ne postoji definisani poslednji stadijum u povećanju broja somita. Ovaj tip anamorfoze se označava kao euanamorfoza. Javlja se kod *Julida* i *Colobognatha*; (b) Dodavanje novih somita se odvija do određenog stadijuma. Sledeća presvlačenja se odvijaju bez dodavanja novih somita. Ovaj model postembriogeneze uključuje prvo anamorfozu, a nakon toga epimorfozu i označava se kao hemianamorfoza. Javlja se kod *Polyxenida* i *Glomerida* i (c) Dodavanje novih somita se završava na određenom stadijumu, koji je uvek isti za datu vrstu. Taj "poslednji" stadijum je adultni stadijum i ne javljaju se naknadna presvlačenja. Ovaj tip postembriogeneze se naziva teloanamorfoza. Javlja se kod *Chordeumatida* i *Polydesmida*.

Diplopode se odlikuju debelom kutikulom sa posebno masivnim tergalnim pločama koje su obično impregnirane mineralima. Kutikula svakog somita se sastoji od dorzalnih tergita, ventralnih sternita i lateralnih pleurita. Površina trupa je najčešće glatka, a kod manjeg broja vrsta može biti naborana ili pokrivena nizovima bodlji (*Pselaphognatha*). Većina diplopoda su crne ili braonkaste boje (Hopkin & Read, 1992). Diplopode se kreću potisnom silom koju izazivaju brojni ekstremiteti u kontaktu sa podlogom. Za kretanje kroz stelju ili rastresito zemljište posebno su dobro adaptirane

vrste cilindričnog oblika čija je površina glatka. Razlikuju se pet oblika tela kod diplopoda, koje su označavaju kao ekomorfološki tipovi: 1. „Buldožer“ tip, 2. „Klinasti“ tip, 3. „Bušilica“ tip, 4. „Roler“ tip i 5. Poliksenidni tip.

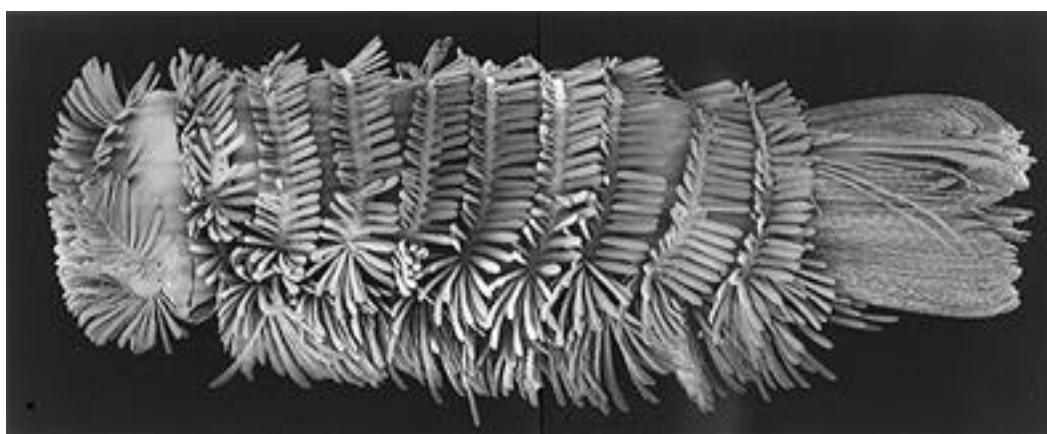
Generalno se može reći da su diplopode karakteristične za šumsko zemljište. Najčešće su diplopode osetljive na vodni deficit, te je većina formi mezo- ili higrofilna. Ekološki, većina vrsta diplopoda ima mali kompenzatorni kapacitet i pored relativne stenotopije, javljaju se na svim kontinentima (osim Antarktika), a neke vrste su se adaptirale i na ekstremne uslove sredine (pustinje, tundre ili visoke planine) (Golovatch, 2009).

### 2.3. Mehanizmi odbrane kod predstavnika klase Diplopoda

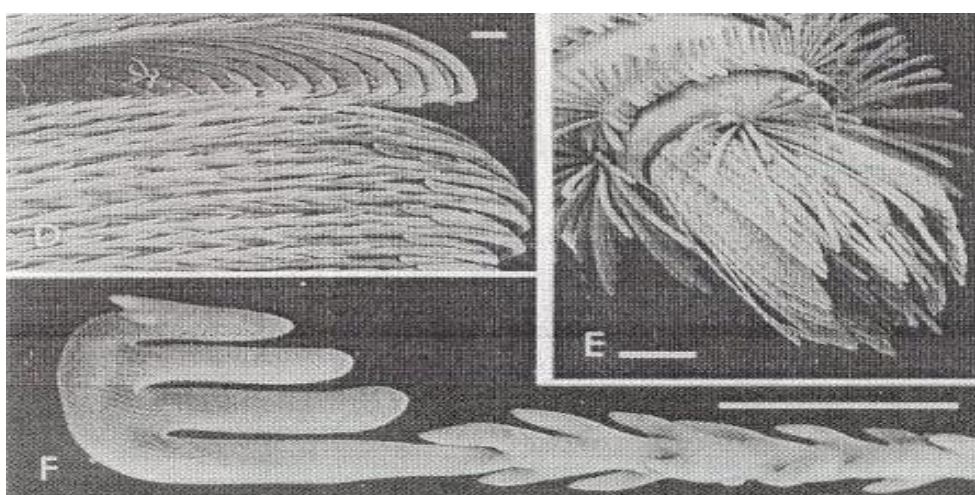
Vagilnost diplopoda je limitirana i u većini slučajeva nemaju sposobnost da izbegnu napade pokretljivih predatora, pa stoga predstavljaju plen velikom broju predatora, preko invertebrata, pre svega insekata, pa do vodozemaca, gmizavaca, ptica i sisara (Baker, 1985; Remy, 1950). Jedini izuzetak je vrsta *Diopsiulus regressus* (Silvestri, 1916) (Nematophora: Stemmiuloidea) iz Afrike koja je dugačka 3 do 4 cm, a prilikom napada može da skoči 2 do 3 cm (Hopkin & Read, 1992). Odbrana od predatora kod ove grupe terestričnih artropoda uključuje čitav spektar različitih mehanizama, od ponašajnih, preko mehaničkih, morfoloških, pa sve do hemijskih. Kod diplopoda iz reda Polyxenida, koje ne poseduju kalcificiranu kutikulu (” meke diplopode “), a ni hemijske mehanizme odbrane, postoji par protektivnih čekinja posebno brojnih na kaudalnom kraju tela, koje služe za odbranu, pre svega od napada mrava, a koje zabadanjem u telo predatora odvrćaju, imobilišu, ili čak dovode do njegove smrti (Eisner et al., 1996) (Slike 1, 2, i 3). Morfološka zaštita je predstavljena čvrstim, kalcificiranim egzoskeletom, koji je asociran sa ponašanjem spiralnog uvijanja kod juliformnih diplopoda, kao i hordeumatida, polidezmidida i polizonida, ili urolavanja glomerida u loptastu formu: vrsta *Glomeris marginata* (Villers, 1789) poseduje snažne mišiće uz pomoć kojih se urola u potpunu sferu (Carnevali & Valvassori, 1982) (Slike 4, 5, i 6) Međutim, čak i veoma čvrst i kalcificiran egzoskelet, kao što je to slučaj kod *Sphaerotherium sp.*, može sprečiti napad ptica, mrava i miševa, ali ne i mungosa (Eisner & Davis, 1967).



Slika 3. *Polyxenus fasciculatus* (Say, 1821) sa kaudalnim protektivnim čekinjama.



Slika 4. SEM mikrografija čitave jedinke vrste *Polyxenus fasciculatus* (Say, 1821).



Slika 5. SEM mikrografije protektivnih čekinja.

Prikaz spiralnog uvijanja tela kao način odbrane od predatora kod različitih vrsta stonoga:



Slika 6. Vrsta *Orthoporus ornatus*, (Girard, 1853).



Slika 7. Vrsta *Glomeris marginata* (Villers, 1789).



Slika 8. Vrsta *Cyllindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).

Hemijska odbrana se obavlja preko odbrambenih žlezda sa rezervoarom, koje su prisutne kod većine diplopoda, izuzev redova Siphoniulida, Sphaerotheriida, Chordeumatida, Siphonophorida, Stemmiulida i Platydesmida (Ćurčić et al., 2009).

Diplopode pokazuju značajnu raznovrsnost produkovanih odbrambenih supstanci. Do sada je kod ovih organizama registrovano preko 80 protektivnih jedinjenja, od kojih neka pokazuju filogenetsku specifičnost za određene redove (Eisner et al., 1978). Tako, predstavnici reda Polydesmida emituju cijanogena jedinjenja (Makarov et al., 2010). Članovi redova Glomerida i Polyzoniida proizvode alkoide i proteine (Meinwald et al., 1966; Miller & McPhail, 1978), dok je prisustvo krezola



karakteristično za predstavnike reda Callipodida (Ćurčić et al., 2009). Vrste koje pripadaju redovima Spirobolida, Spirostreptida i Julida (Juliformia) produkuju različite hinonske komponente (Eisner & Meinwald, 1966; Wood, 1975; Deml & Huth, 2000), pa se označavaju i kao „hinonske diplopode“ (Eisner et al., 1978). Sve navedene supstance služe kao iritanti i repelenti i na taj način doprinose hemijskoj odbrani od predatora.

Na osnovu same morfologije žlezda, kao i specifičnih jedinjenja koja se nalaze u sastavu sekreta koji se iz njih izlučuju, odbrambene žlezde se mogu podeliti na tri tipa: 1. Glomeridni tip žlezda; 2. Juliformni tip žlezda; 3. Polidezmidni tip žlezda. Gradnja juliformnog tipa žlezda biće opisana u narednom podpoglavlju.

Glomeridni tip odbrambenih žlezda je karakterističan za predstavnike reda Glomerida, koji su i jedini predstavnici subklase Pentazonia kod kojih je razvijen i hemijski vid odbrane. Kao što je već prethodno pomenuto vrste iz reda Glomerida poseduju čvrsti egzoskelet i urolavaju svoje telo u lopticu prilikom napada predatora. Pored ove morfološke zaštite, hemijski mehanizam odbrane kod glomerida je predstavljen odbrambenim žlezdama koje su parne i nalaze se od III-X telesnog somita. Iz ovih ozadena se izlučuje po jedna kap sekreta prilikom iritacije putem ozopora smeštenih dorzomedijano (Eisner et al., 1978; Hopkin & Read, 1992; Shear et al., 2011). Dorzalno, dva kanala jednog pleurotergita su spojena u jedinstveni kratak kanal, koji se ozoporom otvara u spoljašnju sredinu. Svaki rezervoar je okružen mišićima čije kontrakcije omogućavaju izlučivanje sekreta kroz ozoporu.

Polidezmidni tip odbrambenih žlezda je karakterističan za vrste iz reda Polydesmida i najbolje je proučen. Ova žlezde su veoma složene gradnje i čine ih sledeći delovi: veliki unutrašnji membranozni rezervoar, kanal, vestibulum i ozopora. Rezervoar se nastavlja u vestibulum preko širokog kanala, a zid kanala je u svom završnom delu valvularne strukture (Eisner et al., 1963b). Kontrakcijama mišića valva se otvara i vrši se transfer komponenti u vestibulum. Ozopore su locirane na određenim telesnim segmentima od V do XIX. Najčešće su raspoređene na segmentima: V, VII, IX, X, XII, XIII, XV, XVI, XVII, XVIII i XIX, ali je zabeležen i veliki broj odstupanja od ovakvog rasporeda. Ozopore se najčešće otvaraju na površini tela, ali se kod nekih polidezmidna otvaraju na kratkim strukturama koje se nazivaju porostelama.

#### **2.4. Hemijski mehanizmi odbrane kod predstavnika porodice Julidae Leach, 1814**

Familija Julidae Leach, 1814 (Myriapoda, Diplopoda, Julida) je holarktički takson sa oko 600 opisanih vrsta, i najvećim diverzitetom rodova u zapadnom Palearktiku (Enghoff et al., 2011). Na teritoriji Srbije najbrojniji je red Julida sa dve porodice: Julidae (41 vrsta) i Blaniulidae (dve vrste) (Antić et al., 2013). Familija Julidae je upravo i najbrojnija u okviru faune diplopoda i broji 54 vrste (Makarov et al., 2004).

Predstavnici ove porodice imaju ograničenu sposobnost lokomocije, pa su stoga laka meta za većinu predatora. Njihov čvrst, kalcificiran egzoskelet, asociran sa ponašanjem spiralnog uvijanja pruža ovim zglavkarima određenu morfološku zaštitu, ali je glavni mehanizam odbrane od predatora kod ovih organizama hemijski. Hemijski mehanizam odbrane predstavljen je odbrambenim žlezdama sa rezervoarom. Postoji veoma malo fosilnih dokaza koji mogu razrešiti evoluciju odbrambenih žlezda. Najverovatnije je da je upravo pojava mrava, kao jednih od najčešćih predatora ovih organizama, uslovlila selektivni pritisak za pojavu odbrambenih žlezda, a da je dalji evolucionari pritisak došao sa pojavom sitnijih sisara (Hopkin & Read, 1992).

Građa juliformnog tipa žlezda je relativno jednostavna i uključuje sferičnu vezikulu, koja sadrži sekretorne ćelije i kratak kanal koji se otvara preko male ozopore na lateralnoj strani pleurotergita. Zidovi kanala su obavijeni mišićima i kontrolišu njegovu kontrakciju, odnosno otvaranje i zatvaranje pore. Sama vezikula nije okružena mišićima, pa se pretpostavlja da je najverovatniji način izbacivanja sekreta putem povećanja pritiska hemolimfe, ili pritiskom integumentalnih mišića koji okružuju žlezdu (Eisner et al., 1998). Ovaj tip žlezda je prisutan kod većine diplopoda i uključuje redove Spirobolida, Spirostreptida, Julida, Callipodida, Platydesmida i Polyzoniida (Eisner et al., 1978). Weterston i Persi su pokazali da je kod vrste *Uroblaniulus canadensis* (Newport, 1844) zid vezikule izgrađen od sekretornih jedinica. Svaka od ovih jedinica se sastoji od para specijalizovanih ćelija i tubula koje vrše transport sekreta sintetisanog u ovim ćelijama do velikog kutikularnog rezervoara. Ove ćelije su bogate organelama i njihovi distalni delovi imaju brojne sekretorne granule koje su uronjene u rezervoar. Odbrambene žlezde su postavljene lateralno na većini pleurotergita, i samo prvih pet i poslednji, ili dva poslednja pleurotergita ih ne poseduju

Odbrambeni sekreti ovog tipa žlezda sadrže veoma širok spektar različitih hemijskih jedinjenja i predstavljaju kompleksne mešavine organskih supstanci male molekulske težine (Wu et al., 2007). Kod vrste *Polyzonium rosalbum* (Cope, 1879) identifikovan je terpenoid koji sadrži azot, polizonimin, koji je snažan repelent za insekte kao što su mravi i bubašvabe (Meinwald et al., 1975). Iz odbrambenog sekreta vrste *Buzonium crassipes* (Cook & Loomis, 1928) (Polyzoniida, Polyzoniidae) izolovana su tri jedinjenja  $\beta$ -pinen, limone i alkaloid buzonamin, koji takođe predstavljaju snažne repelente za mrave (Wood et al., 2000). Hemijski sastav sekreta kod reda Callipodida analizirana je na samo pet vrsta do sada (Shear et al., 2007; Ćurčić et al., 2009; Makarov et al., 2011). Sve analize su potvrdile prisustvo *p*-krezola kao glavne komponente, što se može smatrati univerzalnim filogenetskim obrascem za ovaj red.

Najzastupljenija jedinjenja koja su do sada izolovana iz odbrambenih sekreta su benzohinoni, koji su karakteristični za redove Spirobolida, Spirostreptida, i Julida. Oni predstavljaju veoma efikasne repelente kako za invertebrate, tako i za vertebrate (Eisner et al., 1978) i mogu činiti i do preko 1% ukupne telesne težine jedinke (Deml & Huth, 2000). Za hinone je poznato da poseduju antibakterijsko, fungicidno i antihelmintičko dejstvo (De Rosa et al., 1994), a postoje indicije o njihovoj feromonskoj ulozi u intraspecijskoj komunikaciji (Deml & Huth, 2000); interesantno je da je utvrđeno da su za neke nekrofagne insekte hinoni kairomoni, koji ih privlače ka uginulim diplopodama (Schmitt et al., 2004).

Behal i Phisalix (1900) su prvi put precizno izolovali 1,4-benzohinon kao komponentu odbrambenog sekreta kod vrste *Julus terrestris* (Linnaeus, 1758). Najranije publikacije vezane za ovu problematiku su rađene na evropskim julidama (Schildkecht & Weis, 1961; Röper & Heyns, 1977). Kasnije se od značajnijih radova izdvaja Huth (2000) i najnovija publikacija je Vujisića i saradnika (2011), u kojoj je dat pregled za 16 do sada analiziranih vrsta julida; takođe postoje podaci i o jednoj vrsti iz familije Blaniulidae (Weatherston et al., 1971), dok je jedna studija rađena na julidama iz jugoistočne Azije (Shimizu et al., 2012).

Glavne komponente odbrambenog sekreta kod svih do sad analiziranih vrsta juliformnih diplopoda bili su 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon i 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (Attygalle et al. 1993; Eisner et al., 1978; Deml & Huth, 2000).

Do sada je analizirano 27 vrsta julida (18 rodova) i identifikovano je 20 hinonskih i 17 nehinonskih komponenti (Bodner & Raspotnig, 2012). Za razliku od raznovrsnog spektra benzohinona, mali broj nehinonskih jedinjenja je do sad izolovan iz sekreta i među njima su zastupljeni neki estri, alkoholi i alkenali (Huth, 2000; Shimizu et al., 2012; Bodner & Raspotnig, 2012). Moguće je da mešavina benzohinona i estara pruža veću efikasnost odbrambenom sekretu, od ovih komponenti pojedinačno. Neke od nehinonskih komponenti identifikovanih kod *Anaulaciulus* sp (Shimizu et al., 2012) su već do sada potvrđene kod nekih artropoda kao feromoni (*n*-heksil-laurat, *n*-heksil-kaprat ili *n*-heptil-laurat), sa mikrobicidnim dejstvom (*n*-heksil-*n*-tridekanoat), ili kao signali za specijsku komunikaciju i prepoznavanje (*n*-heksil-miristat).

Takođe je značajno pomenuti prisustvo još jedne nehinonske komponente *o*-krezola u odbrambenom sekretu parajulidne vrste *Oriulus venustus*. (Wood, 1864). Shear i saradnici su istakli važnost ove komponente u razrešavanju filogenetskih odnosa između Juliformia, Callipodida i Polydesmida (Shear et al., 2007). Moguće je da prisustvo *o*-krezola kod ova tri reda predstavlja pleziomorfnu karakteristiku.

Kod vrste *Oriulus delus* (Chamberlin, 1940) takođe je identifikovana i analizirana supstanca *o*-krezol u kombinaciji sa 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinonom (Kluge & Eisner, 1971), dok su kod vrste *Blaniulus guttatus* (Fabricius, 1798) identifikovane tri vrste acetata dugačkih lanaca, za koje je analizama ustanovljeno da sačinjavaju frakciju od oko 20% odbrambenih sekreta (Weatherson et al., 1971). U sekretu spirobolidne vrste *Rhinocricus insularis* (Schubart, 1948) pronađene su velike količine (*E*)-alkenala i (*E*)-2-dodekanala, zajedno sa toluhinonom (Wheeler et al., 1964). Serija masnih kiselih estara, zajedno sa benzohinonima izolovana je iz istočnoazijske julidne vrste *Anaulaciulus* sp. (Shimizu et al., 2012). Postoje određene indicije da su ovakvi estri široko distribuirani i među evropskim julidama, moguće zajedno sa *n*-alkanolima (Huth, 2000), ali još uvek nedostaju jasni dokazi za ovu tvrdnju.

Bodner i Raspotnig (2012) su prvi put publikovali studiju o sastavu odbrambenog sekreta tokom ontogenetskog razvića kod julidne vrste *Allajulus dicentrus* (Latzel, 1884). Za razliku od adulta, sekreti kod ranih postembrionalnih stadijuma (treći i četvrti) sadrže samo frakcije benzohinona. Kasniji stadijumi razvića (peti) takođe pokazuju dominaciju benzohinona u sekretu, ali sa malim količinama oktenola, dok se već od šestog stadijuma uočava sličnost u sastavu sekreta sa adultnim jednkama

Raspoloživi literaturni podaci ukazuju na konzistentnost prisustva hinona u odbrambenom sekretu juliformnih diplopoda. Određene razlike u arsenalu hinonskih i nehinonskih komponenti pružaju osnovu za pretpostavku da njihovo prisustvo/odsustvo može imati hemotaksonomski značaj. Dalje, kvalitativne i kvanitativne razlike u sastavu odbrambenih alomona kod juliformnih diplopoda, ali i diplopoda generalno, pružaju osnovu za uspostavljenja filogenetskih obrazaca. Ograničavajuća okolnost je činjenica da je kod većine analiziranih vrsta karakterisana samo glavna komponenta ili komponente odbrambenog sekreta, dok su minorne komponente ostale nepoznate. Trenutno je teško uspostaviti relevantnu komparaciju koja ima filogenetsku ili hemotaksonomsku vrednost na specijskom nivou. Stoga su rezultati ove teze od interesa i za iniciranje budućih istraživanja i analize novih, posebno minornih komponenata sekreta, kod većeg broja taskona diplopoda, ali i artropoda generalno.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Eksperimentalni deo

##### 3.1.1. Aparati i rastvarači

Najznačajnija hibridna tehnika za identifikaciju odbrambenih supstanci korišćena u ovoj tezi bila je gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC-MS). Za GC i GC-MS analize korišćen je gasni hromatograf Agilent 7890A opremljen split/splitless injektorom, koji je povezan sa dva detektora (plameno jonizacioni i maseni). Kapilarna kolona se povezuje direktno na dvodelni razdelnik, na koji se takođe povezuju po jedna kapilara (bez stacionarne faze) koje idu prema detektorima. Približno ravnomerna raspodela supstanci na oba detektora postiže se korišćenjem kapilara prečnika 0,118 mm, tako da se prema masenom spektrometru koristi kapilara dužine 144 cm, a ka plameno–jonizacionom detektoru kapilara od 53 cm. Tokom analiza korišćene su sledeće kapilarne kolone: HP–5MS i HP–5MSI dimenzija (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) i HP–INNOWAX dimezija (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm), noseći gas je bio helijum čistoće 5.0. Za analize su korišćene metode sa zaključavanjem retencionog vremena (RTL+) koristeći metil–stearat ili *n*–heksadekan kao standarde. Maseni detektor je takođe Agilent–ov kvadrupolni detektor 5975C inert XL EI/CI MSD, a maseni spektri su snimani tehnikama elektronske (70 eV) i hemijske jonizacije (150 eV). Metan i izobutan korišćeni su kao gasovi za hemijsku jonizaciju. Najčešće korišćeni GC-MS parametri pri radu sa nepolarnim HP–5MS i HP–5MSI kolonama kod elektronske i kod hemijske jonizacije bili su: rad pri konstantnom pritisku (1,6 ml/min na 40 °C); početna temperatura je 40 °C u trajanju od jednog minuta, linearno je povećavana do 300 °C brzinom od 10 °C u minutu i zadržana na 300 °C poslednjih 8 minuta analize\*\*. U slučajevima kada je bilo potrebno bolje razdvojiti komponente smeše, korišćen je duži temperaturni program sa početnom temperaturom od 60 °C i linearnim porastom od 3 °C u minutu sve do 300 °C, takođe pri konstantnom pritisku (1 ml u minutu na 220 °C)++. Temperatura izvora za elektronsku jonizaciju u svim analizama bila je 230 °C, a

---

\*\*Metoda nazvana QC TEST

++Metoda nazvana Adams

za hemijsku 250 °C. Temperatura kvadrupola je bila 150 °C. Parametri GC–MS instrumenta koji se koriste pri radu sa polarnom INNOWAX kolonom uglavnom se razlikuju samo po temperaturi gasnog hromatografa i po protoku nosećeg gasa. Analize su rađene pri konstantnom protoku (4,4 ml u minute na 40 °C). Početna temperatura je bila 40 °C (1 min), da bi se povećavala do 255 °C brzinom od 10 °C u minutu i na toj vrednosti ostala još 7,5 minuta.

Za ekstrakciju su korišćeni rastvarači spektroskopske čistoće: *n*-heksan, metanol, metilen-hlorid, hloroform, acetonitril i etil-acetat.

### 3.2. Sakupljanje i čuvanje materijala

Analizirane jedinke odabranih epigejskih julidnih taksona sakupljene su na više lokaliteta na teritoriji Srbije, dok su kavernikolni taksoni prikupljeni poglavito u tipskim lokalitetima u pećinama istočne Srbije u periodu od 2010. do 2013. godine. Jedinke su razvrstavane po uzrasnim stupnjevima, dok su adultne jedinke odvajane po polovima, nakon čega su transportovane u plastičnim posudama (prečnika 20 cm, visine 10 cm, sa poklopcima koji su perforirani za ulazak vazduha) zajedno sa odgovarajućom količinom prirodnog materijala sa staništa (zemlja, stelja, humus ili supstrat iz pećinskih staništa). Jedinke su čuvane u laboratorijskim uslovima nekoliko dana na 10 °C u mraku, dok je vlažnost održavana prskanjem manje količine vode jednom dnevno. U slučaju kavernikolnih taksona jedinke su odmah nakon sakupljanja na terenu stavljane u rastvarač metilen-hlorid, nakon čega su transportovane u laboratoriju i sekret je podvrgnut analizama.

#### 3.2.1. Sakupljanje odabranih predstavnika familija Julidae i Blaniulidae

U okviru familije Julidae, Leach, 1814 sakupljeno je i analizirano ukupno osam vrsta: *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881), *Unciger transsilvanicus* (Verhoeff, 1899), *Serboiulus lucifugus* Strasser, 1962, *Serboiulus deelemani* Strasser, 1972, *Serboiulus kresnik* Makarov, 2013, *Typhloiulus nevoi* Makarov, Mitić & Ćurčić, 2002, *Typhloiulus serborum* Ćurčić & Makarov, 2005, kao i različiti postembrionalni stupnjevi vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).

Uzorak vrste *Pachyiulus hungaricus*, koji je sadržao po 15 adultnih mužjaka i ženki, sakupljen je u Drugovačkoj šumi, u okolini Smedereva, u toku maja 2010. godine.

Vrsta *Unciger transsilvanicus*, široko distribuirana na teritoriji severne i istočne Srbije, sakupljena je u Drugovačkoj šumi, u okolini Smedereva, tokom novembra 2012. godine. Sakupljeni materijal sadržavao je 15 mužjaka i 15 ženki ove vrste.

Kavernikolne endemične vrste stonoga rodova *Serboiulus* Strasser, 1962 i *Typhloiulus* Latzel, 1884 sakupljene su u nekoliko različitih pećinskih ekosistema na teritoriji istočne Srbije. Jedinke su odmah nakon sakupljanja na terenu stavljane u rastvarač metilen-hlorid, nakon čega su transportovane do laboratorije, gde su ekstrakti podvgnuti hemijskim analizama.

Jedinke vrste *Serboiulus lucifugus* su sakupljene u Prekonoškoj pećini (tipski lokalitet), selo Prekonoga, u okolini Svrljiga, Svrljiške planine, istočna Srbija, u više navrata tokom maja i juna 2012. godine.

Jedinke vrste *Serboiulus deelemani* sakupljene su u pećini Vetrena dupka (tipski lokalitet), selo Vlasi, u okolini Pirota, istočna Srbija, tokom septembra 2012. godine. U uzorku je bilo osam adultnih mužjaka i šest adultnih ženki.

Uzorak novo opisane vrste roda *Serboiulus* Strasser, 1962, *Serboiulus kresnik* sakupljen je u Gornjoj Lenovačkoj pećini, selo Lenovac, pored Zaječara, planina Tupužnica, tokom maja i juna 2012. godine. Analizirani uzorak je sadržao adultne jedinke: devet mužjaka i devet ženki.

Vrsta *Typhloiulus nevoi* sakupljena je u Velikoj pećini, selo Petrlaš, Dimitrovgrad, Odorovačko polje (tipski lokalitet), tokom juna 2012. godine.

Vrsta *Typhloiulus serborum* sakupljena je u pećinskom sistemu Samar, selo Kopajkošara, okolina Niša, tokom juna 2012. godine.

Zbog endemičnosti navedenih troglobiontnih vrsta i njihove ugroženosti u hemijskim analizama je korišćeno pet jedinki oba pola, kao i kasni postembrionalni stupanj.

U okviru familije Blaniulidae C. L. Koch, 1847 sakupljene su i analizirane dve vrste: *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) i *Cibiniulus phlepsii* (Verhoeff, 1897). Uzorak od 15 adultnih jedinki vrste *N. kochii* sakupljen je u pećini Velika Balanica, selo Sicevo, Niš, teritorija Srbije, tokom maja 2013. godine, dok je uzorak od deset jedinki vrste *C.*



*phlepsii* prikupljan u okolini Novog Sada, neposredno uz obalu Dunava, maja 2013. godine.

Generička i specijska identifikacija adultnih jedinki obavljena je pomoću istraživačke binokularne lupe „Carl Zeiss“ (uveličanje objektiva 0.63x, 1x, 1.6x, 2.5x i 4x; uveličanje okulara 6.3x i 25x) i stereo mikroskopa „Leica MZ12.5“ (zum 12.5p:1), korišćenjem primarno spoljašnje morfologije, a nakon toga rađena je disekcija gonopodnog aparat, kao i vulvi, koji imaju najveći informacioni karakter.

Fotografije jedinki, odnosno određenih relevantnih struktura snimljene su digitalnim fotoapartom „Canon PowerShot A80“, montiranim na stereo mikroskop „Carl Zeiss Stemi 2000-C“ (zum 7.7:1).

Određeni broj privremenih mikroskopskih preparata izrađen je korišćenjem 2-fenoksietanola (kada je bilo potrebno prosvetljivanje) i postavljanjem na predmetna stakla sa komoricom sa glicerolom, gde su čuvani do izrade trajnih preparata.

### 3.2.2. Sakupljanje i determinacija postembrionalnih stupnjeva

Za sve klase stonoga, Diplopoda, Pauropoda, Symphyla, kao i redove Scutigermorpha, Lithobiomorpha, i Craterostigmomorpha u okviru klase Chilopoda, karakterističan način ranog postembrionalnog razvića je anamorfoza. Ovaj termin je prvi uveo Hase 1880. godine kako bi opisao postembriogenezu kod redova Scutigermorpha i Lithobiomorpha, a ovakav koncept je prvi put je primenio na diplopode Latzel 1884. godine (Enghoff et al., 1993). Alternativni termin za anamorfozu je epimorfoza, gde presvlačenja nisu praćena dodavanjem novih segmenata i nogu. Epimorfoza prati anamorfozu u postembrionalnom razviću mnogih vrsta diplopoda.

Stadijum u anamorfozi (obeležava se rimskim brojem) je stadijum koji će preći u naredni, sa većim brojem somita (i pari nogu), posle sledećeg presvlačenja. Stadijum sa krajnjim brojem segmenata je ili poslednji stadijum (kao što je to slučaj kod Polydesmida), ili epimorfni stadijum koji nastavlja sa presvlačenjima bez dodavanja novih segmenata.

Tip anamorfoze karakterističan za redove Julida i Colobognatha, kao što je prethodno pomenuto u Uvodnom poglavlju, označen je kao euanamorfoza. Kod ovog tipa postembrionalnog razvića svako presvlačenje uključuje dodavanje novih somita, čak

i posle sticanja polne zrelosti. Ne postoji definisani poslednji stadijum u povećanju broja somita; on je određen završetkom života same jedinke. Proces ranog postembrionalnog razvića počinje izleganjem iz jajne opne, koja se deli dorzalnom medijalnom linijom (Saudray, 1953), ali jedinka i po pucanju opne ostaje unutar membrana podeljene ljuske jajeta još oko 12 sati. U narednoj fazi razvića, dolazi do presvlačenja u prvi pravi stadijum, koji u većini slučajeva ima tri para nogu i bez ocele je, premda se ocele narednog stadijuma već mogu nazirati kroz kutikulu. Stadijum I ima manje antenalnih segmenata od adulta, i postoji po jedan par nogu na segmentima 2, 3 i 4. (Causey, 1943). Nakon kratkog vremenskog perioda (na primer kod *Orthomorpha* (= *Oxidus*) *gracilis* traje 18 do 24 sata) stadijum I se unutar jajne kapsule presvlači u stadijum II, koji ima jednu ocelu, veći broj nogu (najčešće 6 pari) i jedan par odbrambenih žlezda. Koji je prvi aktivni stadijum koji će napustiti gnezdo zavisi od same vrste, a opšte je pravilo da sa samostalnom ishranom kreću od stadijuma III. Koji će biti poslednji stadijum razvića takođe zavisi od same vrste, kod *Cylindroiulus punctatus* (Leach, 1815) poslednji zabeleženi stadijum je XIV. Većini diplopoda je potrebno dve, tri do četiri godine, ili čak i više da bi dostigle zrelost. Neke jedinke vrste *Glomeris marginata* (Villers, 1789) su imale životni vek čak i od 11 godina (Carrel, 1990). Najverovatniji razlog ovako dugog vremena potrebnog za postizanje zrelosti kod diplopoda je slab kvalitet njihove hrane (Blower, 1969).

Veoma malo studija je do sada urađeno na postembrionalnom razviću kod diplopoda, ali su najbolje do sada proučene Julide (Enghoff et al., 1993). Međutim, prilikom determinacije postembrionalnih stadijuma kod Julida postoje određeni problemi koji se ogledaju u veoma varijabilnom dodavanju novih somita između svih stadijuma (sem najranijih), dostizanje zrelosti na različitim stadijumima (čak ženke i mužjaci iste vrste ne moraju dostići zrelost na istom stadijumu razvića), kao i činjenice da se anamorfoza jedinke može nastaviti i nakon izleganja njenih prvih juvenilnih stadijuma.

Kako se određene telesne strukture menjaju prilikom svakog presvlačenja, moguće je na osnovu njih odrediti stadijum u kome se individua određene vrste nalazi. Ove strukture uključuju telesne segmente (somite), odbrambene žlezde, kao i ocele, a kao kriterijum koristi se i veličina tela i težina. Kod julida najšire korišćen metod određivanja broja telesnih segmenata je brojanje koluma kao prvog segmenta, zatim

brojanje segmenata sa nogama za hodanje (podusni segmenti), kao i brojanje segmenata bez nogu (apodusni segmenti), i izostavljenje telzona (glava +28+3+telzon, najčešće se predstavlja kao 28+3).

Analizirani materijal je sakupljen na Avali i Košutnjaku, okolina Beograda, tokom aprila i maja 2013. godine. Nakon urađene specijske determinacije ustanovljeno je da postembrionalni stupnjevi odgovaraju vrsti *Cylindroiulus boleti*. Brojnost jedinki u analiziranom uzorku po stupnjevima bila je sledeća: III- 13 jedinki; IV- pet jedinki; V- pet jedinki; VI- šest jedinki; VII- tri ženke i pet mužjaka; VIII- 12 ženki i devet mužjaka; IX- 17 ženki i 18 mužjaka; X- 10 ženki i 18 mužjaka; XI- pet ženki i pet mužjaka.

Prilikom determinacije postembrionalnih stupnjeva sakupljenog materijala korišćen je niz različitih uporedno-morfoloških karaktera. Prva metoda određivanja uzrasnih stadijuma bila je brojanje podusnih segmenata, kao i brojanje segmenata bez nogu (apodusni segmenti). Ova metoda ima široku primenu pre svega na julide, ali i na polidezmidu i hordeumatide. Druga metoda, prvi put razvijena od strane Vachona (1947), je brojanje redova ocela, kao i brojanje ocela u jednom redu. Ova metoda je zasnovana na činjenici da se kod svakog novog ontogenetskog stadijuma dodaje i novi red ocela. Najčešće prvi stadijum nema ocela, stadijum II ima po jednu ocelu na lateralnim stranama glave, stadijum III ima prethodni red ocela, na koji se anteriorno dodaje red sa dve ocele, stadijum IV ima 1+2+3 redova ocela i td. Na taj način, određeni uzrasni stadijum je jednak broju redova ocela plus jedan.

### **3.3. Priprema uzoraka**

#### **3.3.1. Ekstrakcija organskim rastvaračima**

U zavisnosti od veličine jedinki, vrši se ekstrakcija nekoliko jedinki ili nekoliko desetina jedinki (istog pola ili uzrasnog stupnja), koje se ubace u šlifovani balon što manje zapremine i što je moguće većeg otvora (na primer, balon od 50 ml sa šlifom 29/32). Žrtvovanje je najbolje uraditi sa najmanjom mogućom zapreminom rastvarača (1–2 ml) u trajanju od 3 do 5 minuta. Nakon ekstrakcije, uzorke treba procediti kroz parče papirnate maramice namotane na staklenu pipetu. Ako je uzorak nedovoljno

koncentrovan najbolje ga je upariti u blagoj struji azota i koncentrovati maksimalno na desetinu zapremine. Korišćeni su rastvarači: *n*-heksan, metilen-hlorid, metanol, deuterohloroform, acetonitril i DMSO. Za GC i GC-MS sa nepolarnim kolonama HP-5MS i HP-5MSI najbolje je koristiti *n*-heksan i metilen-hlorid, dok je za analize na polarnim INNOWAX kolonama najbolje koristiti metanol i acetonitril. Najbolji rastvarači za reverzno-faznu hromatografiju HPLC i LC-MS (C8 i C18 kolone) takođe su metanol i acetonitril. Prilikom pripreme uzoraka za NMR analize najbolje je koristiti deuterisane rastvarače za ekstrakciju. Uzorak se može pripremiti i u nedeuterisanom rastvaraču, koji se mora upariti u struji azota, a zatim rastvoriti u odgovarajućem deuterisanom rastvaraču.

### 3.3.2. Derivatizacija jedinjenja iz odbrambenog sekreta – reakcija silanizovanja

Jedinjenja prisutna u odbrambenom sekretu derivatizovana su pomoću reagensa za silanizovanje (rastvor BSTFA u acetonitrilu), pri čemu se dobijaju isparljivi trimetilsilil-(TMS) derivati. Reakcija silanizovanja je u stvari kombinovana sa ekstrakcijom celih jedinki u acetonitrilu. Jedinke su prvo žrtvovane u acetonitrilu, nakon čega je u 0,5 ml ekstrakta dodato 0,5 ml reagensa za silanizovanje u vijalicu od 2 ml. Reakcija je gotova posle jednočasovnog zagrevanja na 60 °C. Ovako pripremljene uzorke treba analizirati na gasnom hromatografu sa MS detektorom što je pre moguće, a najkasnije 6 časova nakon pripremanja. Reakciju silanizovanja smo koristili i za potvrdu strukture identifikovanih jedinjenja.

### 3.3.3. Disekovanje vezikula i ekstrakcija organskim rastvaračima

Najteži zadatak kod ovakve tehnike predstavlja pažljivo odvajanje vezikula od ostatka tkiva. Takođe, problem predstavlja i to što jedinka obično isprazni sadržaj vezikule pri prvom kontaktu. Da bi smo omogućili nesmetan rad sa jedinkama bilo je neophodno da im se postepeno snizi telesna temperatura. Na taj način jedinke su ulazile u stanje hibernacije, što je omogućavalo da se nakon toga brzo žrtvuju i disekuju, čime je izbegnuta njihova odbrambena reakcija ispuštanja alomona. Disekovane vezikule su

ubacivane u jednu vijalicu sa rastvaračem i nakon toga potvrgnute analizama koje su prethodno detaljno opisane.

## 4. Rezultati

Cilj ove doktorske teze bila je analiza hemijskog sastava odbrambenog sekreta odabranih vrsta stonoga iz klase Diplopoda. Kao model sistemi su korišćeni bazalni taksoni juliformnih stonoga, kao i izvedene forme, uključujući i kavernikolne taksone, u cilju generičke i specijske komparacije, kao i korišćenja dobijenih rezultata u ontogenetskim i filogenetskim interpretacijama. U okviru familije Julidae analizirane su sledeće vrste: *Unciger transsilvanicus*, *Pachyiulus hungaricus*, *Typhloiulus nevoi*, *T. serborum*, *Serboiulus kresnik*, *S. lucifugus*, *S. deelemani*, kao i ontogenetske hemokarakterizacije sastava ozadena vrste *Cylindroiulus boleti*, počev od III do adultnog stupnja. Za suprageneričku komparaciju korišćene su vrste familije Blaniulidae: *Nopoiulus kochii* i *Cibiniulus phlepsii*.

Uzorci su pripremani ekstrakcijom organskim rastvaračima različitih polarnosti, što se posle više isprobanih različitih načina iritiranja jedinki pokazalo kao najbolja metoda za pripremu uzoraka i kasniju identifikaciju odbrambenih supstanci.

Najznačajnija hibridna tehnika za identifikaciju odbrambenih supstanci bila je gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC-MS) i to u uslovima elektronske i hemijske jonizacije. Za određivanje strukture najzastupljenijih komponenti odbrambenih sekreta korišćene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija, zajedno i sa višepulsnim 2D tehnikama kao što su, COSY, NOESY, DOSY, DEPT HSQC i HMBC. U pojedinim eksperimentima korišćene su i  $^{15}\text{N}$  HSQC i  $^{15}\text{N}$  HMBC tehnike (Vujisić, 2013).

Za identifikaciju jedinjenja pre svega bilo je neophodno je uporediti EI-MS spektre sa što boljim bibliotekama spektara. Korišćene su komercijalne biblioteke (NIST 11, Wiley 07, Adams, Flavor i OCAD 09) i biblioteka Hemijskog fakulteta COMB 7. Iako se u ovim bibliotekama nalazi više od pola miliona snimljenih spektara, to jest, nekoliko stotina hiljada jedinjenja, identifikacija se mora uraditi veoma pažljivo. Najpre se mora voditi računa o tome da se prilikom identifikacije nepoznatog jedinjenja koristi reprezentativan maseni spektar, tačnije maseni spektar hromatografskog pika mora se prečistiti od pozadinskih jona, ili od jona drugog jedinjenja u slučaju da nije moguće postići dobro hromatografsko razdvajanje. Zatim, koeficijent sličnosti<sup>2</sup> između

---

<sup>2</sup> Na engleskom- match factor

tako dobijenog masenog spektra i spektra iz biblioteke mora da bude izrazito visok (više od 900 od maksimalnih 1000 u programu NIST MS Search ili više od 90 od maksimalnih 100 u programu AMDIS). Pored visokog koeficijenta sličnosti, maseni spektri moraju i vizuelno da liče, što znači da ne smeju imati višak, ali ni manjak pikova. Zatim je potrebno, ako postoje literaturni podaci, uporediti jedinjenja i na osnovu retencionih indeksa (RI)<sup>3</sup>. Neke biblioteke spektara već sadrže RI podatke i/ili podatke o retencionom vremenu<sup>4</sup>, dok je za druge neophodno konsultovati literaturu. Dobro poznati kriterijum za identifikaciju jedinjenja na osnovu RI podataka jeste taj da se RI nepoznatog jedinjenja i biblioteke (literature) ne sme razlikovati za više od 20 RI jedinica (Vujisić, 2013).

Metilen-hlorid je korišćen kao rastvarač prilikom pripreme uzoraka za GC-MS tehniku za identifikaciju jedinjenja sadržanih u odbrambenom sekretu. Najbolje rezultate je pokazala ekstrakcija organskim rastvaračem većeg broja jedinki u što manjoj zapremini rastvarača. Takođe je važno pomenuti da su uzorci podvrgnuti hemijskoj analizi odmah nakon ekstrakcije. Najpouzdaniji način za postizanje željenih rezultata bio je održavanje jedinki u životu u laboratorijskim uslovima do samog trenutka analiziranja, ili ukoliko je usled karakteristika same vrste transport bio nemoguć, ili bi se prilikom njega izazvala velika iritacija jedinki, ekstrakcija je urađena na terenu odmah nakon sakupljanja uzorka, i ekstrakt je nakon toga podvrgnut GC-MS analizama (Vujisić, 2013).

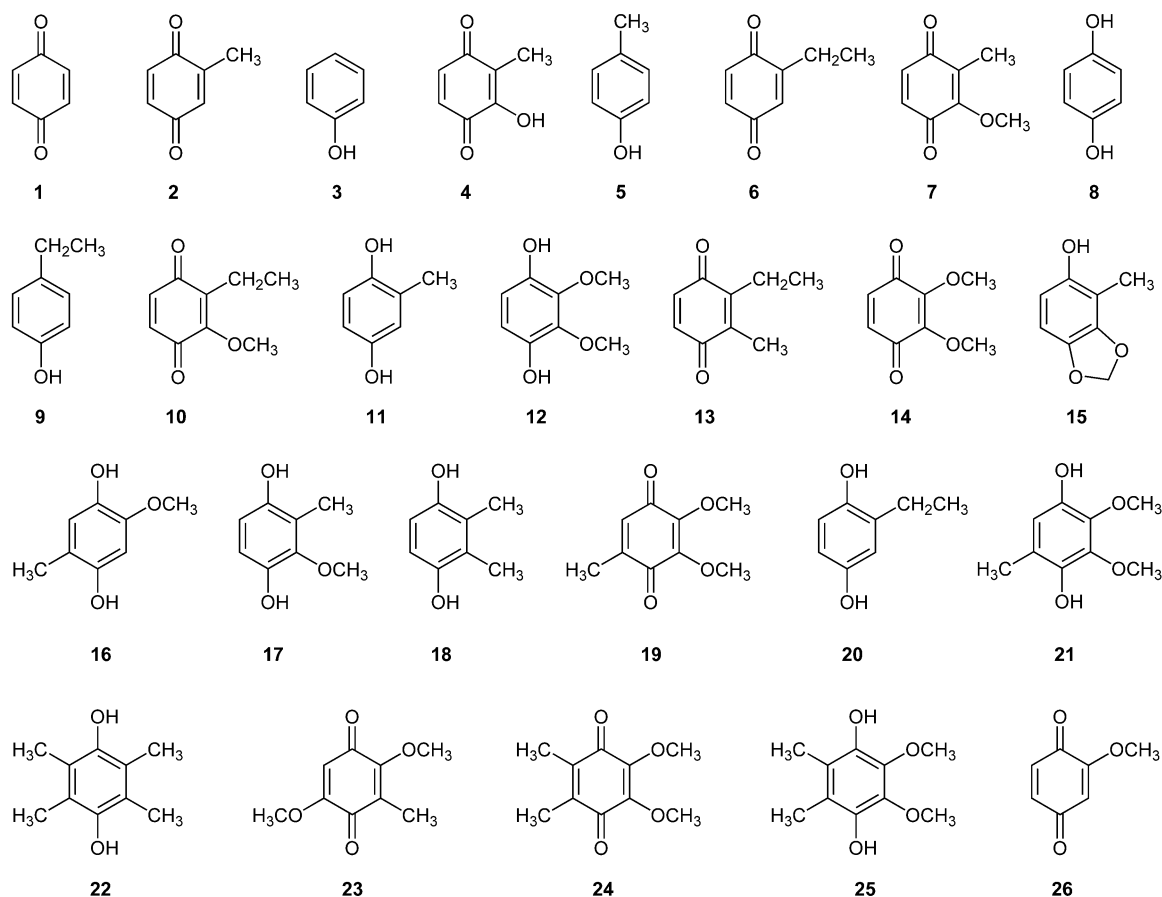
---

<sup>3</sup> RI (retencioni indeks) predstavlja karakteristiku jedinjenja pod određenim GC uslovima. Određuje se u odnosu na retenciona vremena (Rt) dva susedna *n*-alkana između kojih se nalazi signal datog jedinjenja. Standardna serija *n*-alkana se mora snimiti pod istim GC uslovima. Indeksi *n*-alkana imaju vrednosti  $N \cdot 100$ , pa će na primer jedinjenje sa RI 900 imati isti RI i Rt kao i *n*-nonan.

<sup>4</sup> Retenciono vreme je karakteristično samo pod istim GC uslovima, tako da je prilikom snimanja neophodno prilagoditi GC uslove, na čije se podatke pozivate prilikom identifikacije.

#### 4.1. Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu odabranih taksona

Na Slici 9. prikazane su strukturne formule identifikovanih jedinjenja- hinonske i krezolne komponente odbrambenog sekreta odabranih predstavnika familija Julidae i Blaniulidae.



Slika 9. Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu svih analiziranih vrsta iz familija Julidae Leach, 1814 i Blaniulidae C. L. Koch, 1847; hinonske komponente: 1,4-benzohinon (1), 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (2), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (4), 2-etil-1,4-benzohinon (6), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7), hidrohinon (8), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (10), 2-metilhidrohinon (11), 2,3-dimetoksihidrohinon (12), etil-metil-1,4-benzohinon (13), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (14), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (16), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (17), 2,3-dimetilhidrohinon (18), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (19), 2-etilhidrohinon (20), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (21), 2,3,5,6-tetrametilhidrohinon (22), 2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (23), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (24), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (25) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (26); krezolne komponente: *p*-krezol (5), fenol (3) i *p*-etilfenol (9).



GC-MS analizama metilen-hloridnog ekstrakta odabranih vrsta stonoga iz familija Julidae i Blaniulidae identifikovano je ukupno 26 jedinjenja. Od toga je okarakterisano 23 različita hinonska derivata: 1,4-benzohinon (**1**), 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), hidrohinon (**8**), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2-metilhidrohinon (**11**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), etil-metil-1,4-benzohinon (**13**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**), 2,3-dimetilhidrohinon (**18**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2-etilhidrohinon (**20**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**), 2,3,5,6-tetrametilhidrohinon (**22**), 2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**23**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (**24**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (**25**) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (**26**). Takođe je kao minorne komponente u odbrambenom sekretu kod pojedinih analiziranih vrsta, ili kao komponenta u tragovima izolovana krezolna jedinjenja: *p*-krezol (**5**), fenol (**3**) i *p*-etilfenol (**9**).

Analizama je potvrđeno prisustvo i nehinonskih jedinjenja u odbrambenom sekretu, ali je njihova procentna zastupljenost u ukupnom sastavu sekreta generalno manja od zastupljenosti hinonske komponente, ili se ova jedinjenja pojavljuju kao supstance u tragovima (t)<sup>5</sup>. Nehinonska komponenta odbrambenog sekreta je poglavito bila predstavljena heksil-estrima nezasićenih i zasićenih masnih kiselina.

#### 4.2. Sastav odbrambenog sekreta analiziranih taksona

Kod svih devet analiziranih vrsta iz familije Julidae i Blaniulidae, kao i kod različitih analiziranih uzrasnih stadijuma tokom postembriogeneze vrste *Cylindroiulus boleti*, počev od stupnja III do stupnja XI, glavna komponenta odbrambenog sekreta je predstavljena grupom hinonskih jedinjenja.

Kod vrsta *Unciger transsilvanicus* i *Pachyiulus hungaricus*, kao i *Nopoiulus kochii* i *Cibiniulus phlepsii*, procentno najzastupljenija jedinjenja su bila 1,4-benzohinon (**1**) i 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), zajedno sa 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinom (**7**).

---

<sup>5</sup> t Supstance u tragovima, kasnije u Tabelama obeležene slovom t (engleski termin trace), su ona jedinjenja koja su u relativnom procentom sastavu odbrambenog sekreta bila zastupljena sa manje od 0,1%

Pored ova tri dominantna jedinjenja, u sastavu odbrambenog sekreta kod prethodno pomenutih vrsta identifikovani su i sledeći hinonski derivati: 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), hidrohinon (**8**), 2-metilhidrohinon (**11**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-1,4-benzohinon (**26**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2,3-dimetilhidrohinon (**18**) i 2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**23**). Kod vrste *Unciger transsilvanicus* takođe su izolovana i dva jedinjenja u okviru krezolne komponente: *p*-krezol (**5**) i fenol (**3**). Nehinonska jedinjenja predstavljaju procentno manje zastupljenu komponentu u odbrambenim sekretima i uključuju pojedine estre, alkohole i alkene (Tabela 3).

Međutim, od interesa je istaći da je kod ispitivanih vrsta roda *Serboiulus* i *Typhloiulus* hemijski sastav odbrambenog sekreta nešto drugačiji. Kao dominantna komponenta u sastavu analiziranog sekreta izolovano je jedinjenje 2-etil-1,4-benzohinon (**6**) (Tabela 4).

Komparacijom sa analiziranim adultnim jedinkama iz familija Julidae i Blaniulidae, uočen je sličan sastav hemijskih konstituenata iz sekreta ozadena i kod analiziranih postembrionalnih stupnjeva, s tim što je kod prvog stupnja koji je podvrgnut analizi (III) procentna zastupljenost nehinonske komponente bila značajno veća (73,3%), u odnosu na hinonska jedinjenja (26,7%), dok se kod kasnijih stupnjeva tokom postembriogeneze taj odnos menja. Kako se jedinka približa adultnom stupnju (XI) tako i procenat hinonskih jedinjenja raste (Tabela 5).

Tabela 3. Procentni sastav hinonskih i nehinonskih komponenti u odbrambenom sekretu odabranih predstavnika familija Julidae Leach, 1814 i Blaniulidae C. L. Koch, 1847.

Familija i Vrsta	Procentni sastav	
	Hinonske komponente	Nehinonske komponente
<b>Julidae</b> Leach, 1814		
<i>Unciger transsilvanicus</i> (Verhoeff, 1899)	77,0	23,0
<i>Pachyiulus hungaricus</i> (Karsch, 1881)	79,1	20,9
<b>Blaniulidae</b> C. L. Koch, 1847		
<i>Nopoiulus kochii</i> (Gervais, 1847)	92,0	8,0
<i>Cibiniulus phlepsii</i> (Verhoeff, 1897)	98,2	1,8

Tabela 4. Procentni sastav hinonskih i nehinonskih komponenti u odbrambenom sekretu odabranih predstavnika rodova *Serboiulus* Strasser, 1962 i *Typhloiulus* Latzel, 1884.

Familija Rod Vrsta	Procentni sastav	
	Hinonske komponente	Nehinonske komponente
<b>Julidae</b> Leach, 1814		
<b><i>Serboiulus</i></b> Strasser, 1962		
<i>Serboiulus lucifugus</i> Strasser, 1962	53,2	46,8
<i>Serboiulus deelemani</i> Strasser, 1972	56,5	43,4
<i>Serboiulus kresnik</i> Makarov, 2013	53,1	46,9
<b><i>Typhloiulus</i></b> Latzel, 1884		
<i>Typhloiulus nevoi</i> Makarov, Mitić & Ćurčić, 2002	36,2	63,8
<i>Typhloiulus serborum</i> Ćurčić & Makarov, 2005	73,6	26,4

Tabela 5. Procentni sastav hinonskih i nehinonskih komponenti u odbrambenom sekretu različitih postembrionalnih stupnjeva vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).

Postembrionalni stupanj	Procentni sastav	
	Hinonske komponente	Nehinonske komponenta
III	26,7	73,3
IV	86,6	13,4
V	91,3	8,7
VI	88,0	12,0
VII	84,7	15,3
VIII	80,9	19,1
IX	76,6	23,4
X	86,9	13,1
XI	82,9	17,1

#### 4.3. Odbrambene supstance predstavnika familije Julidae

Glavne komponente izolovane iz sekreta odbrambenih ozadena kod svih analiziranih predstavnika ove familije bili su hinoni, među koji su najzastupljeniji 1,4-benzohinon (**1**), toluhinon (**2**) i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**). Pored ovih jedinjenja identifikovani su i sledeći hinonski derivati: 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), hidrohinon (**8**), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2-metilhidrohinon (**11**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), etil-metil-1,4-benzohinon (**13**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**), 2,3-dimetilhidrohinon (**18**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2-etilhidrohinon (**20**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**), 2,3,5,6-tetrametilhidrohinon (**22**), 2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**23**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (**24**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (**25**) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (**26**). Nehinonska jedinjenja uključuju pojedine estre, alkohole i alkene.

Vrste *Unciger transsilvanicus* i *Pachyiulus hungaricus* poslužile su kao inicijalni model-sistem za ispitivanje najboljeg načina za pripremu uzoraka za hemijsku analizu,

prvenstveno zbog krupne veličine tela i relativno lake dostupnosti, odnosno lakog sakupljanja većeg količine materijala na terenu, kao i zbog već poznatog sastava sekreta koje su imale do tada ispitivane julidne vrste. Prisustvo hemijskog mehanizma odbrane kod Julida je bilo poznato još u XIX veku, ali bez precizne identifikacije jedinjenja u odbrambenim sekretima, dok su iz vrste *Julus terrestris* (Linnaeus, 1758) još 1900. god. Behal i Phisalix precizno izolovali 1,4-benzohinon.

#### 4.3.1. Odbrambene supstance vrste *Pachyiulus hungaricus*

Materijal koji je sadržavao po 15 adultnih mužjaka i ženki vrste *P. hungaricus* sakupljen je u Drugovačkoj šumi (Slika 10). Jedinke su zbog svoje veličine i velikog broja u uzorku lako transportovane do laboratorije, nakon čega je urađena specijska determinacija na osnovu građe gonopoda, i urađeno je razdvajanje po polovima. Nakon toga sakupljeni materijal je podvrgnut analizi. Takođe, urađene su disekcije vezikula odbrambenih žlezda, i određenih relevantnih telesnih segmenata, nakon toga su napravljene njihove skening elektronske mikrografije (Slike 11 i 12), dok je u narednom podpoglavlju detaljno opisan mehanizam izbacivanja sekreta putem ozopora (Slika 13).



Slika 10. Jedinka vrste *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881).

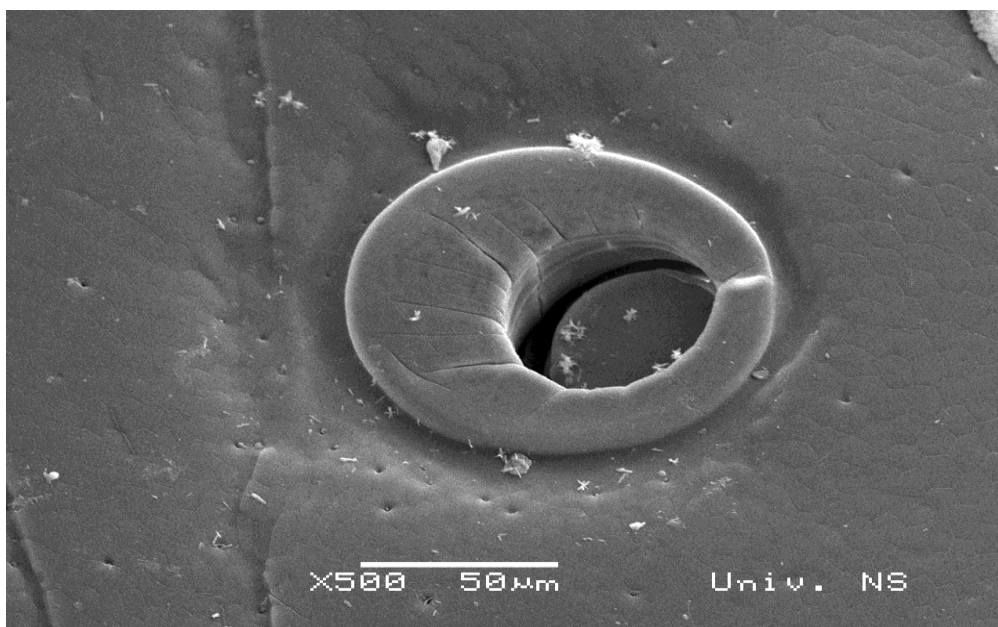
#### 4.3.1.1. Građa juliformnog tipa ozadena vrste *Pachyiulus hungaricus*

Vrsta *P. hungaricus* poseduje par odbrambenih žlezda (ozadena) juliformnog tipa (građa ovog tipa ozadena detaljno je opisana u poglavlju 2.4.) na većini pleuortergita (samo prvih pet somita, kao i poslednji nemaju ozadene). Ozadena se sastoji od tri dela. Prvi deo čini sfrični rezervoar glandularne funkcije (Slika 12). Čelije u zidu rezervoara sintetišu odbrambene fluide, koje se skladište u lumenu rezervoara. Drugi deo je eferetni kanal, koji povezuje rezervoar žlezde sa ozoporom. Kanal se sastoji od tubularnog bazalnog dela i specijalizovanog apikalnog dela, koji kontroliše izlučivanje odbrambenog sekreta. Ovaj apikalni deo poseduje kaudalni nastavak, koji u normalnim uslovima redukuje dijametar lumena kanala. Masivni mišić se nalazi uz ovaj nastavak i pričvršćen je uz telesni zid. Ova struktura sadrži i mehanizam za zatvaranje ozopore, predstavljen nastavkom nalik poklopcu koji je povezan sa masivnim mišićem. Ovaj nastavak u normalnim uslovima zatvara ozoporu, dok prilikom jakog spoljnog stimulusa (napad predatora), kontrakcije mišića povlače nastavak na dole i lateralno i dolazi do otvaranja ozopore. U isto vreme, nastavak apikalnog dela kanala omogućava otvaranje kanala, njegov volumen se širi, i dolazi do izlučivanja sekreta. Treći deo ozadene čine ozopore, postavljene lateralno, između prozonita i metazonita. Sastoje se od cilindričnog otvora okruženog areolom (Slika 13). Areola je nesimetričana i kaudalni deo je skoro dva puta tanji od apikalnog.

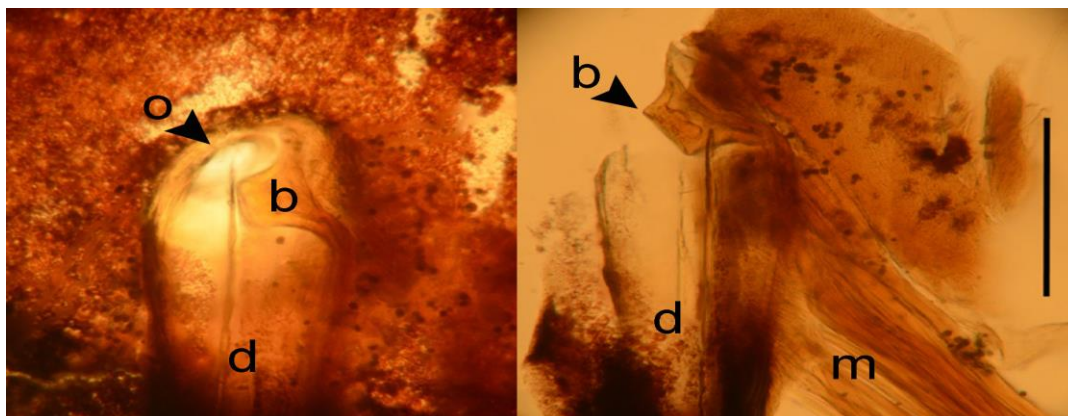
Sličan tip juliformnih ozopora je opisan kod vrste *Floridobolus penneri* Causey, 1957 od strane Eisnera i saradnika (1998). Međutim, mehanizam zatvaranja ozopore je kod pomete vrste drugačiji u poređenju sa onim kod *P. hungaricus*. Terminalni delovi eferentog kanala kod *F. penneri* formiraju valvu sa mišićem koji služi za njeno otvaranje. Ovakav tip mehanizma zatvaranja ozopore je drugačiji od mehanizma opisanog u okviru naših rezultata.



Slika 11. SEM ozadene vrste *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881).



Slika 12. SEM ozopore vrste *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881).



Slika 13. Apikalni deo izvodnog kanala ozadene vrste *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881). o = ozopora; b = zatvarač ozopore; d = kanal; m = mišić.

Gasni hromatogrami ukupnog metilen-hloridnog ekstrakta ove vrste detektovani preko plamenojonizujućeg detektora (FID, Slika 14) i masenog spektrometra (GC-MS) pokazali su prisustvo jedinjenja 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**) kao glavne komponente sekreta dobijenog ekstrakcijom metilen-hloridom.

U Tabeli 6 prikazan je procentni sastav hinonskih i nehinonskih derivata u metilen- hloridnom ekstraktu odbrambenog sekreta vrste *P.hungaricus*.

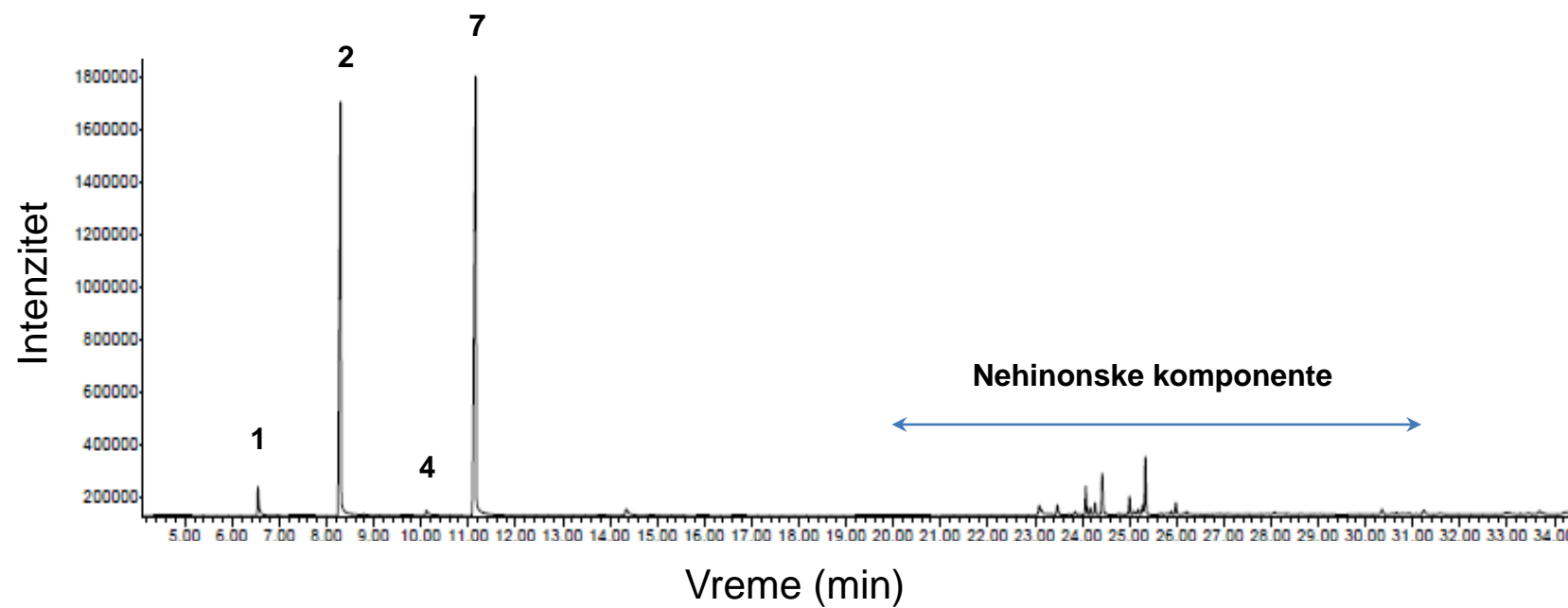
Tabela 6. Sastav metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) analiziran GC-FID i GC-MS tehnikama.

Rt (min) <sup>6</sup>	Jedinjenja	Procenti sastav (%) <sup>7</sup>
5,7	<b>1</b> 1,4-Benzohinon	2,2
7,4	<b>2</b> 2-Metil-1,4-benzohinon	40,0
9,1	<b>4</b> 2-Hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	0,4
10,2	<b>7</b> 2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	48,4
10,8	<b>8</b> Hidrohionon	2,0
12,5	<b>11</b> 2-Metilhidrohionon	3,9
12,9	<b>12</b> 2,3-Dimetoksihidrohionon	0,1
13,2	<b>15</b> 2-Metil-3,4-metilendioksifenol	0,9
13,6	<b>17</b> 2-Metoksi-3-metilhidrohionon	2,1

<sup>6</sup>:Retenciono vreme u minutima (eng. Retencion time);

<sup>7</sup>:Procentni sastav hinonskih komponenti određen GC-FID tehnikom izračunat na osnovu površine GC-signalu u ukupnoj površini svih signala.





Slika 14. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881).

Iz metilen-hloridnog ekstrakta (odbrambenog sekreta) ove vrste uz pomoć GC-FID i GC-MS tehnika okarakterisano je devet benzohinonskih derivata: 1,4-benzohinon (**1**), 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), hidrohinon (**8**), 2-metilhidrohinon (**11**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**) i 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**).

Potrebno je napomenuti da većina masenih spektara ovih jedinjenja nije dala dobro slaganje sa spektrima iz dostupnih biblioteka, a takođe, nije bilo jednostavno doći do literaturnih podataka. Stoga se identifikacija većine jedinjenja zasnivala na razmatranju mehanizama fragmentacije i analizi NMR spektara.

Na osnovu GC-FID, GC-EI-MS i GC-CI-MS spektara metilen-hloridnih ekstrakata identifikovane su odbrambene supstance koje pripadaju hinonskim i hidrohinonskim jedinjenjima. Ove dve grupe jedinjenja možemo razlikovati i preko reakcije sa reagensima za silanizovanje, kao što je *N,O*-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamid (BSTFA). Tako, razlike između hromatograma metilen-hloridnih ekstrakata pre i posle ove derivatizacije mogu pokazati prisustvo ili odsustvo hidroksilne funkcionalne grupe. Ako posle reakcije silanizovanja pik nepoznatog jedinjenja ostaje na istom retencionom vremenu, on nema hidroksilnu funkcionalnu grupu, to jest, on potiče od hinona, a ukoliko pik nepoznatog jedinjenja nestane nakon derivatizacije, a pojavi se novi pik koji potiče od trimetil-silil-derivata, onda se tu radi o hidrohinonu ili hinonu sa dodatnom hidroksilnom grupom (Vujisić, 2013). Hemijska jonizacija silanizovanih i nesilanizovanih uzoraka omogućava nam da pojavom protonovanih molekula  $[M+H]^+$ , utvrdimo razliku u masama tih jona. Razlika od 72 jedinice mase ( $C_3H_8Si$ ) javlja se kod jedinjenja sa jednom hidroksilnom grupom (monohidroksihinon), a razlika od 144 ( $2 \times C_3H_8Si$ ), kod jedinjenja sa dve hidroksilne grupe (hidrohinon) i tako dalje.

Pored hinonskih derivata odbrambeni sekret ove analizirane vrste sadržavao je i nehinonske derivate koji su se mogli uočiti u GC-FID i GC-MS hromatogramima metilen-hloridnih ekstrakata. Na osnovu masenih spektara moguće je potvrditi da se radi o heksil-estrima zasićenih i nezasićenih masnih kiselina niza od 14 - 20 C atoma.

#### 4.3.2 . Odbrambene supstance vrste *Unciger transsilvanicus*

Ova vrsta široko je rasprostranjena na teritoriji Srbije, kao i u severnom, zapadnom, centralnom i južnom delu evropskog kontinenta.

GC-FID i GC-MS hromatogrami ukupnog metilen-hloridnog ekstrakta ove vrste (Slika 15) pokazali su prisustvo 2-metil-1,4-benzohinona (**2**) kao glavne komponente odbrambenog sekreta dobijenog ekstrakcijom metilen-hloridom.

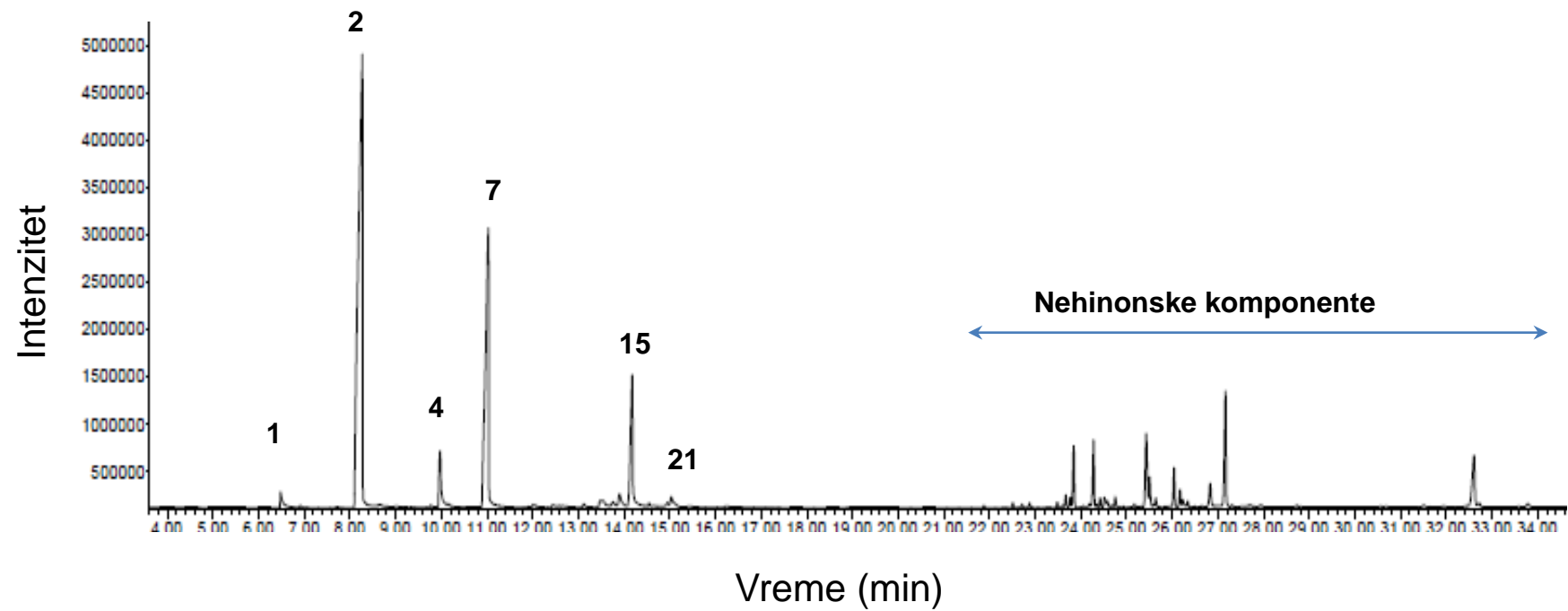
U Tabeli 7 prikazan je procetni sastav kako hinonske, tako i krezolne i nehinonske komponente koja je identifikovana nakon GC- MS analiza metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Unciger transsilvanicus*.

Tabela 7. Sastav metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Unciger transsilvanicus* (Verhoeff, 1899) analiziran GC-FID i GC-MS tehnikama.

<b>Rt (min)<sup>5</sup></b>		<b>Jedinjenja</b>	<b>Procenti sastav (%)<sup>6</sup></b>
6,5	<b>1</b>	1,4-Benzohinon	1,3
7,7	<b>3</b>	Fenol	0,1
8,2	<b>2</b>	2-Metil-1,4-benzohinon	56,2
9,3	<b>5</b>	<i>p</i> -Krezol	t
9,8	<b>6</b>	2-Etil-1,4-benzohinon	0,1
10,0	<b>4</b>	2-Hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	3,2
11,0	<b>7</b>	2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	26,1
12,0	<b>26</b>	2-Metoksi-1,4-benzohinon	0,2
12,4	<b>8</b>	Hidrohinon	0,4
13,1	<b>14</b>	2,3-Dimetoksi-1,4-benzohinon	0,2
13,3	<b>11</b>	2-Metilhidrohinon	1,0
13,8	<b>12</b>	2,3-Dimetoksihidrohinon	0,9
14,0	<b>15</b>	2-Metil-3,4-metilendioksifenol	9,0
14,4	<b>19</b>	2,3-Dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon	0,1
14,9	<b>21</b>	2,3-Dimetoksi-5-metilhidrohinon	1,2

<sup>5</sup>: Retenciono vreme u minutima (eng. Retencion time);

<sup>6</sup>: Procetni sastav hinonskih komponenti određen GC-FID tehnikom izračunat na osnovu površine GC-signala u ukupnoj površini svih signala.



Slika 15. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Unciger transsilvanicus* (Verhoeff, 1899).

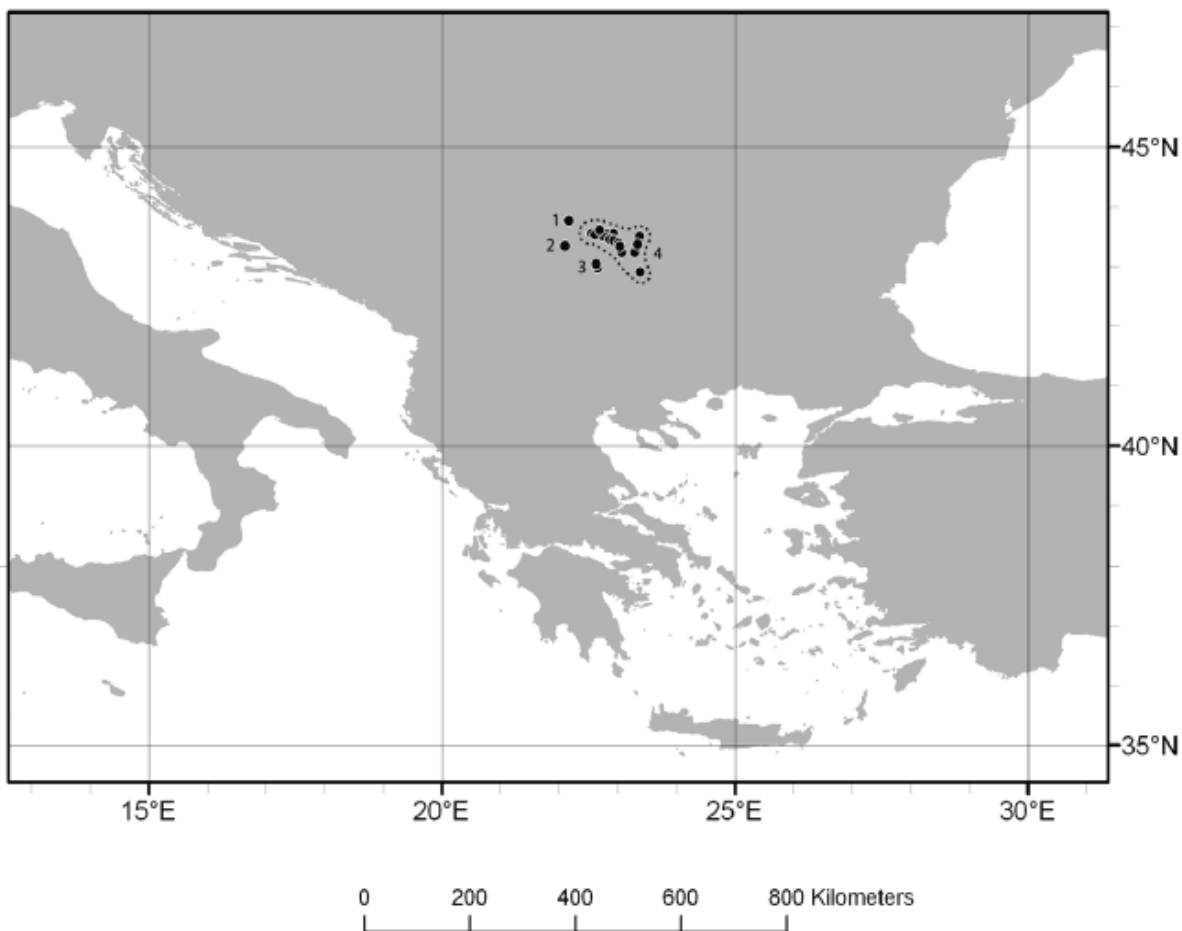
Analizom metilen-hloridnog ekstrakta ove vrste identifikovano je 13 različitih hinonskih derivata, od kojih su najzastupljeniji 2-metil-1,4-benzohinon (**2**) sa 56,2%, kao i jedinjenje **7** sa 26,1%. Pored ova dva identifikovana su i sledeća hinonska jedinjenja: 1,4-benzohinon (**1**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), hidrohion (**8**), 2-metilhidrohion (**11**), 2,3-dimetoksihidrohion (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohion (**21**) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (**26**). Ovakvi rezultati pokazali su sličnost sa rezultatima dobijenim analizom odbrambenog sekreta vrste *Pachyiulus hungaricus*, što generalno potkrepljuje shvatanje i hinonskoj konzistenciji julidnih diplopoda, odnosno postojanju "hinonske klade" diplopoda.

Značajno je pomenuti da su iz sekreta ove vrste izolovani *p*-krezol (**5**) i fenol (**3**) kao jedinjenja u tragovima, koji su do sada u okviru reda Julida još jedino identifikovani kod vrste *Oriulus venustus* (Wood 1864) iz familije Parajulidae (Eisner et al., 1978).

Od interesa je istaći da su kao nehinonske komponente registrovani i izoamil (izopentil) estri zasićenih i nezasićenih masnih kiselina C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>, od kojih je najzastupljeniji izopentileikozenoat. Po prvi put je kod diplopoda identifikovan i izopentil-heksa-kozatetranoat.

#### 4.3.3. Odbrambene supstance vrste *Serboiulus lucifugus*

Rod *Serboiulus* Strasser, 1962 obuhvata kavernikolne diplopode, bez očiju, i sa manje ili više izraženom pigmentacijom telesnih segmenata. Biogeografski ovaj rod predstavlja Karpatski i Balkanski element, endemičan za Balkansko poluostrvo, čija je evolucija najverovnije usko povezana sa geotektonskim promenama na Karpatsko-Balkanskom području u prošlosti. Distribucija ovog roda na teritoriji Srbije data je na Slici 16. Vrsta *Serboiulus lucifugus* (Slika 17) je endemit Srbije i do sada je poznata jedino iz nekoliko pećinskih sistema na Svrljiškim planinama.



Slika 16. Distribucija roda *Serboiulus* Strasser, 1962. 1. *Serboiulus kresnik* Makarov, 2013; Gornja Lenovačka Pećina, selo Lenovac, okolina Zaječara, Planina Tupižnica; 2. *Serboiulus lucifugus* Strasser, 1962; Prekonoška Pećina, selo Prekonoga, okolina Svrlijga, Svrlijske Planine; 3. *Serboiulus deelemani* Strasser, 1972; Pećina Vetrena Dupka, selo Vlasi, okolina Pirota; Pećina Velika Pećina, selo Donja Držina, okolina Pirota; 4. *Serboiulus spelaeophilus* Gulička, 1967; brojne pećine na Staroj planini i u nekim pećinama na ivici Panonskog basena.

GC-FID i GC-MS hromatogrami vrste *S. lucifugus* (Slika 18) pokazali su prisustvo jedinjenja 2-etil-1,4-benzohinona (**6**) kao glavne komponente odbrambenog sekreta dobijenog ekstrakcijom metilen-hloridom, dok je drugo po zastupljenosti jedinjenje 2-metil-1,4-benzohinon (**2**).



Slika 17. *Serboiulus lucifugus* Strasser, 1962, ženka, Prekonoška Pećina, selo Prekonoga, okolina Svrljiga, Svrljiške Planine (slikao D. Antić).

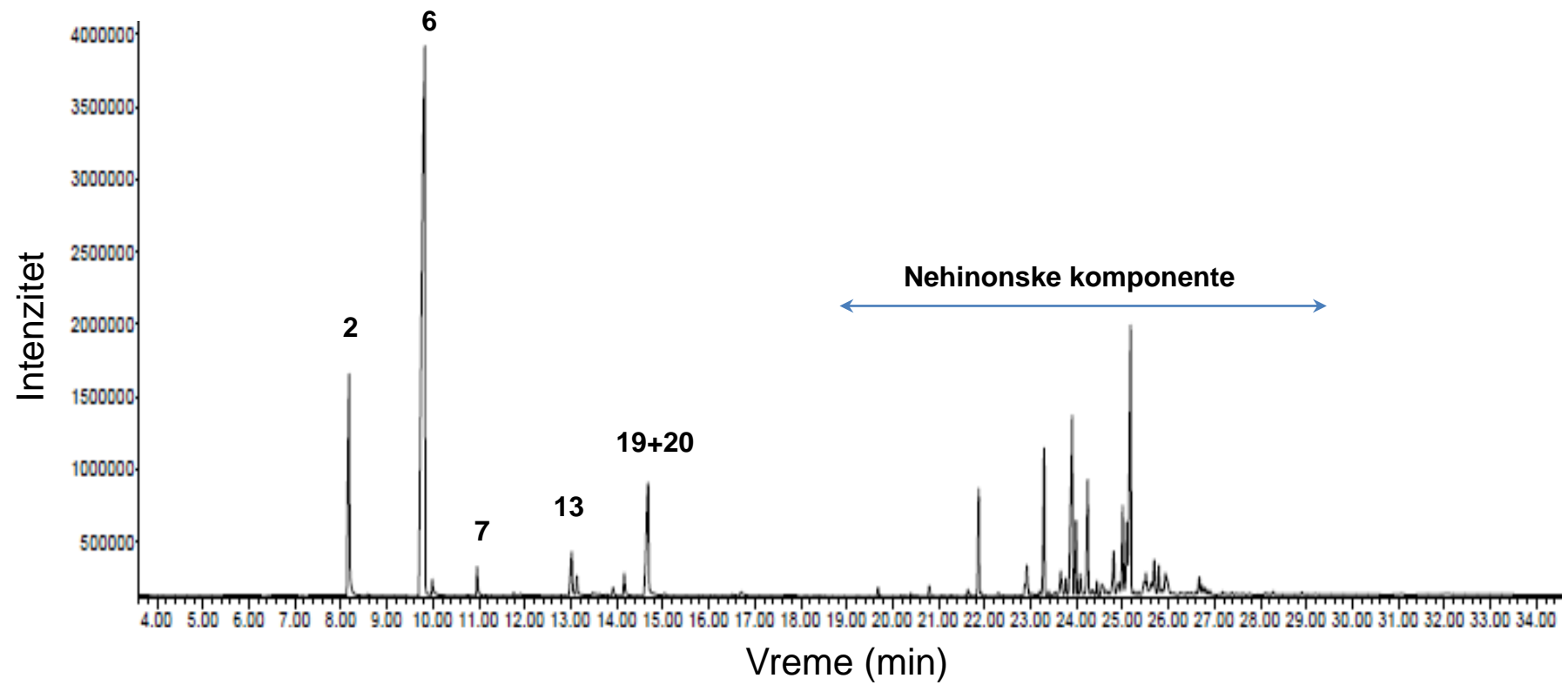
U Tabeli 8. prikazan je procenti sastav hinonskih i nehinonskih derivata koji su identifikovani u sekretu ove kavernikolne vrste stonoga.

Tabela 8. Sastav metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Serboiulus lucifugus* Strasser, 1962 analiziran GC-FID i GC-MS tehnikama.

Rt (min) <sup>5</sup>		Jedinjenja	Procenti sastav (%) <sup>6</sup>
8,2	<b>2</b>	2-Metil-1,4-benzohinon	14,6
9,8	<b>6</b>	2-Etil-1,4-benzohinon	66,3
9,9	<b>4</b>	2-Hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	0,8
11,0	<b>7</b>	2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	1,4
11,9	<b>10</b>	2-Etil-3-metoksi-1,4-benzohinon	0,1
13,0	<b>13</b>	Etil-metil-1,4-benzohinon	3,3
13,1	<b>14</b>	2,3-Dimetoksi-1,4-benzohinon	1,0
13,3	<b>11</b>	2-Metilhidrohinon	0,1
13,8	<b>12</b>	2,3-Dimetoksihidrohinon	0,4
14,0	<b>15</b>	2-Metil-3,4-metilendioksifenol	1,2
14,4	<b>19, 20</b>	2,3-Dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon + Etilhidrohinon	10,7
14,9	<b>21</b>	2,3-Dimetoksi-5-metilhidrohinon	0,1

<sup>5</sup>: Retenciono vreme u minutima (eng. Retention time);

<sup>6</sup>: Procentni sastav hinonskih komponenti određen GC-FID tehnikom izračunat na osnovu površine GC-signalu u ukupnoj površini svih signala.



Slika 18. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Serboiulus lucifugus* Strasser, 1962.



Pomoću GC-FID i GC-MS analize metilen-hloridnog ekstrakta odbrambenog sekreta ove vrste identifikovano je 12 hinonskih jedinjenja, koja pokazuju slaganje sa podacima prethodno identifikovanih hinonskih jedinjenja iz vrsta *P. hungaricus* i *U. transsilvanicus*. Kao glavna hinonska komponenta sekreta vrste *S. lucifugus* izdvaja se 2-etil-1,4-benzohinon (6), a pored ovog jedinjenja identifikovani su i sledeći hinoni: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (2), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (4), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (10), 2-metilhidrohinon (11), 2,3-dimetoksihidrohinon (12), etil-metil-1,4-benzohinon (13), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (14), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (19), 2-etilhidrohinon (20), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (21). Nehinonska komponenta se sastoji od heksil estara nezasićenih i zasićenih masnih kiselina. Za razliku od prethodne dve analizirane vrste iz porodice Julidae: *P. hungaricus* i *U. transsilvanicus*, kod kojih je relativna procentna zastupljenost nehinonske komponente iznosila 20,9% i 23,0%, kod vrste *S. lucifugus* nehinonski derivati su procentno zastupljeni sa 46,8% u ukupnom sastavu odbrambenog sekreta.

#### 4.3.4. Odbrambene supstance vrste *Serboiulus deelemani*

Uzorak još jedne endemične kavernikolne vrste *Serboiulus deelemani*, rasprostranjene na teritoriji istočne Srbije, podvrgnut je GC-MS analizama. Izgled jedinke ove vrste prikazan je ispod na Slici 19.



Slika 19. *Serboiulus deelemani* Strasser, 1972, mužjak; Pećina Vetrena Dupka, selo Vlasi, okolina Pirota (slikao D. Antić).

GC-FID i GC-MS hromatogrami ukupnog metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Serboiulus deelemani* (Slika 20.) pokazali su prisustvo 2-etil-1,4-benzohinona (**6**) kao glavne komponente odbrambenog sekreta dobijenog ekstrakcijom metilen-hloridom, a takođe je dominantno i jedinjenje 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), kao i jedinjenje 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**). Identifikovani su i sledeći hinonski derivati: 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2-metilhidrohinon (**11**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2-etilhidrohinon (**20**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**) i 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (**25**). U sastavu odbrambenog sekreta vrste *Serboiulus deelemani* izolovana je i krezolna komponenta: *p*-krezol (**5**) i *p*-etilfenol (**9**).

U Tabeli 9 prikazan je procetni sastav hinonskih, krezolnih i nehinonskih jedinjenja izolovan iz metilen-hloridnog ekstrakta ove vrste, sa jedinjenjem **6** kao glavnom komponentom.

Tabela 9. Sastav metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Serboiulus deelemani* Strasser, 1972 analiziran GC-FID i GC-MS tehnikama.

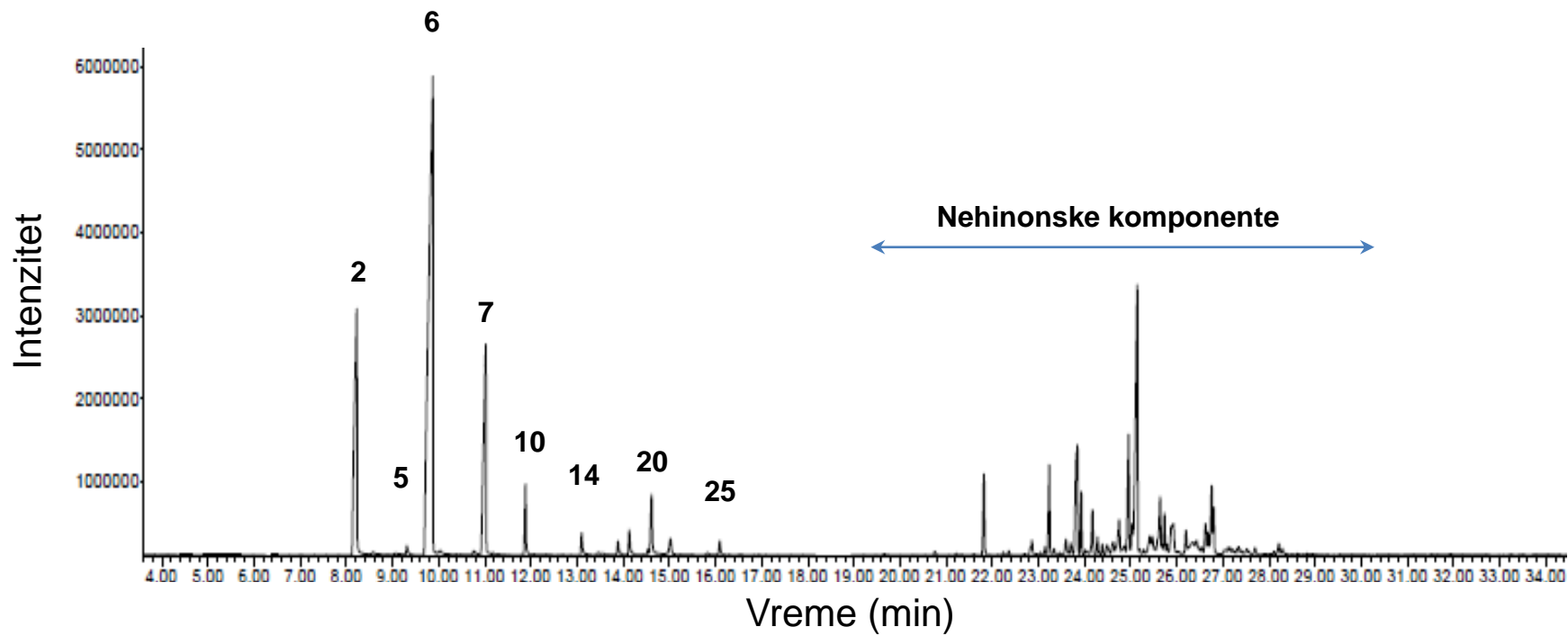
Rt (min) <sup>5</sup>		Jedinjenja	Procenti sastav (%) <sup>6</sup>
8,2	<b>2</b>	2-Metil-1,4-benzohinon	18,8
9,3	<b>5</b>	<i>p</i> -Krezol	0,4
9,9	<b>6</b>	2-Etil-1,4-benzohinon	56,7
10,8	<b>9</b>	<i>p</i> -Etilfenol	0,2
11,0	<b>7</b>	2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	14,4
11,9	<b>10</b>	2-Etil-3-metoksi-1,4-benzohinon	2,4
13,1	<b>14</b>	2,3-Dimetoksi-1,4-benzohinon	0,9
13,3	<b>11</b>	2-Metilhidrohinon	0,2
13,8	<b>12</b>	2,3-Dimetoksihidrohinon	0,6
14,0	<b>15</b>	2-Metil-3,4-metilendioksifenol	1,0
14,4	<b>19</b>	2,3-Dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon	0,2
14,6	<b>20</b>	2-Etilhidrohinon	2,7
14,9	<b>21</b>	2,3-Dimetoksi-5-metilhidrohinon	0,8
16,0	<b>25</b>	2,3-Dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon	0,6

<sup>5</sup>: Retenciono vreme u minutima (eng. Retention time);

<sup>6</sup>: Procetni sastav hinonskih komponenti određen GC-FID tehnikom izračunat na osnovu površine GC-signalu u ukupnoj površini svih signala.

Dobijeni rezultati pokazuju sličan sadržaj hinonskih jedinjenja kao i kod prethodno analizirane vrste roda *Serboiulus*. Jedinjenje **6** i u slučaju ove ispitivane vrste dominira u relativnom procentnom sastavu odbrambenog sekreta, sa zastupljenošću od 56,7%, a takođe je dominantna i frakcija 2-metil-1,4-benzohinona (**2**), kao i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinona (**7**). Kao minorne komponente pojavljuju se i *p*-krezol (**5**) i *p*-etilfenol (**9**).

Nehinonska komponenta se sastoji od heksil estara nezasićenih i zasićenih masnih kiselina, koja je zastupljena sa 43,4% u ukupnom procentnom sastavu analiziranog sekreta.



Slika 20. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Serboiulus deelemani* Strasser, 1972.

#### 4.3.5. Odbrambene supstance vrste *Serboiulus kresnik*

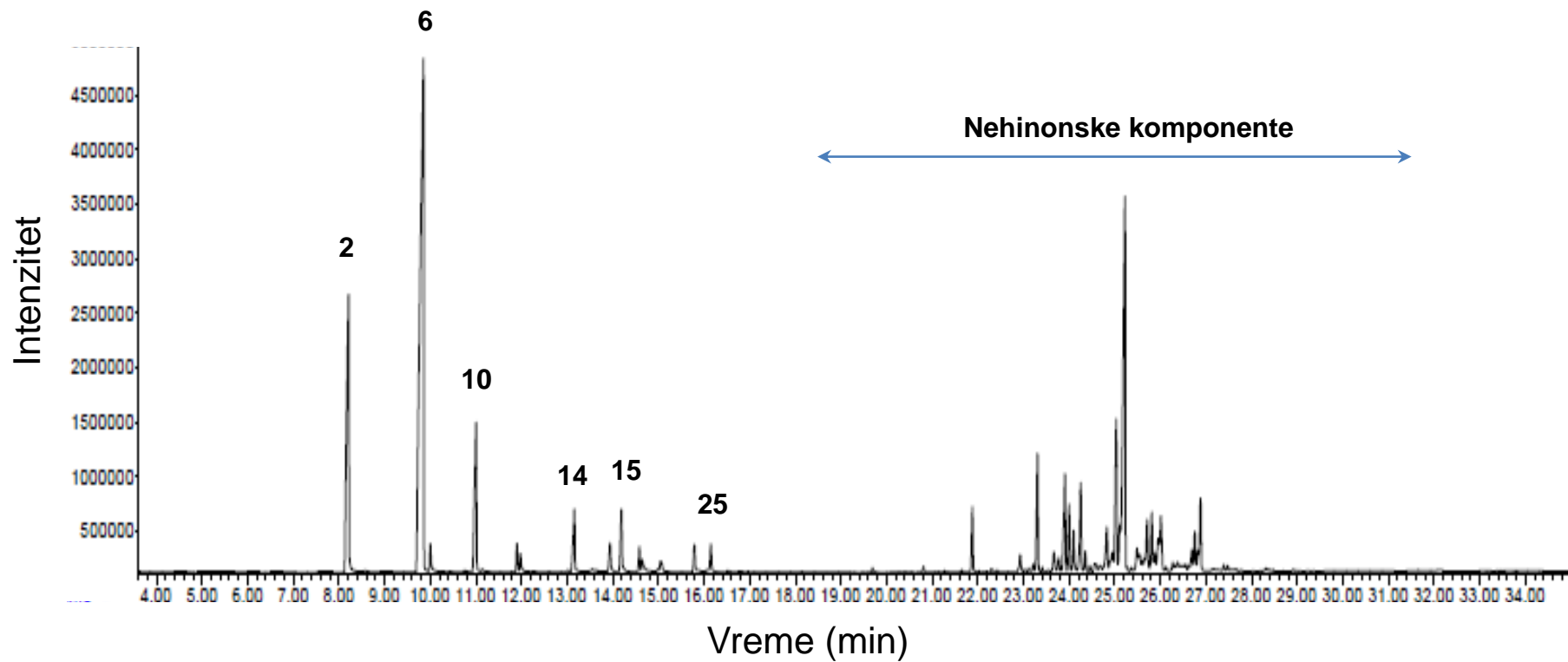
U Lenovačkoj pećini u selu Lenovac kod Zaječara su prikupljene kavernikolne julide koje su podvrgnute analizi sastava odbrambenog sekreta. Rezultati su nagovestili da se moguće radi o novoj formi. Nakon detaljne uporedno morfološke analize ovakva pretpostavka je potvrđena i opisan je novi takson: *Serboiulus kresnik* Makarov, 2013 (Slika 21. i Slika 22.; Sekulić et al., 2013). Detaljno opisivanje nove vrste urađeno je prema kriterijumima koje su ustanovili Strassera (1962) i Makarov (2005) za rod *Serboiulus*.



Slika 21. *Serboiulus kresnik* Makarov, 2013, paratip mužjak; Gornja Lenovačka Pećina, selo Lenovac, okolina Zaječara, Planina Tupižnica (slikao D. Antić).



Slika 22. *Serboiulus kresnik* Makarov, 2013; paratip ženka; Gornja Lenovačka Pećina, selo Lenovac, okolina Zaječara, Planina Tupižnica; 9. Somit XV, alotip ženka, posteriorno (skala = 1mm) (slikao D. Antić).



Slika 23. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Serboiulus kresnik* Makarov, 2013.

GC-FID i GC-MS hromatogrami ukupnog metilen-hloridnog ekstrakta vrste *S. kresnik* (Slika 23) pokazali su prisustvo 2-etil-1,4-benzohinona (**6**) kao glavne komponente odbrambenog sekreta, sa procentnom zastupljenošću od 48,5%. Drugo jedinjenje po zastupljenosti je 2-metil-1,4-benzohinon (**2**) sa 25,0% u ukupnom sastavu analiziranog sekreta.

Tabela 10. Sastav metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Serboiulus kresnik* Makarov, 2013 analiziran GC-FID i GC-MS tehnikama.

<b>Rt (min)<sup>5</sup></b>		<b>Jedinjenja</b>	<b>Procenti sastav (%)<sup>6</sup></b>
8,2	<b>2</b>	2-Metil-1,4-benzohinon	25,0
9,8	<b>6</b>	2-Etil-1,4-benzohinon	48,5
9,9	<b>4</b>	2-Hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	2,0
11,0	<b>7</b>	2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	7,0
11,9	<b>10</b>	2-Etil-3-metoksi-1,4-benzohinon	0,8
12,0	<b>26</b>	2-Metoksi-1,4-benzohinon	0,6
13,0	<b>13</b>	Etil-metil-1,4-benzohinon	1,1
13,1	<b>14</b>	2,3-Dimetoksi-1,4-benzohinon	4,0
13,3	<b>11</b>	2-Metilhidrohinon	0,2
13,5	<b>16</b>	2-Metoksi-5-metilhidrohinon	0,1
13,8	<b>12</b>	2,3-Dimetoksihidrohinon	1,3
14,0	<b>15</b>	2-Metil-3,4-metilendioksifenol	4,0
14,4	<b>19</b>	2,3-Dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon	1,3
14,6	<b>20</b>	2-Etilhidrohinon	0,9
14,9	<b>21</b>	2,3-Dimetoksi-5-metilhidrohinon	0,6
15,8	<b>24</b>	2,3-Dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon	1,6
16,1	<b>25</b>	2,3-Dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon	1,0

U Tabeli 10. dat je sadržaj jedinjenja na osnovu površina pikova u GC-FID hromatogramu. Na osnovu podataka iz Tabele 10. može se uočiti da je kod ove vrste identifikovano čak 17 hinonskih jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-

<sup>5</sup>: Retenciono vreme u minutima (eng. Retencion time);

<sup>6</sup>: Procentni sastav hinonskih komponenti određen GC-FID tehnikom izračunat na osnovu površine GC-signalu u ukupnoj površini svih signala.

metil-1,4-benzohinon (4), 2etil-1,4-benzohinon (6), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (10), 2-metilhidrohinon (11), 2,3-dimetoksihidrohinon (12), etil-metil-1,4-benzohinon (13), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (14), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (16), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (19), 2-etilhidrohinon (20), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (21), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (24), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (25) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (26). Preovlađujući hinon u ukupnom sastavu odbrambenog sekreta bio je 2-etil-1,4-benzohinon (6). Posmatrajući i dve prethodno analizirane vrste može se reći da je ovo jedinjenje najdominantniji hinonski derivat u sastavu sekreta kod predstavnika roda *Serboiulus*.

Nehinonska komponenta sekreta vrste *S. kresnik* se sastoji od heksil estara zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, i zastupljena je sa 46,9% u ukupnom procentom sastavu odbrambenog sekreta.

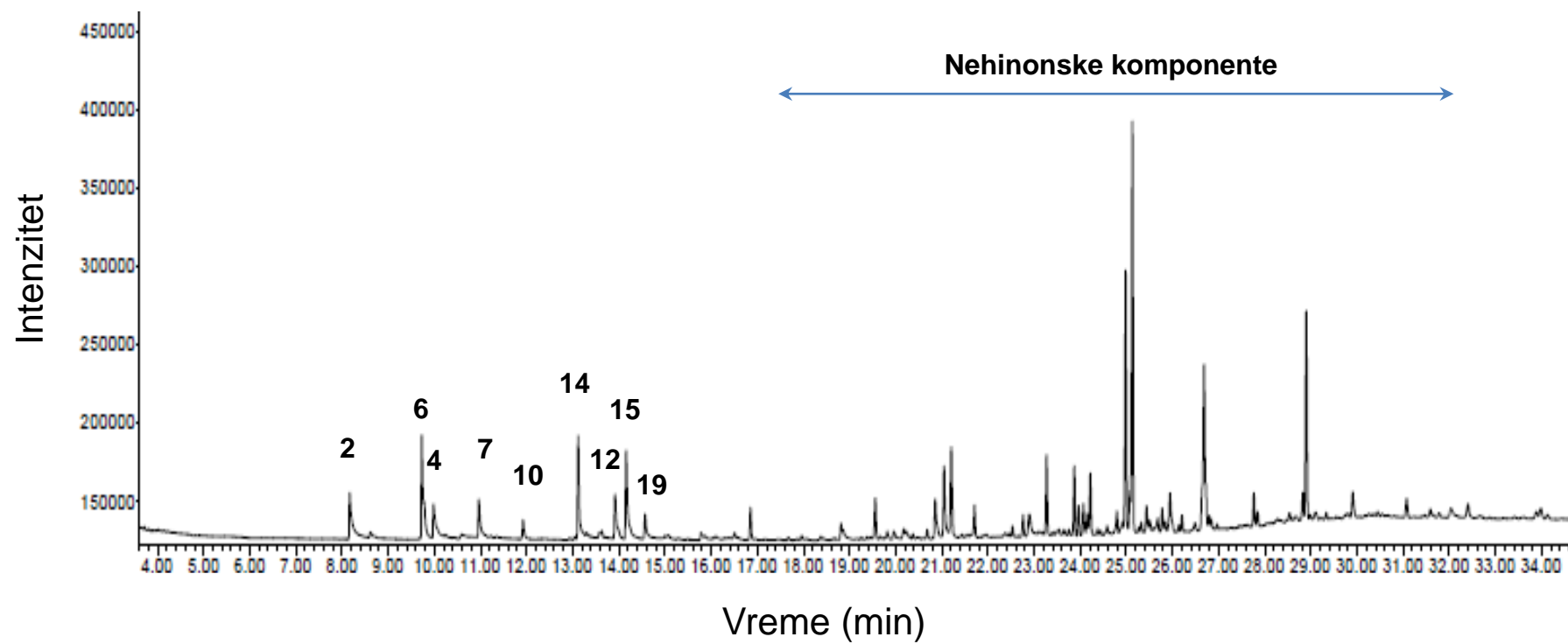
#### 4.3.6. Odbrambene supstance vrste *Typhloiulus nevoi*

Rod *Typhloiulus* Latzel, 1884 obuhvata 33 vrste od kojih je većina bez izražene pigmentacije tela, bez očiju, sa izmenjenim određenim delovima usnog aparata i dugim nogama (Mauriès et al., 1997). Distribuirane su od severne Italije i Slovenije na zapadu, do Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Mađarske, Srbije, Crne Gore, Makedonije, Albanije, Rumunije, Bugarske i Grčke na istoku i jugu. Na teritoriji Srbije je rasprostranjeno pet vrsta ovog roda: *Typhloiulus albanicus* Attems, 1929, *T. incurvatus* Verhoeff, 1899, *T. strictus* (Latzel, 1882), *T. nevoi* Makarov, Mitić & Ćurčić, 2002 i *T. serborum* Ćurčić & Makarov, 2005.

Vrsta *Typhloiulus nevoi* je kavernikolna i predstavlja endemit teritorije naše zemlje.

GC-FID i GC-MS hromatogrami ukupnog metilen-hloridnog ekstrakta vrste *T. nevoi* (Slika 24) pokazali su prisustvo 2-etil-1,4-benzohinona (6) kao glavne komponente odbrambenog sekreta dobijenog ekstrakcijom metilen-hloridom, a takođe su dominantna i jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (2), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (14) i 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15).





Slika 24. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Typhloiulus nevoi* Makarov, Mitić & Ćurčić, 2002.

U Tabeli 11. prikazan je procetni sastav svih jedinjenja identifikovanih iz odbrambenog sekreta ove pečinske vrste diplopoda.

Tabela 11. Sastav metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Typhloiulus nevoi* Makarov, Mitić & Ćurčić, 2002 analiziran GC-FID i GC-MS tehnikama.

Rt (min) <sup>5</sup>		Jedinjenja	Procenti sastav (%) <sup>6</sup>
8,2	<b>2</b>	2-Metil-1,4-benzohinon	11,4
9,8	<b>6</b>	2-Etil-1,4-benzohinon	22,7
9,9	<b>4</b>	2-Hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	8,1
11,0	<b>7</b>	2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	6,7
11,9	<b>10</b>	2-Etil-3-metoksi-1,4-benzohinon	3,0
13,1	<b>14</b>	2,3-Dimetoksi-1,4-benzohinon	15,9
13,8	<b>12</b>	2,3-Dimetoksihidrohinon	9,9
14,0	<b>15</b>	2-Metil-3,4-metilendioksifenol	18,5
14.4	<b>19</b>	2,3-Dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon	3,8

Nakon GC-FID i GC-MS analize metilen-hloridnog ekstrakta odbrambenog sekreta ove vrste identifikovano je devet hinonskih supstanci: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**). Kao i kod prethodno analiziranih vrsta roda *Serboiulus*, i u sastavu odbrambenog sekreta ove vrste roda *Typhloiulus* najzastupljnija je frakcija jedinjenja 2-etil-1,4-benzohinon (**6**). Pored ovog jedinjenja, sa 18,5% zastupljeno je jedinjenje 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**).

Jedino u slučaju ove vrste nehinonski derivati su više zastupljeni u ukupnom sastavu odbrambenog sekreta, sa 63,8%, u odnosu na hinonske derivate (36,2%). Nehinonska komponenta se sastoji od heksil estara zasićenih masnih kiselina i alkana dugog niza.

<sup>5</sup>: Retenciono vreme u minutima (eng. Retencion time);

<sup>6</sup>: Procetni sastav hinonskih komponenti određen GC-FID tehnikom izračunat na osnovu površine GC-signalu u ukupnoj površini svih signala.

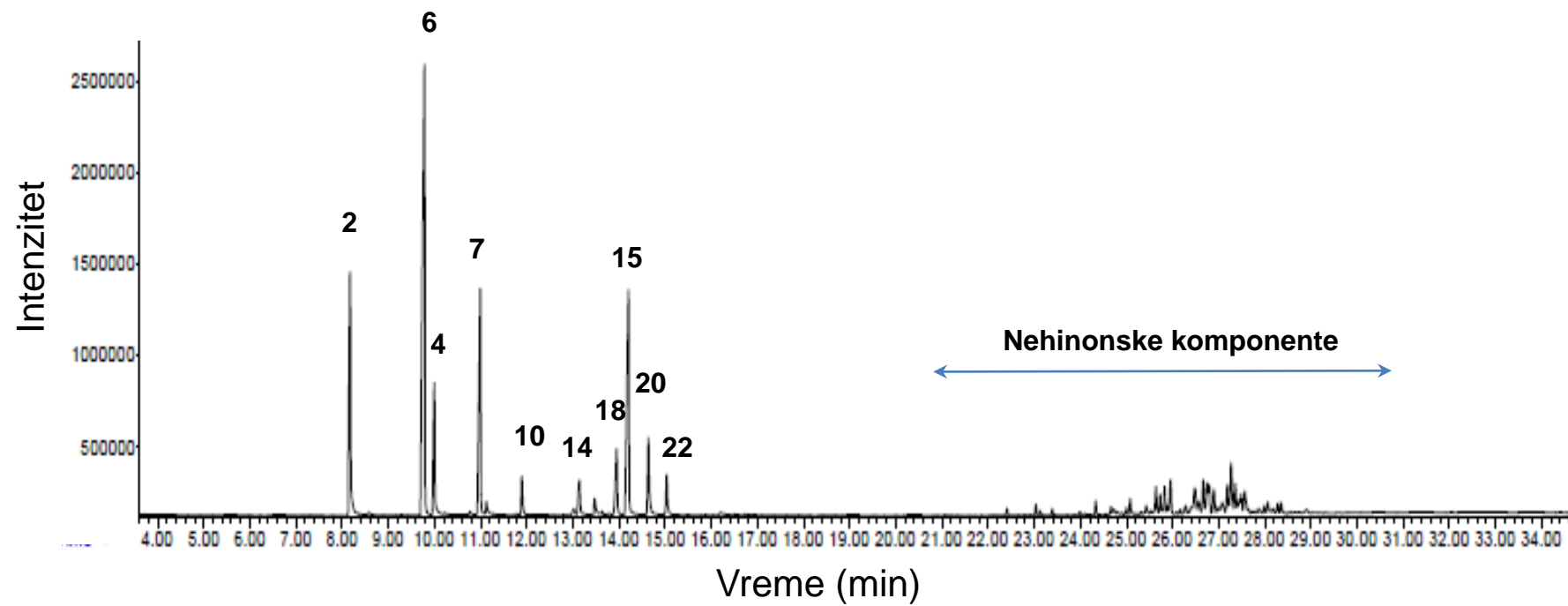
#### 4.3.7. Odbrambene supstance vrste *Typhloiulus serborum*

Kavernikolna vrsta *Typhloiulus serborum* je sakupljena u pećinskom sistemu Samar u okolini Niša. Ova vrsta je takođe endemit teritorije Srbije.

GC-FID i GC-MS hromatogrami ukupnog metilen-hloridnog ekstrakta vrste *T. serborum* (Slika 25) pokazali su prisustvo 2-etil-1,4-benzohinona (**6**) kao glavne komponente odbrambenog sekreta dobijenog ovom ekstrakcijom, a takođe su dominantni i 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**) i 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**).

Na osnovu rezultata ove analize u Tabeli 12 prikazan je procentni sastav svih identifikovanih jedinjenja iz hinonske i krezolne komponente odbrambenog sekreta. Ukupno je identifikovano 11 hinonskih derivata, sa 2-etil-1,4-benzohinom (**6**), kao najzastupljenijim jedinjenjem. Pored ovog hinona u analiziranom sekretu su identifikovani i sledeći: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2-metilhidrohinon (**11**), etil-metil-1,4-benzohinon (**13**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2,3-dimetilhidrohinon (**18**), 2-etilhidrohinon (**20**) i 2,3,5,6-tetrametilhidrohinon (**22**). Jedinjenje **22** predstavlja novu hinonsku komponentu identifikovanu u okviru odbrambenog sekreta. Za razliku od vrste *T. nevoi*, kod *T. serborum* u odbrambenom sekretu su identifikovani *p*-krezol (**5**) i *p*-etilfenol (**9**) kao minorne komponente; značaj njihovog prisustva diskutovan je u narednom poglavlju.

Nehinonska komponenta vrste *T. serborum* sastoji se od heksil estara zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, i zastupljena je sa 26,4 % u ukupnom procentom sastavu sekreta podvrgnutog GC-MS analizi.



Slika 25. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Typhloiulus serborum* Ćurčić & Makarov, 2005.

Tabela 12. Sastav metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Typhloiulus serborum* Ćurčić & Makarov, 2005 analiziran GC-FID i GC-MS tehnikama.

Rt (min) <sup>5</sup>		Jedinjenja	Procenti sastav (%) <sup>6</sup>
8,2	<b>2</b>	2-Metil-1,4-benzohinon	13,1
9,3	<b>5</b>	<i>p</i> -Krezol	0,1
9,8	<b>6</b>	2-Etil-1,4-benzohinon	35,7
9,9	<b>4</b>	2-Hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	6,9
10,8	<b>9</b>	<i>p</i> -Etilfenol	0,1
11,0	<b>7</b>	2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	13,2
11,9	<b>10</b>	2-Etil-3-metoksi-1,4-benzohinon	1,8
13,0	<b>13</b>	Etil-metil-1,4-benzohinon	0,4
13,1	<b>14</b>	2,3-Dimetoksi-1,4-benzohinon	2,1
13,3	<b>11</b>	2-Metilhidrohinon	0,8
13,8	<b>18</b>	2,3-Dimetoksihidrohinon	4,2
14,0	<b>15</b>	2-Metil-3,4-metilendioksifenol	15,5
14,6	<b>20</b>	2-Etilhidrohinon	4,0
15,0	<b>22</b>	2,3,5,6-tetrametilhidrohinon	1,8

#### 4.4. Odbrambene supstance predstavnika familije Blaniulidae

U okviru familije Blaniulidae C. L. Koch, 1847, kao što je prethodno pomenuto ispitivane su dve vrste *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) i *Cibiniulus phlepsii* (Verhoeff, 1897). Ne postoje relevantne informacije o semiohemiji odbrambenih supstanci predstavnika navedene familije; jedini rad iz 1971. godine na vrsti *Blaniulus guttulatus* (Fabricius, 1798) (Weatherson et al., 1971), gde je identifikovano samo dva hinona i tri nehinonske komponente. Stoga smo se opredelili da ustanovimo da li predstavnici ove familije pripadaju hinonskoj grupi diplopoda, ustanovimo prisustvo/odsustvo specijske i generičke razliku između predstavnika blanijulida, kao i da utvrdimo eventualno

<sup>5</sup>: Retenciono vreme u minutima (eng. Retention time);

<sup>6</sup>: Procentni sastav hinonskih komponenti određen GC-FID tehnikom izračunat na osnovu površine GC-signalu u ukupnoj površini svih signala.

postojanje suprageneričkih razlika, odnosno razlika na nivou familja julidnih diplopora. Presek odbrambene žlezde vrste *C. phlepsii* prikazan je na Slici 26.



Slika 26. Presek odbrambene žlezde vrste *C. phlepsii*: m- mišić; s- rezervoar; e- kanal; o- ozopora.

#### 4.4.1. Odbrambene supstance vrste *Nopoiulus kochii*

Vrsta *N. kochii* naseljava gotovo čitavu teritoriju Evropskog kontineta (Enghoff & Kime, 2005), a takođe je introdukovana u severnu i južnu Ameriku, Sibir, Australiju, Novi Zeland i u neke delove Azije (Enghoff & Kime, 2005; Hoffman, 1979; Головач & Enghoff, 1990). Ovaj blanjulidni takson prvi put je sakupljen na teritoriji jugoistočne Srbije (pećina Velika Balanica, selo Sićevo, u okolini Niša) 2005. godine i nakon toga je detaljno opisan (Makarov & Tomić, 2011). *N. kochii* je jedna od sitnijih julida u Srbiji, sa braonkasto obojenim telesnim segmentima i nešto tamnije braon obojenim ozadenama (Slika 27).

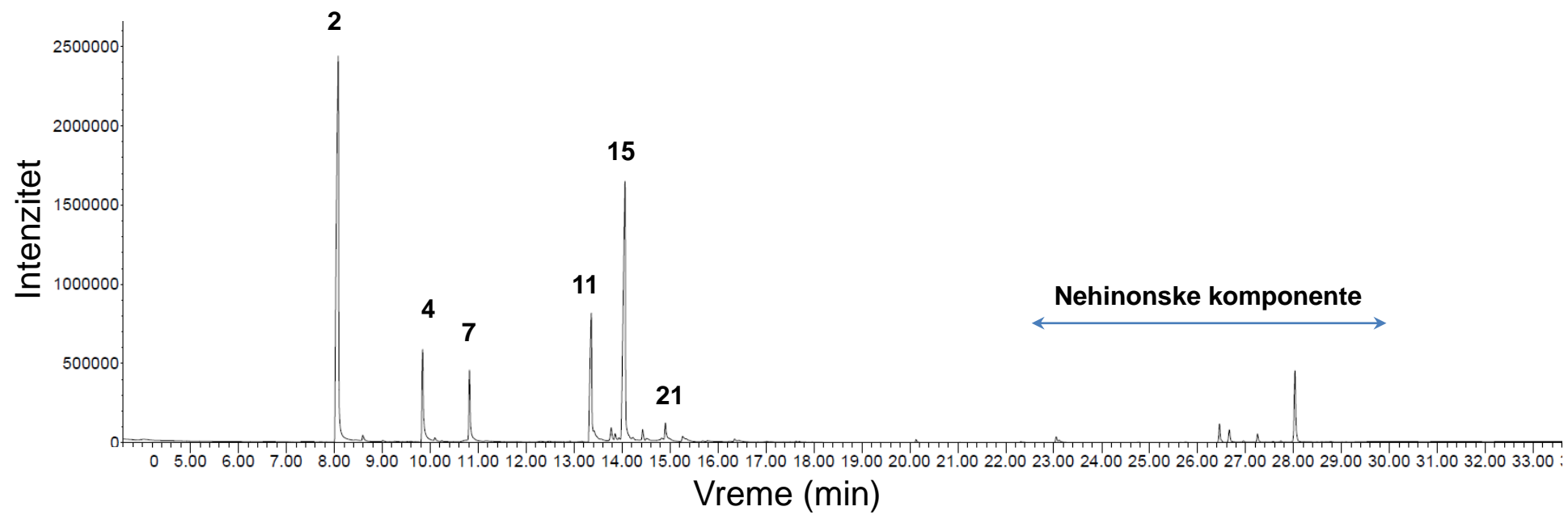
GC-FID i GC-MS hromatogrami ukupnog metilen-hloridnog ekstrakta ove vrste (Slika 28) pokazali su prisustvo 2-metil-1,4-benzohinona (**2**) kao glavne komponente sekreta dobijenog ovom ekstrakcijom.

Pored GC-FID i GC-MS spektara snimljenih tehnikom elektronske jonizacije (GC-EI-MS) za identifikaciju nepoznatih jedinjenja korišćeni su i GC-MS spektri snimljeni tehnikom hemijske jonizacije (GC-CI-MS) uz metan i izobutan kao gasove za jonizaciju. Ovako dobijeni hromatogrami (snimljeni pod istim uslovima) poslužili su za određivanje molekulskih masa svih jedinjenja, odnosno za potvrdu strukture identifikovanih jedinjenja.

U Tabeli 13. prikazan je relativni procentni sastav hinonskih derivata u metilen-hloridnom ekstraktu odbrambenog sekreta vrste *N. kochii*. Ukupno je identifikovano osam hinonskih jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-metilhidrohion (**11**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2,3-dimetilhidrohion (**18**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohion (**21**), sa dominantnom frakcijom jedinjenja **2** od 44,8% u ukupnom sastavu sekreta.



Slika 27. *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) (slikao M. Šćiban).



Slika 28. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Nopaiulus kochii* (Gervais, 1847).



Tabela 13. Procentni sastav odbrambenih sekreta kod *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) i *Cibiniulus phlepsii* (Verhoeff, 1897) analiziranih GC-FID i GC-MS tehnikama.

Rt (min) <sup>5</sup>	Jedinjenje	Procentni sastav (%) <sup>6</sup>	
		<i>Nopoiulus kochii</i> (Gervais, 1847)	<i>Cibiniulus phlepsii</i> (Verhoeff, 1897)
8.1	<b>2</b> 2-Metil-1,4-benzohinon	44,8	59,0
9.9	<b>4</b> 2-Hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	6,9	1,1
10.8	<b>7</b> 2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	4,5	34,1
13.1	<b>14</b> 2,3-Dimetoksi-1,4-benzohinon	-	t <sup>c</sup>
13.3	<b>11</b> 2-Metilhidrohinon	12,2	-
13.5	<b>16</b> 2-Metoksi-5-metilhidrohinon	-	0,8
13.8	<b>18</b> 2,3-Dimetilhidrohinon	1,1	-
14.0	<b>15</b> 2-Metil-3,4-metilendioksifenol	28,6	4,3
14.4	<b>19</b> 2,3-Dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon	0,7	-
14.9	<b>21</b> 2,3-Dimetoksi-5-metilhidrohinon	1,2	-
15.6	<b>23</b> 2,5-Dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon <sup>d</sup>	-	0,7

#### 4.4.2. Odbrambene supstance vrste *Cibiniulus phlepsii*

Vrsta *C. phlepsii* prvi put je zabeležena na teritoriji severne Srbije (Antić et al., 2013), a uzorak ove vrste (Slika 29) je sakupljen neposredno uz obalu Dunava.



Slika 29. Slika *Cibiniulus phlepsii* (Verhoeff, 1897) (slikao M. Šćiban).

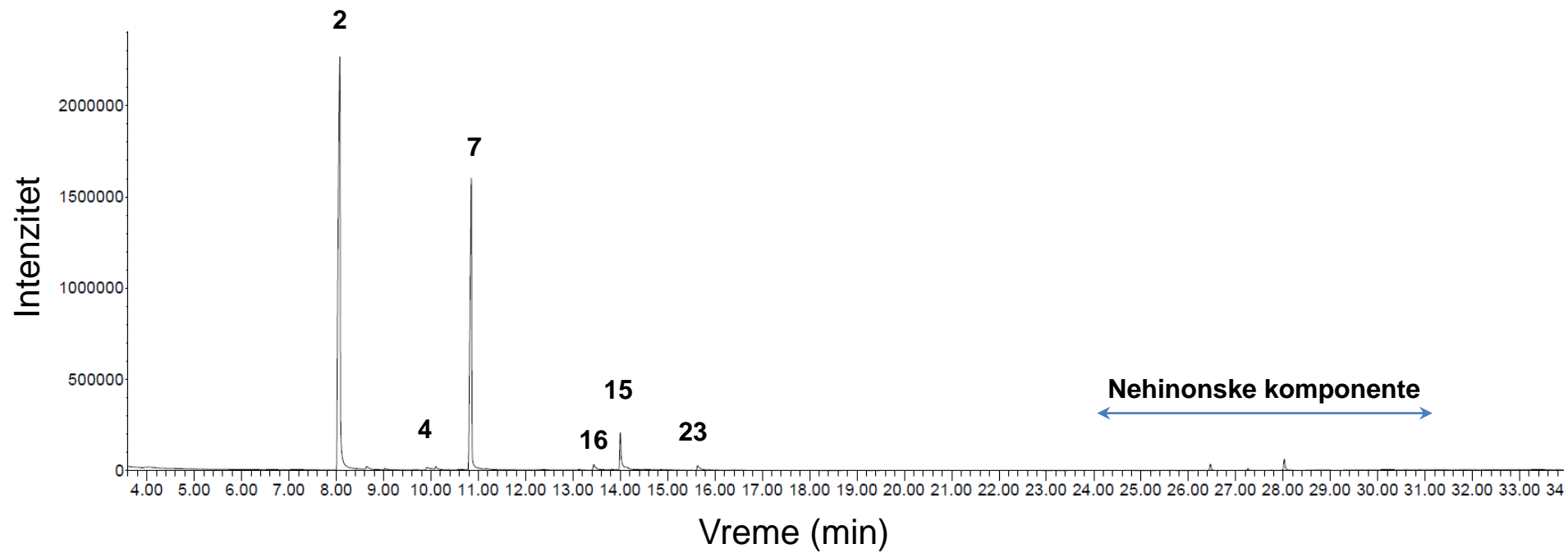
<sup>5</sup>: Retenciono vreme u minutima (eng. Retention time);

<sup>6</sup>: Procentni sastav hinonskih komponenti određen GC-FID tehnikom izračunat na osnovu površine GC-sigнала u ukupnoj površini svih sigнала.

GC-FID i GC-MS hromatogrami ukupnog metilen-hloridnog ekstrakta vrste *C. phlepsii* (Slika 30) pokazali su prisustvo 2-metil-1,4-benzohinona (**2**) kao glavne komponente sekreta dobijenog ovom ekstrakcijom, a u Tabeli 13. prikazan je procentni sastav hinonskih derivata u metilen-hloridnom ekstraktu odbrambenog sekreta ove vrste. Identifikovano je sedam hinonskih derivata: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**23**) i 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**) koji se u relativnom procentnom sastavu sekreta pojavljuje kao jedinjenje u tragovima.

Uporedna analiza vrste *N. kochii* i *C. phlepsii* pokazala je veliku sličnost odbrambenih sekreta u okviru familije Blaniulidae. Kod obe ispitivane vrste odbrambeni sekreti sadržali su jedinjenje **2** kao najzastupljenije. Odnos sadržaja komponenti dobijen je na osnovu odnosa površina pikova u GC-FID hromatogramima. Kod vrste *C. phlepsii* pomenuto jedinjenje **2** bilo je zastupljeno sa 58,1%, dok je kod vrste *N. kochii* učešće benzohinona **2** u ukupnom analiziranom odbrambenom sekretu nešto manje i iznosilo je 42%. Takođe je od značaja pomenuti da je jedinjenje 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**) kod vrste *C. phlepsii* zastupljeno sa 33,6%, dok je kod vrste *N. kochii* njegova procentna zastupljenost tek 4,2%. Sličan slučaj je i sa 2-metil-3,4-metilendioksifenolom (**15**) ( $t_r = 14$ . min.), koje je kod vrste *N. kochii* zastupljeno sa 26,8%, a kod druge ispitivane vrste sa svega 4,2%. Druge značajne razlike u hemijskom sastavu odbrambenog sekreta između ove dve vrste nisu pronađene.

Nehinonska komponenta odbrambenog sekreta kod obe analizirane vrste uključuje heksiloleat ( $t_r = 26,4$ . min.), kao i oktiloleat ( $t_r = 28$ . min.) (Slika 28). Drugo pomenuto jedinjenje je kod vrste *N. kochii* zastupljeno sa čak 5,2%.



Slika 30. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta vrste *Cibiniulus phlepsii* (Verhoeff, 1897).

#### 4.5. Odbrambene supstance različitih postembrionalnih stupnjeva vrste

##### *Cylindroiulus boleti*

Julide imaju tip postembrionalnog razvića označen kao euanamorfoza, koji uključuje dodavanje novih somita prilikom svakog presvlačenja. Prilikom određivanja postembrionalnog stadijuma korišćena je metoda brojanja podusnih i apodusnih segmenata, kao i brojanja redova ocela. Determinacija stadijuma pokazala je poklapanje sa studijom od strane Blowera i Gabbutta (1964), detaljno urađenoj na vrsti *Cylindroiulus punctatus* (Leach, 1815), koja je jedan od najrasprostranjenijih vrsta diplopoda u Velikoj Britaniji. Ova studija pokazala je da *C. punctatus* dostiže polnu zrelost u IX, X ili XI stadijumu, u svojoj trećoj godini. Polovi se mogu odrediti od VII stadijuma, kada se gonopode počinju formirati na sedmom telesnom segmentu kod mužjaka. Poslednji zabeleženi razvojni stadijum je XIV, a najveći broj podusnih prstenova je bio 54 (Enghoff et al., 1993).

Nakon sakupljanja materijala i urađene specijske determinacije ustanovljeno je da se radi o vrsti *Cylindroiulus boleti* (Slika 31), široko rasprostranjenoj na teritoriji Srbije, a u uzorku su se nalazile jedinke od III do XI postembrionalnog stadijuma (Tabela 14), dok su polovi razdvajani od VII stadijuma (Tabela 15).



Slika 31. Adultna jedinka vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).

Tabela 14. Anamorfoza kod *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).

Postembrionalni stadijum	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
<b>Ocele</b>									
Broj redova	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Broj ocela u redu	2	3	4	5	5/6	7	7	7	6
<b>Segmenti</b>									
Podusni segmenti	11	16-18	22-24	29-31	34-38	40-44	42-48	45-50	49-50
Apodusni segmenti	6	5, 6, 7	6, 7	5, 6, 7	4, 5, 6	3, 4	1, 2, 3	2, 3	2

Tabela 15. Brojnost jedinki u sakupljenom uzorku vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847) razdvojenih po polovima.

Postembrionalni stadijum	Pol	
	Ženke	Mužjaci
VII	3	5
VIII	12	9
IX	17	18
X	10	18
XI	5	5

U Tabeli 16. prikazan je procentni sadržaj svih hinonskih derivata u odbrambenim sekretima različitih postembrionalnih stupnjeva vrste *C. boleti*.

Identifikovano je ukupno 10 hinonskih jedinjenja u sastavu odbrambenog sekreta različitih postembrionalnih stupnjeva. Kao dominantno jedinjenje u okviru hinonske komponente kod svih stupnjeva izdvaja se 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**).

Kod prvog stadijuma koji je analiziran (III) identifikovana su samo tri hinonska jedinjenja: 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**) i 2-metoksi-3-metilhidrohion (**17**). Takođe je kod ovog stadijuma zastupljenost nehinonske komponente bila značajno veća (73,3%), u odnosu na hinonska jedinjenja (26,7%).

Kod kasnijih stadijuma tokom postembrionalnog razvića sukcesivno dolazi do sinteze novih hinonskih derivata i oni postaju najzastupljenija jedinjenja u odbrambenom sekretu.

Kod stadijuma IV identifikovano je ukupno šest hinona: 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**), a dominantno jedinjenje je jedinjenje **7**.

Kod stadijuma V u sastavu odbrambenog sekreta identifikovano je sedam hinonskih jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**) i 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), a kao i kod prethodna dva analizirana stadijuma u sekretu dominira benzohinon **7**.

Kod stadijuma VI GC-MS analizama je takođe identifikovano ukupno sedam hinonskih derivata: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**). I u ovom slučaju preovlađujuće je bilo jedinjenje **7** sa zastupljenošću od 83,0 % u ukupnom sastavu odbrambenog sekreta.

Metilen-hloridni ekstrakt stadijuma VII je pokazao prisustvo devet hinonskih jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**). I kod ovog stadijuma dominantno jedinjenje je **7**, sa zastupljenošću od 90,9 % u ukupnom sekretu.

Kod sledećeg analiziranog stadijuma (VIII) takođe je identifikovano devet hinonskih jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**) (koje se pojavljuje kao jedinjenje u tragovima). Dominantno je opet jedinjenje **7**.

Kod stadijuma IX nađen je identičan spektar hinonskih jedinjenja kao i kod stadijuma VIII. U sastavu sekreta bila su zastupljena sledeća jedinjenja: 2-metil-1,4-

benzohinon (toluhinon) **(2)**, 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon **(4)**, 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon **(7)**, 2,3-dimetoksihidrohinon **(12)**, 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon **(14)**, 2-metil-3,4-metilendioksifenol **(15)**, 2-metoksi-5-metilhidrohinon **(16)**, 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon **(19)** i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon **(21)** (koje se pojavljuje kao jedinjenje u tragovima), a takođe je dominantno jedinjenje **7**.

Metilen-hloridni ekstrakt stadijuma X je pokazao prisustvo devet hinonskih jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) **(2)**, 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon **(4)** (koje se pojavljuje kao jedinjenje u tragovima), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon **(7)**, 2,3-dimetoksihidrohinon **(12)**, 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon **(14)**, 2-metil-3,4-metilendioksifenol **(15)**, 2-metoksi-5-metilhidrohinon **(16)**, 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon **(19)** i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon **(21)**. I ovde je najzastupljenije jedinjenje **7** sa 78,4 %.

Tabela 16. Sastav metilen-hloridnog ekstrakta postembrionalnih stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847) analiziran GC-FID i GC-MS tehnikama.

Rt (min) <sup>5</sup>	Jedinjenja	Procenti sastav hinonskih jedinjenja kod različitih postembrionalnih stadijuma (III-XI) (%) <sup>6</sup>									
		III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
8,2	<b>2</b>	2-Metil-1,4-benzohinon	-	-	0,2	10,6	2,6	16,5	19,8	14,6	20,9
9,9	<b>4</b>	2-Hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	-	-	11,2	-	0,2	0,1	1,7	t	0,1
10,8	<b>7</b>	2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	38,3	92,3	69,4	83,0	90,9	80,7	72,5	78,4	74,6
13,1	<b>14</b>	2,3-Dimetoksi-1,4-benzohinon	-	1,3	0,6	1,2	1,7	1,5	0,9	0,5	0,7
13,5	<b>16</b>	2-Metoksi-5-metilhidrohinon	-	-	-	-	-	0,2	0,4	0,1	0,6
13,8	<b>12</b>	2,3-Dimetoksihidrohinon	-	1,4	0,1	0,9	1,0	0,1	0,1	0,8	0,5
14,1	<b>15</b>	2-Metil-3,4-metilendioksifenol	58,7	3,2	18,2	3,7	2,2	0,6	4,3	3,7	1,4
14,5	<b>19</b>	2,3-Dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon	-	-	0,3	-	0,1	0,3	0,3	1,5	0,8
14,6	<b>17</b>	2-Metoksi-3-metil-hidrohinon	3,0	1,5	-	0,6	1,0	-	-	-	-
15,0	<b>21</b>	2,3-Dimetoksi-5-metilhidrohinon	-	0,3		0,2	0,3	t	t	0,4	0,4

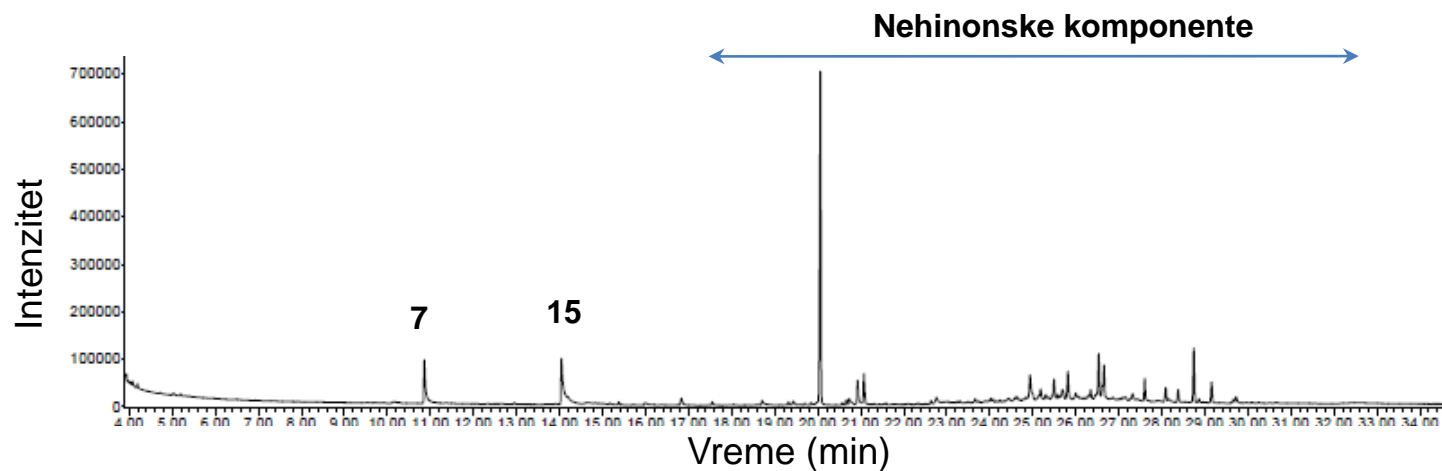
<sup>5</sup>: Retenciono vreme u minutima (eng. Retencion time);

<sup>6</sup>: Procentni sastav hinonskih komponenti određen GC-FID tehnikom izračunat na osnovu površine GC-signalu u ukupnoj površini svih signalu.

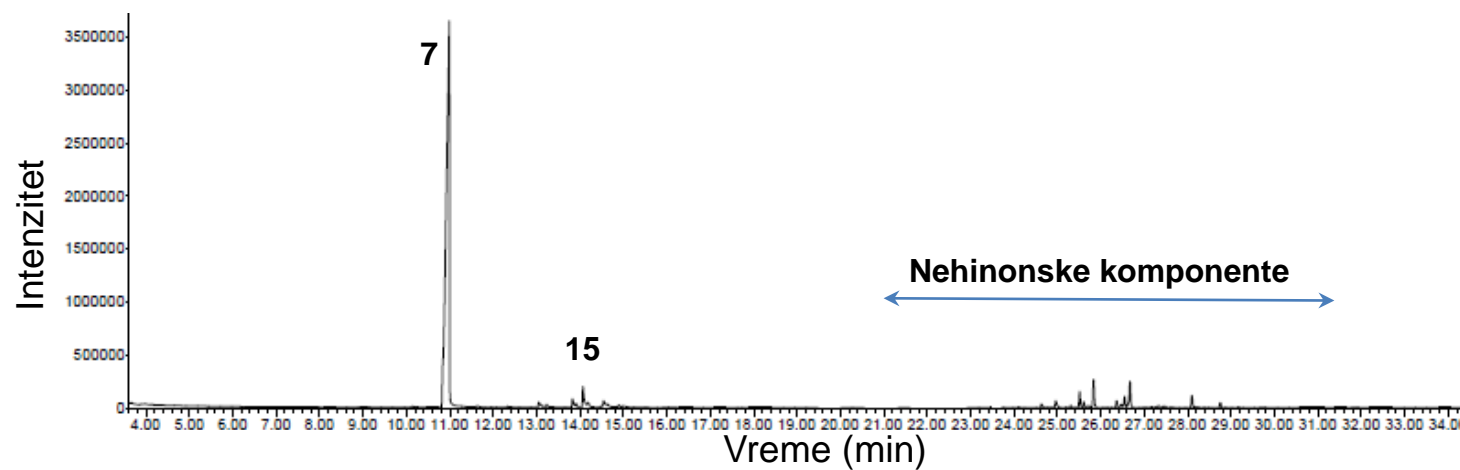


Poslednji analizirani stadijum XI pokazao je isti spektar hinona koji su identifikovani i kod X stadijuma: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**) (koje se pojavljuje kao jedinjenje u tragovima), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**). Pored dominantne frakcije 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinona (**7**), značajna komponenta je i 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**) (20,9 %).

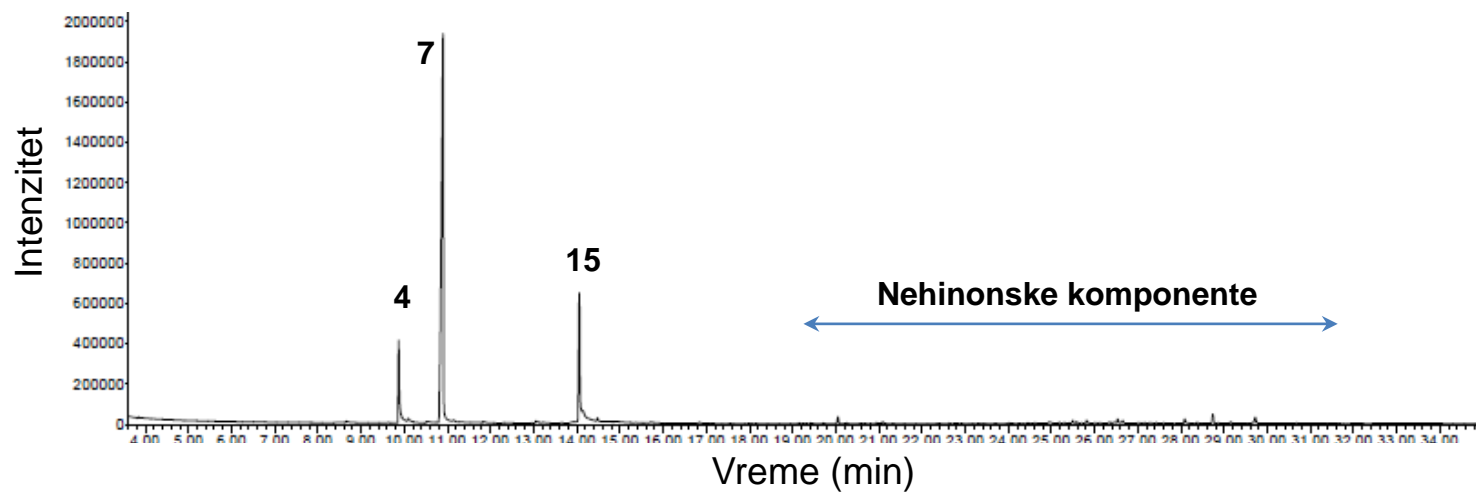
GC-FID i GC-MS hromatogrami ukupnog metilen-hloridnog ekstrakta analiziranih postembrionalnih stupnjeva (od III do X) vrste *C. boleti* prikazani su na Slikama 32 -39.



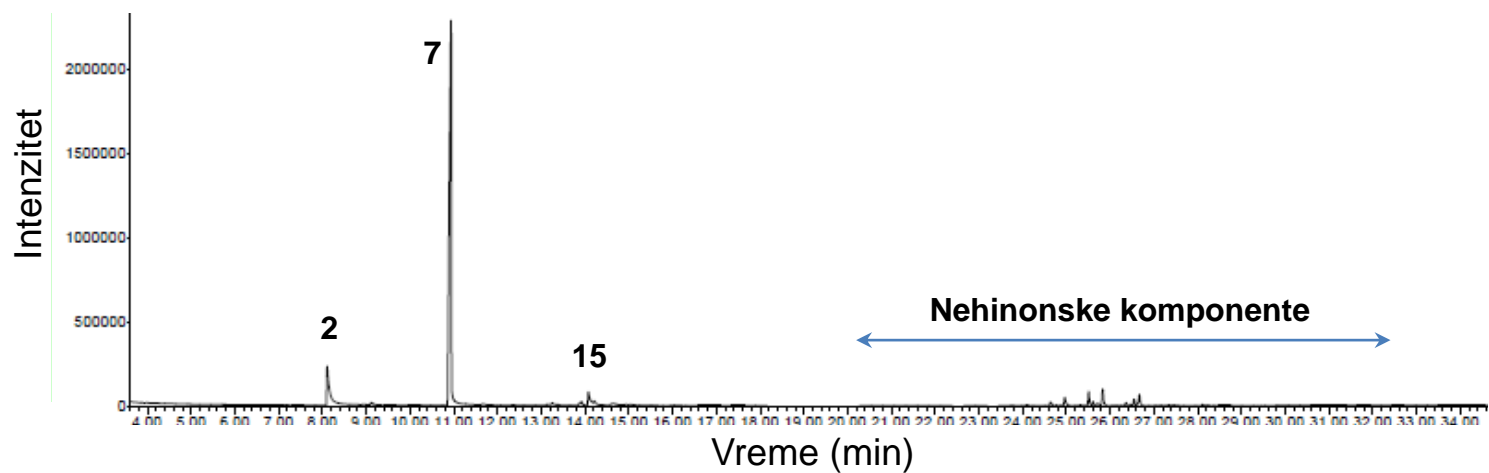
Slika 32. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta III postembrionalnog stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).



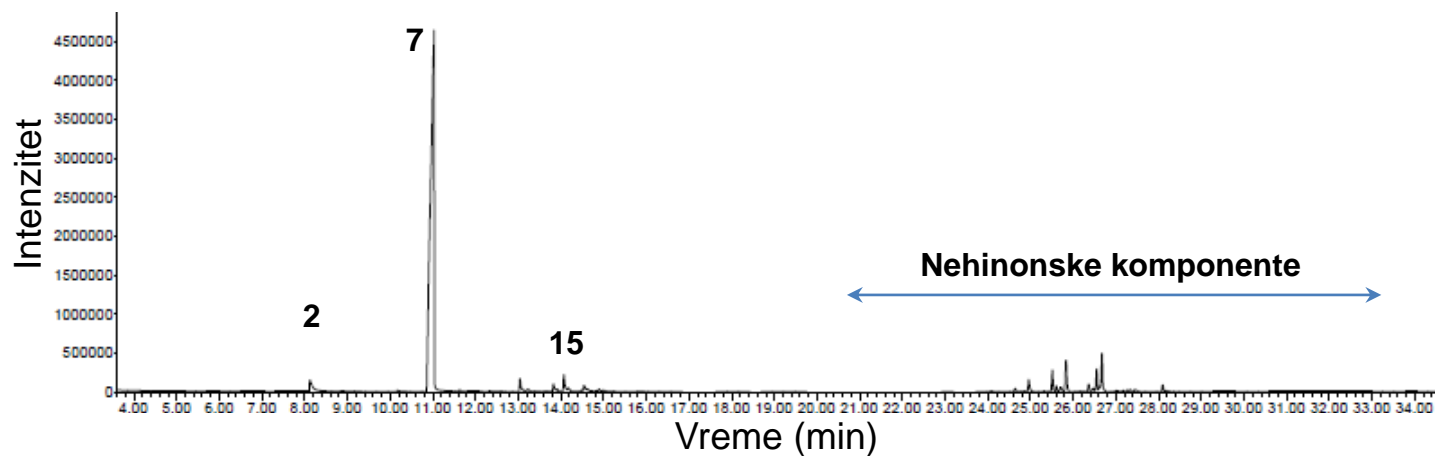
Slika 33. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta IV postembrionalnog stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).



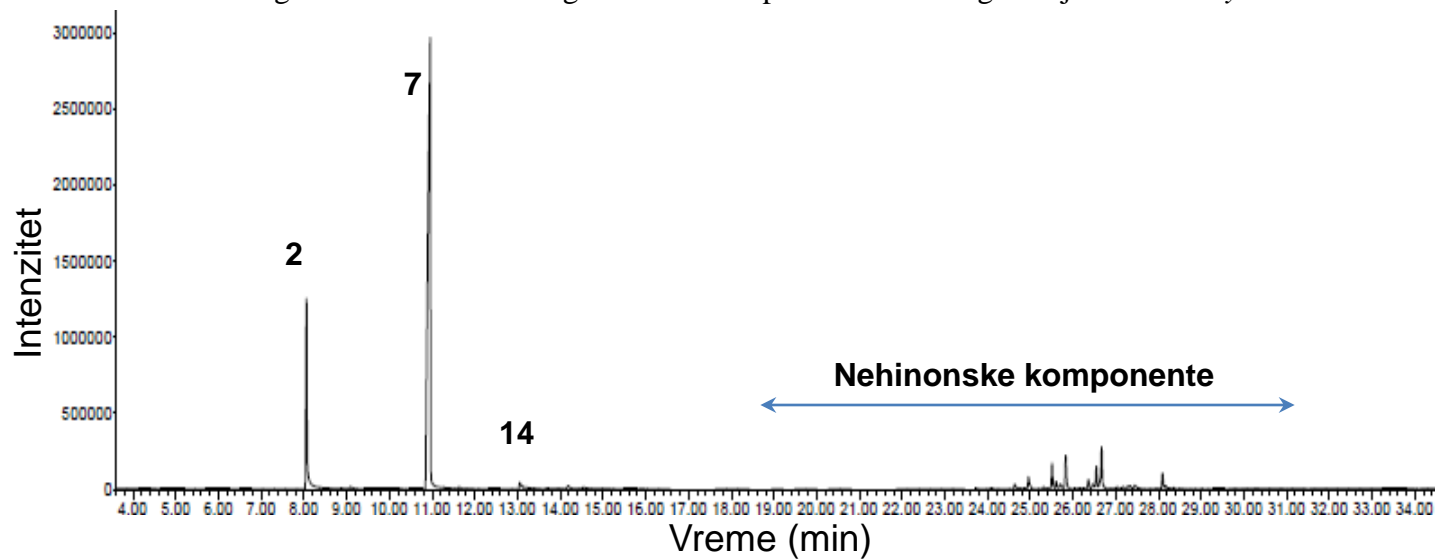
Slika 34. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta V postembrionalnog stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847)



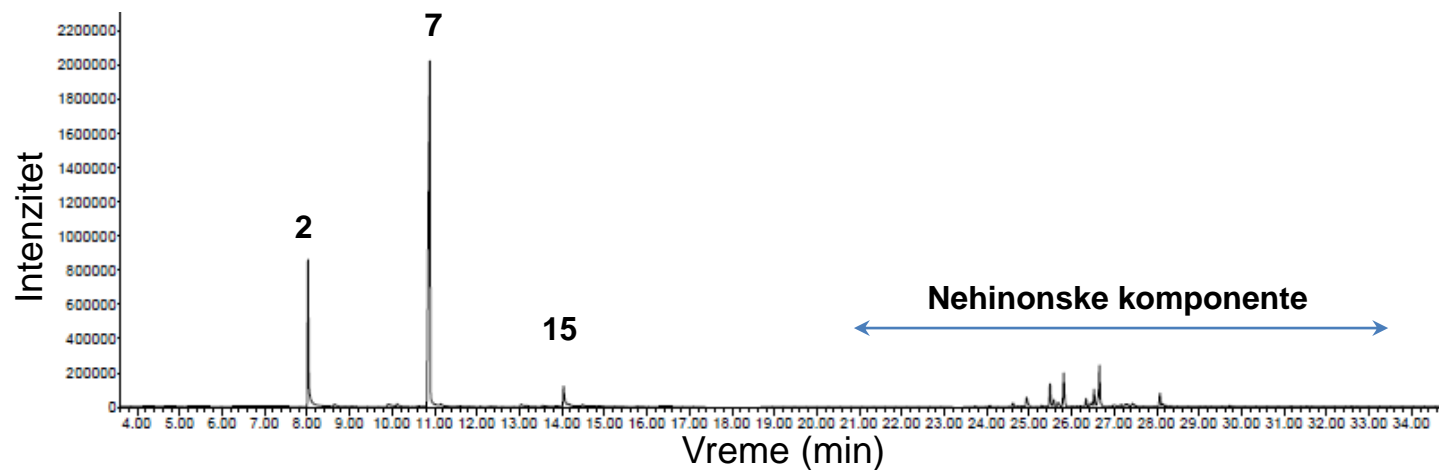
Slika 35. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta VI postembrionalnog stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).



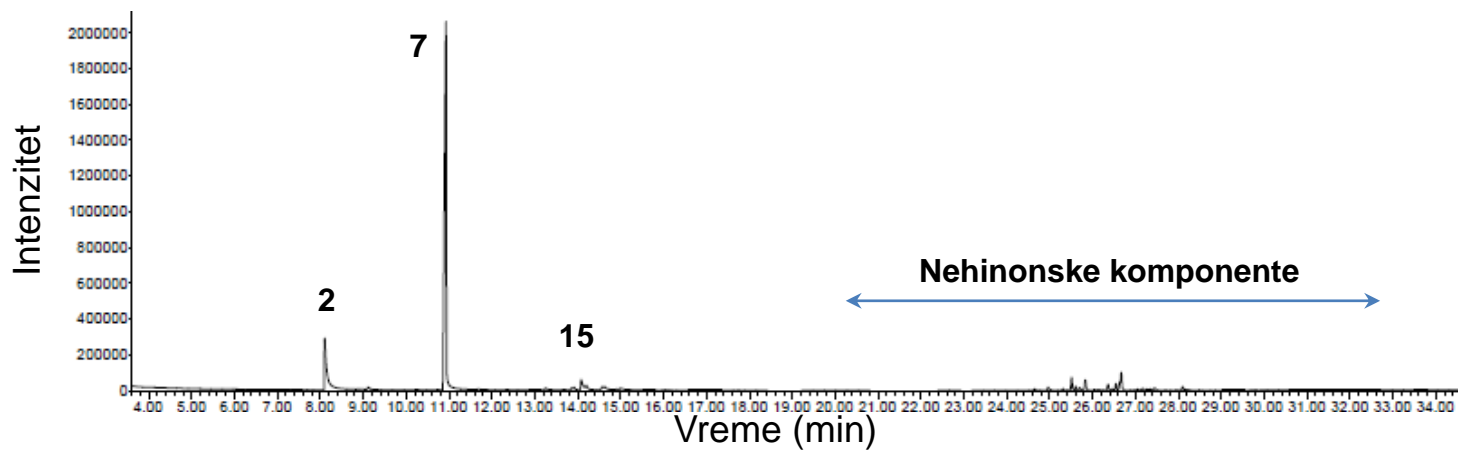
Slika 36. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta VII postembrionalnog stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L.



Slika 37. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta VIII postembrionalnog stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).



Slika 38. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta IX postembrionalnog stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).



Slika 39. GC-FID hromatogram metilen-hloridnog ekstrakta X postembrionalnog stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).

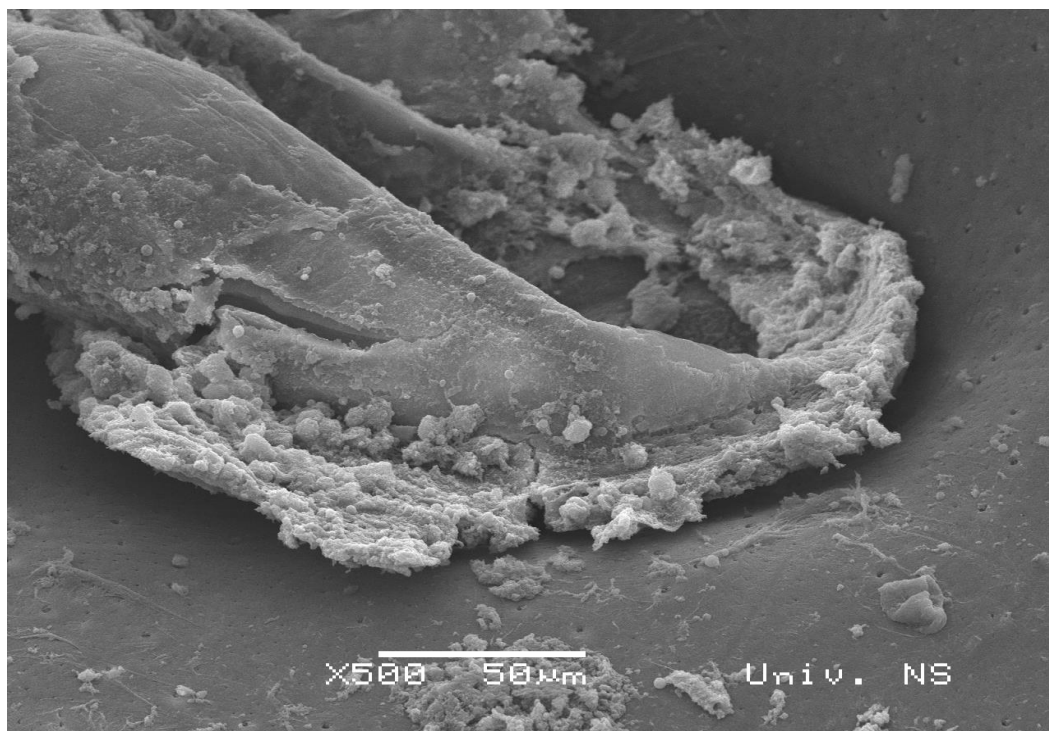
## 5. Diskusija

Diplopode su treća po veličini klasa terestričnih artropoda, posle insekata i arahnida, koja broji 12.000 do sada opisanih vrsta, svrstanih u 145 familija i 16 rodova; procenjuje se da bi ukupan broj vrsta diplopoda u svetu mogao biti oko 80.000 (Golovatch, 2009). U Srbiji je registrovano 100 vrsta diplopoda, koje su svrstane u 44 rodova, 16 familija i sedam redova (Antić et al., 2013). Prisustvo diplosegmenata (udvojenih somita) razdvaja klasu Diplopoda od ostalih klasa u okviru filuma Myriapoda: predstavnici klasa Chilopoda, Symphyla i Pauropoda imaju po jedan par nogu na svakom od telesnih segmenata. One su važna komponenta terestričnih ekosistema, pre svega zbog svoje uloge u razgradnji organske materije, s obzirom na to da većina predstavnika ove klase spada u detrivore (konzumente uginulih ostataka biljaka).

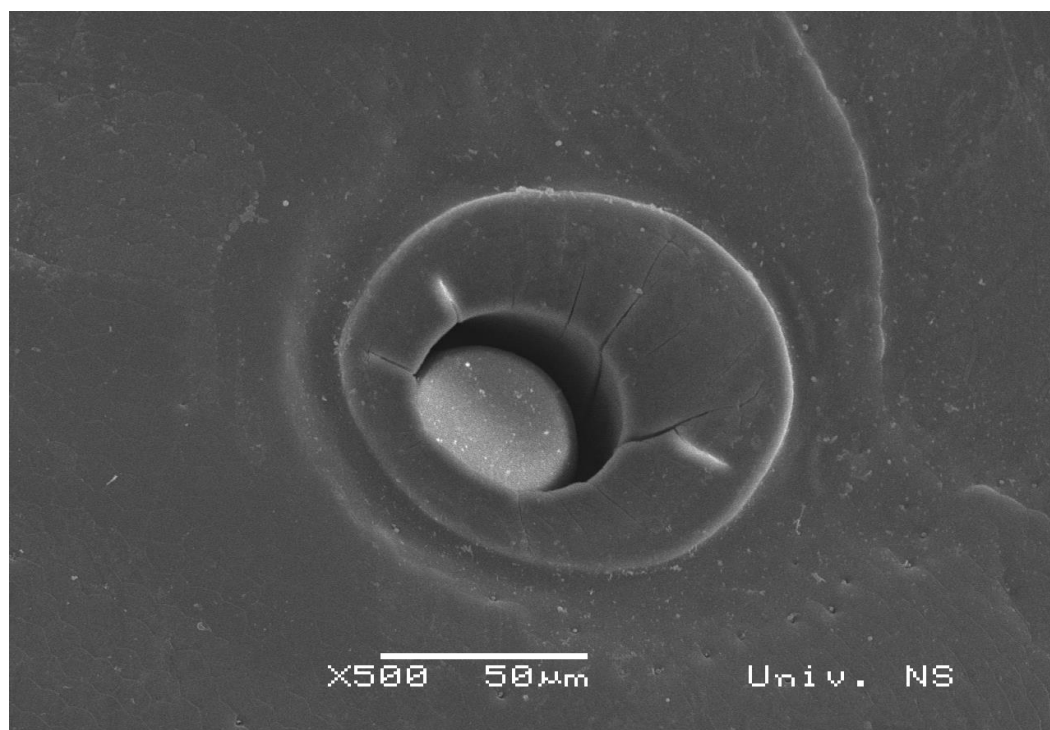
Odbrana od predatora kod ove grupe terestričnih artropoda uključuje čitav spektar različitih mehanizama, od ponašajnih, preko mehaničkih, morfoloških, pa sve do hemijskih. Hemijski mehanizam je predstavljen odbrambenim žlezdama sa rezervoarom (ozadenama), koje su prisutne kod većine diplopoda i najčešće su raspoređene tako da se po jedan par žlezda nalazi na svakom pleurotergitu. Skening elektronske mikrografije preseka kroz ozadenu vrste *Pachyiulus hungaricus* prikazane su na Slikama 40 i 41. U slučaju napada od strane predatora iz ovih žlezda se izlučuje odbrambeni sekret.

Kod redova Siphonophorida, Stemmiulida i Platydesmida hemijski vid odbrane još uvek nije poznat; najnovija istraživanja ukazuju na mogućnost postojanja određenog vida odbrane potomstva od strane roditelja kod reda Platydesmida (Kudo et al., 2011). Kod predstavnika redova Chordeumatida, Sphaeriotheriidae, Polyxenida i Siphoniulida odsustvuju ozadene na telesnim segmentima, dok vrste iz reda Glomeridesmida najverovatnije uopšte ne poseduju hemijski vid odbrane (Shear et al., 2007).

Sve ostale diplopode poseduju ozadene. U njima dolazi do sintetisanja odbrambenih sekreta, koji su po pravilu multifunkcionalni: to su tipični iritanti koji odvrćaju predatora od svoje potencijalne žrtve; zatim mnogi poseduju antibakterijsko, fungicidno i antihelmintičko dejstvo (De Rosa et al., 1994), a postoje indicije o njihovoj feromonskoj ulozi u intraspecijskoj komunikaciji (Deml & Huth, 2000).



Slika 40. Skening elektronska mikrografija apikalnog dela eferentnog kanala ozadene kod vrste *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881).



Slika 41. Skening elektronska mikrografija ozopore vrste *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881).

Smatra se da hemijski sastav odbrambenih sekreta kod diplopoda može poslužiti kao jedan od parametara za rasvetljavanje filogenetskih odnosa između viših taksonomskih kategorija kod predstavnika ove klase. Ova teza se još uvek ne može primeniti na niže taksonomske nivoe, s obzirom na tom da su u većini hemijskih studija urađenih do sada identifikovane samo glavne komponente odbrambenih sekreta. Tako se stonoge iz reda Callipodida mogu svrstati u kladu „krezolskih stonoga“, jer je kod svih do sada analiziranih vrsta ovog reda potvrđeno prisustvo p-krezola kao glavne komponente odbrambenog sekreta. Predstavnici svih pet familija iz reda Polydesmida sintetišu cijanovodonik u funkciji alomona. Ovo jedinjenje nastaje u reakciji mandelonitrila i/ili benzoil-nitrila sa odgovarajućim enzimima. Zbog toga se u rezervoaru odbrambenih žlezda skladišti benzoil-nitril, mandelonitril odnosno mandelonitril-glukozid, a tek tokom iritacije ova jedinjenja idu put reakcione komore gde zajedno sa enzimima dolazi do oksidacije ovih jedinjenja u benzaldehid i benzoevu kiselinu, pri čemu nastaje cijanovodonik, koji se onda ispušta u spoljašnju sredinu. Članovi reda Polydesmida se svrstavaju u „cijanidnu“ kladu diplopoda.

Sve do sada analizirane vrste stonoga koje pripadaju redu Polyzoniida kao odbrambena jedinjenja u svom sekretu sadrže terpenoidne alkaloidne koje možemo svrstati u tri grupe: spiropirolidon (polizonimin), spiropirolidini (predstavnik je nitroplizonamin) i cikloindolizidin (buzonamin). Predstavnici reda Glomerida u odbrambenom sekretu takođe sadrže alkaloidne. Hemijske analize su do sada urađene na relativno malom broju glomerida, i okarakterisana su dva hinazolinska alkaloida: glomerin i homoglomerin. Važno je napomenuti da je prema dosadašnjim istraživanjima, jedino kod predstavnika ovog reda registrovano prisustvo proteinske komponente u odbrambenom sekretu. Na osnovu ovakvih rezultata stonoge iz redova Polyzoniida i Glomerida se svrstavaju u „alkaloidnu“ kladu diplopoda.

Vrste koje pripadaju redovima Julida, Spirostreptida i Spirobolida, kao hemijsku odbranu koriste benzohinon i njegove derivate, pa se stoga svrstavaju u „hinonsku“ kladu diplopoda. Ovako homogen i univerzalan obrazac hemijskog sastava odbrambenih sekreta kod ovih organizama verovatno predstavlja staru, pleziomorfnu karakteristiku.

Pregledom celokupne bibliografije koja se odnosi na semiohemiju odbrambenih sekreta kod diplopoda došli smo do podataka da su do sada analizirane samo 22 vrste julida (iz 14 rodova) pri čemu je identifikovano ukupno 20 hinonskih i 17 nehinonskih



komponenti (Tabela 17). Naime, prisustvo hemijske odbrane kod julida je bilo poznato još u XIX veku, ali bez precizne identifikacije odbrambenih jedinjenja. Behal i Phisalix (1900) su prvi put precizno izolovali 1,4-benzohinon kao komponentu odbrambenog sekreta vrste *Julus terrestris* (Linnaeus, 1758). Kasnijim istraživanjima je pokazano da su glavne komponente odbrambenog sekreta kod svih analiziranih vrsta juliformnih diplopoda hinonska jedinjenja među kojima dominiraju: 1,4-benzohinon, 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (Attygalle et al., 1993; Eisner et al., 1978; Deml & Huth, 2000; Vujisić et al., 2011). Generalno, za hinone je poznato da predstavljaju veoma efikasne repelente kako za invertebrate, tako i za vertebrate (Eisner et al., 1978), a takođe je poznato i njihovo baktericidno i fungicidno dejstvo [npr. 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) je testiran na patogenim mikroorganizmima *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Rhodotorula glutinis* i pokazao je izuzetnu baktericidnu i fungicidnu aktivnost (Rocha et al., 2013)].

### **5.1. Taksonomske implikacije hemijske identifikacije odbrambenih supstanci kod juliformnih diplopoda**

Analiza hemijskog profila odbrambenog sekreta kod deset analiziranih julidnih taksona pokazala je prisustvo ukupno 26 jedinjenja (Tabele 18 i 19). Od toga su okarakterisana 23 različita hinonska derivata: 1,4-benzohinon (**1**), 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), hidrohion (**8**), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2-metilhidrohion (**11**), 2,3-dimetoksihidrohion (**12**), etil-metil-1,4-benzohinon (**13**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohion (**16**), 2-metoksi-3-metilhidrohion (**17**), 2,3-dimetilhidrohion (**18**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2-etilhidrohion (**20**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohion (**21**), 2,3,5,6-tetrametilhidrohion (**22**), 2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**23**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (**24**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohion (**25**) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (**26**). Takođe, kao minorne komponente u odbrambenom sekretu kod

pojedinih analiziranih vrsta, ili kao komponente u tragovima, izolovana su i krezolna jedinjenja: *p*-krezol (5), fenol (3) i *p*-etilfenol (9). Nehinonska jedinjenja u odbrambenim sekretima su bila predstavljena heksil-estrima zasićenih i nezasićenih C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> kiselina.

Tabela 17. Pregled hinonskih i nehinonskih komponenti prisutnih u odbrambenim sekretima kod predstavnika reda Julida.

Nehinonske komponente: ❶ (*E*)-2-heptenal, izomer oktenala, (*E*)-2-oktenol, izomer nonenala, (*Z*)-2-nonenal, (*E*)-2-dekenal; ❷ *n*-butil *n*-dodekanoat, *n*-butil 12-metiltetradekanoat, *n*-pentil *n*-dodekanoat, *n*-pentil 11-metildodekanoat, *n*-heksil *n*-dekanoat (= *n*-heksil kaprat), *n*-heksil *n*-undekanoat, *n*-heksil 10-metilundekanoat, *n*-heksil *n*-dodekanoat (= *n*-heksil laurat), *n*-heksil 11-metildodekanoat, *n*-heksil *n*-tridekanoat, *n*-heksil 12-metiltridekanoat, *n*-heksil *n*-tetradekanoat (= *n*-heksil miristat), *n*-heksil 13-metiltetradekanoat, *n*-heptil *n*-dodekanoat, *n*-oktil *n*-dodekanoat (= *n*-oktil laurat); ❸ heksadecil acetat, oktadecenil acetat (verovatno (*E*)-oktadek-1-enil acetat); ❹ heksil estri zasićenih i nezasićenih masnih kiselina C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>; ❺ oktanol, nonanol, dekanol, dodekanol, alkenoli, derivati nezasićenih masnih kiselina; ❻ heksil estri alkalnih kiselina i derivati nezasićenih masnih kiselina; ❼ *o*-krezol; ❽ neidentifikovane alifatične komponente;

Hinonske komponente: 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7); 1,4-benzohinon (1); 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (2); 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (ubihinon 0) (19); 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (14); 2-metoksi-6-metil-1,4-benzohinon (27); 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15); 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (4); 2-metil-1,4-hidrohinon (toluhidrohinon) (11); 2-metoksi-5-metil-1,4-hidrohinon (16); 2,3-dimetoksi-1,4-hidrohinon (12); 2-metoksi-3-metil-1,4-hidrohinon (28); 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (21); 2-metoksi-5-metil-1,4-benzohinon (29); 2-etil-1,4-benzohinon (6); 2-metoksi-1,4-benzohinon (26); hidrohinon (8); 3-metoksi-2,5-dimetil-1,4-benzohinon (= 2-metoksi-3,6-dimetil-1,4-benzohinon) (30); 1,4-naftohinon (31).

Red Vrsta	nehinonske komponente	1	2	4	6	7	8	11	12	14	15	16	19	21	26	27	28	29	30	31	Reference
<b>JULIDA</b>																					
<i>Allajulus dicentrus</i> (Latzel, 1884)	❶	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Bodner & Raspotnig, 2012
<i>A. nitidus</i> (Verhoeff, 1891)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Röper & Heyns, 1977
<i>Anaulaciulus</i> sp.	❷	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	Shimizu et al., 2012
<i>Blaniulus guttulatus</i> (Fabricius, 1798)	❸	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Weatherston et al., 1971
<i>Bollmaniulus hewiti</i> (Chamberlin, 1919)	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Duffey, 1974
<i>Cylindroiulus boleti</i> (C. L. Koch, 1847)	❹	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Vujisić et al., 2011
<i>C. caeruleocinctus</i> (Wood, 1864)	❺	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	Schildknecht & Weiss, 1961; Röper & Heyns, 1977;Huth,2000
<i>C. luridus</i> (C. L. Koch, 1847)	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Röper & Heyns, 1977

Tabela 17. Nastavak.

<i>C. meinerti</i> (Verhoeff, 1891)	⑥	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Huth, 2000
<i>C. punctatus</i> (Leach, 1815)	⑥	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	Röper & Heyns, 1977; Huth, 2000
<i>Enantiulus nanus</i> (Latzel, 1884)	⑥	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	Huth, 2000
<i>Julus scandinavius</i> (Latzel, 1884)	⑥	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Huth, 2000
<i>J. terrestris</i> (Linnaeus, 1758)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Béhal & Phisalix, 1900; Pavan, 1968
<i>Leptoiulus proximus</i> (Nemec, 1896)	⑥	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Huth, 2000
<i>L. trilineatus</i> (Koch, 1847)	④	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	Vujisić et al., 2011
<i>Megaphyllum bosniense</i> (Verhoeff, 1897)	④	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	Vujisić et al., 2011
<i>M. unilineatum</i> (C. L. Koch, 1838)	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Schildknecht & Weiss, 1961; Pavan 1968
<i>Ommatoiulus sabulosus</i> (Linnaeus, 1758)	⑥	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Huth, 2000; Trave et al., 1959
<i>Ophiulus pilosus</i> (Newport, 1842)	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Röper & Heyns, 1977
<i>Oriulus venustus</i> (Wood, 1864)	⑦	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Kluge & Eisner, 1971
<i>Saiulus setifer</i> (Chamberlin, 1940)	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Duffey, 1974
<i>Tachypodoiulus niger</i> (Leach, 1814)	⑥	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Huth, 2000
<i>Unciger foetidus</i> (C. L. Koch, 1838)	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Röper & Heyns, 1977
<i>Unciger transsilvanicus</i> (Verhoeff, 1899)	◆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Sekulić et al., 2014
<i>Uroblaniulus canadensis</i> (Newport, 1844)	⑧	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Weatherston & Percy, 1969

Generalno, kod svih analiziranih vrsta dokazani su 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15) i 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**) (izuzev kod *S. deelemani*). Pri tome, jedinjenja **2** i **7** se javljaju u relativnom procentnom udelu odbrambenog sekreta kao dominantne komponente kod epigejskih julida, dok je kod kavernikolnih tiflojulina njihovo prisustvo značajno manje. Prisustvo jedinjenja **4** se kreće u opsegu od 0,4 % (kod *P. hungaricus*) do 8,1 % (kod *T. nevoi*) relativnog učešća u odbrambenom eksudatu analiziranih vrsta (Tabele 6 i 11). Prisustvo jedinjenja **15** se može objasniti ciklohidrogenizacijom jedinjanja **7**, kao što su objasnili Wu i saradnici (Wu et al., 2007). Kod predstavnika reda Julida jedinjenja 2-metil-1,4-benzohinon (**2**) i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**) imaju široko prisustvo. Naime, jedinjenje **2** nije registrovano samo kod parajulida *Uroblaniulus canadensis* (Newport, 1844) (Weatherston & Percy 1969) i *Oriulus venustus* (Wood, 1864) (Kluge & Eisner, 1971), kao i dve vrste iz familije Julidae, *Allajulus dicentrus* i *A. nitidus* (Bodner & Raspotnig, 2012). Dalje, odsustvo 2-metil-1,4-benzohinona (**2**) je generički karakter koji verovatno odvaja rod *Allajulus* od svih ostalih predstavnika reda Julida. Moramo istaći da je u Tabeli 17 evidentirana i vrsta *Julus terrestris* koja je analizirana na početku XX veka, gde je identifikovano samo jedno jedinjenje, što je najverovatnije posledica primene manje osetljive analitičke opreme u to vreme, tako da ovu vrstu nećemo razmatrati u komparacijama sa rezultatima ove teze. Jedinjenje 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**) nije registrovana jedino kod parajulide *U. canadensis* (Weatherston & Percy, 1969). Na ovom mestu moramo izneti određenu skepsu u pogledu kompletne identifikacije odbrambenog sekreta navedene parajulide, jer su Veterston i Persi (1969) registrovali samo dva hinona i neidentifikovane alifatične komponente. Kod ostalih juliformnih stonoga jedinjenje **2** je registrovano kod 20 spirobolida (od 22 analizirane vrste) i 21 spirostreptide (od 26 analiziranih vrsta), dok je jedinjenje **7** registrovano kod 18 spirobolida i 21 spirostreptide. Evidentno je da postoji hinonska konzistentnost juliformnih diplopoda u pogledu sastava odbrambenog sekreta, ali ni jedno od jedinjenja koje je registrovano nije univerzalno prisustno kod svakog analiziranog juliformnog taksona (Julida, Spirobolida i Spirostreptida). Svakako da se u ovakvim tvrdnjama ograđujemo zbog manje osetljivosti tehnika identifikacije hemijskih komponenti

odbrambenog sekreta koji su korišćeni početkom i sredinom XX veka od strane različitih autora (sumirano u tabeli 17).

Kod epigejske vrste *U. transsilvanicus* GC-MS analizama identifikovan je širok arsenal hinonskih derivata, a takođe je identifikovana i krezolna komponenta u sastavu odbrambenog sekreta. U okviru hinonske komponente okarakterisana su sledeća jedinjenja: 1,4-benzohinon (**1**), 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), hidrohinon (**8**), 2-metilhidrohinon (**11**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (**26**), dok je krezolna komponenta bila predstavljena *p*-krezolom (**5**) i fenolom (**3**). Kao dominantna komponenta sekreta izdvaja se jedinjenje 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**). U poređnom analizom hemijskog sastava sekreta vrste *U. transsilvanicus* sa vrstom *P. hungaricus*, uočeno je da hinonska jedinjenja **6**, **19**, **21** i **26** nisu prisutna u odbrambenom sekretu vrste *P. hungaricus*, ali je kod ove vrste za razliku od prethodno analizirane identifikovan 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**). Od značaja je naglasiti da ujedno ovaj hinon nije identifikovan ni kod jedne od ostalih vrsta ispitivanih u okviru ove teze. Dalje, jedinjenje **17** nije identifikovano u odbrambenom sekretu analiziranih predstavnika familija Parajulidae i Blaniulidae, kao ni kod dve analizirane blanijulide u ovoj doktorskoj tezi. 2-Metoksi-3-metilhidrohinon (**17**) je kod predstavnika familije Julidae registrovan kod vrsta *Cylindroiulus boleti*, *C. caeruleocinctus*, *C. punctatus* (Vujisić et al., 2011; Huth, 2000), *Leptoiulus trilineatus*, *Megaphyllum bosniensis* (Vujisić et al., 2011), *Ophiulus pilosus* i *Unciger foetidus* (Roper & Heyns, 1977). Kod ostalih juliformnih stonoga je registrovano kod nekoliko vrsta Spirobolida (Wu et al., 2007) i Spirostreptida (Kuwahara et al., 2002). Stoga je u ovom trenutku teško odrediti hemotaksonomski značaj navedenog jedinjenja.

Dominantna jedinjenja u relativnom procentnom sastavu odbrambenog sekreta kod *P. hungaricus* su **7** i **2**. Važno je istaći da krezolna jedinjenja izostaju kod *P. hungaricus*. Hemotaksonomski i filogenetski značaj odsustva ovih jedinjenja diskutovan je u daljem tekstu.

Od svih analiziranih vrsta u ovoj tezi jedino je kod vrsta *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus* identifikovan hidrohinon (**8**). Ovo jedinjenje do sada nije bilo izolovano iz

odbrambenog sekreta predstavnika reda Julida. Među juliformnim stonogama hidrohinon je registrovan samo kod vrsta *Acladocricus setigerus* (Spirobolida) i *Telodeinopus aoutii* (Spirostreptida) (Wu et al., 2007; Deml & Huth, 2000) (Deml i Hut su naveli prisustvo hidrohinona i kod jedne nedeterminisane spirostreptide). Nalaz hidrohinona kod julidnih stonoga potvrđuje veliku hemijsku konzistentnost hinonskog arsenala u odbrambenom sekretu juliformnih stonoga.

Kod adultnog stadijuma vrste *C. boleti* (XI) identifikovano je deset hinonskih derivata: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**). Komparacijom hemijskog arsenala sa dve prethodno analizirane vrste, *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus*, primećeno je da 1,4-benzohinon (**1**) kod *C. boleti* odsustvuje u sastavu odbrambenog sekreta, a takođe i hinonski derivat 2-metilhidrohinon (**11**), kao i hidrohinon (**8**). Jedinjenje **1** je poznato kao sastavna komponenta odbrambenog arsenala mnogih juliformnih vrsta diplopoda, ali je i zabeleženo njegovo odsustvo kod različitih vrsta koje pripadaju filogenetski udaljenim rodovima (Tabela 17.). Jedinjenje **11** je registrovano poglavito kod cilindrojulina, mada su ga Vujisić i saradnici (2011) registrovali i kod *Leptoiulus trilineatus* i *Megaphyllum bosniense*. Isto jedinjenje do sada nije nađeno kod parajulida i blanjulida, ali kao što ćemo videti kasnije ova studija otkriva njegovo prisustvo kod jedne blanjulidne stonoge. Ponovo ističemo da u slučaju parajulida ovakva generalizacija je izneta sa rezervom jer su sve blanjulide analizirane sedamdesetih godina XX veka sa mnogo manje osetljivim analitičkim tehnikama nego danas. Jedinjenje **11** je poznato i kod tri vrste spirobolida i dve spirostreptide (Wu et al., 2007; Schmitt et al., 2004; Kuwahara et al., 2002; Deml & Huth, 2000). S druge strane jedinjenja **14** i **16** su identifikovani kod *C. boleti*, dok kod *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus* nisu bila zastupljena. Detaljnom analizom je zapaženo da je 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**) identifikovan kod jedne vrste iz familije Blaniulidae (*C. phlepsii*), ali i kod vrste *Serboilus kresnik*. Jedinjenje **16** je kao minorna komponenta registrovan još kod dve vrste predstavnika familije Julidae: *Leptoiulus trilineatus* i *Megaphyllum bosniense* (Vujisić et al., 2011). Isto jedinjenje odsustvuje kod parajulida, ali smo ga

registrovali kod jedne blanjulide. Potrebno je istaći da ovo jedinjenje do sada nije registrovano ni kod jedne spirobolide ni spirostreptide. Stoga u ovom trenutku možemo reći da 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**) moguće predstavlja hemomarker reda Julida. Kod *C. boleti* nisu identifikovana krezolna jedinjenja.

Kod tri epigejske julide analizirane u ovoj tezi dokazano je prisustvo nehinonske komponente u relativnom procentnom sastavu koji se kretao od 17, 1 % (adulti *C. boleti*) do 23 % (*U. transsilvanicus*). Kao što smo istakli u poglavlju 3. Rezultati, nehinonska komponenta poglavito uključuje heksil-estre zasićenih i nezasićenih masnih kiselina čija uloga u odbrambenim sekretima julidnih stonoga nije razjašnjenja. Rezultati ove teze pokazuju, između ostalog, da i u ovim komponentima postoje određene razlike koje potencijalno mogu imati hemotaksonomski značaj (kao što je nehinonski sastav *U. transsilvanicus*).

Specijska komparacija alomonskog sastava tri epigejske vrste analizirane u ovoj tezi, kao i juliformnih vrstama koje su ranije analizirane, pokazuje snažnu hinonsku konzistentnost, posebno u pogledu dominantnih komponenti sekreta. Međutim, potrebno je istaći da svaka analizirana vrsta ponaosob pokazuje specije-specifičan hinonski hemoprofil koji se u ni jednom slučaju apsolutno ne podudara. Drugim rečima, postoji razlika između analiziranih vrsta julida u pogledu sastava minornih hinonskih komponenti odbrambenog sekreta.



Tabela 18. Pregled hinonske i krezolne komponente prisutne u odbrambenim sekretima kod analiziranih predstavnika reda Julida.

Hinonske komponente:

- 1,4-benzohinon (1),
- 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (2),
- 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (4),
- 2-etil-1,4-benzohinon (6),
- 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7),
- hidrohinon (8),
- 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (10),
- 2-metilhidrohinon (11),
- 2,3-dimetoksihidrohinon (12),
- etil-metil-1,4-benzohinon (13),
- 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (14),
- 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15),
- 2-metoksi-5-metilhidrohinon (16)

2-metoksi-3-metilhidrohinon (17),

2,3-dimetilhidrohinon (18),

2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (19),

2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (21),

2,3,5,6-tetrametilhidrohinon (22),

2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (23),

2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (24),

2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (25) i

2-metoksi-1,4-benzohinon (26);

Krezolne komponente:

*p*-krezol (5),

fenol (3) i

*p*-etilfenol (9).

Familija i Vrsta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Julidae, Leach 1814																											
<i>Unciger transsilvanicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	
<i>Pachyiulus hungaricus</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cylindroiulus boleti</i>	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Serboiulus lucifugus</i>	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
<i>Serboiulus deelemani</i>	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	
<i>Serboiulus kresnik</i>	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	
<i>Typhloiulus nevoi</i>	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Typhloiulus serborum</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	
Blaniulidae, C.L.Koach 1847																											
<i>Nopoiulus kochii</i> (Gervais, 1847)	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Cibiniulus phlepsii</i> (Verhoeff, 1897)	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	

Kao što je prethodno istaknuto kod *U. transsilvanicus* iz odbrambenog sekreta izolovani su i *p*-krezol (5) i fenol (3). *p*-Krezol je dominantna komponenta odbrambenog sekreta predstavnika reda Callipodida. Ovo jedinjenje do sada nije identifikovano kod predstavnika redova Spirobolida i Spirostreptida, dok su u okviru reda Polydesmida *p*-krezol i fenol identifikovani kod sedam vrsta (Shear et al., 2007; Kuwahara et al., 2011). Fenol do sada nije izolovan iz odbrambenog sekreta julidnih vrsta, dok je samo kod jedne julidne vrste uočeno prisustvo *o*-krezola: *Oriulus venustus* (Wood 1864) iz familije Parajulidae (Eisner et al., 1978) zajedno sa 3-metoksi-2-metil-1,4-benzohinonom. Kao što ćemo videti kasnije krezolna komponenta je registrovana i kod kavernikolnih tiflojulidnih taksona analiziranih u ovoj tezi. Dobro je poznato da krezolna jedinjenja uspešno odbijaju mnoge insekte, kao i guštere, ptice i miševе (Eisner et al., 1963). Takođe, zemljišne ekosisteme, u kojima su ispitivane vrste diplopoda veoma brojne, naseljavaju različiti potencijalno patogeni mikroorganizmi (bakterije i gljive), a dokazano je da *p*-krezol i fenol pokazuju baktericidnu i fungicidnu aktivnost (suzbijaju rast micelija i klijanje spora) (Roncadori et al., 1985). Od interesa je naglasiti da je *U. transsilvanicus* jedina od analiziranih vrsta u okviru ove teze kod koje je identifikovan fenol (3). Pored toga, kod iste u okviru nehinonske komponente po prvi put je identifikovan izopentil-heksa-kozatetranoat, kao i izopentil-estri zasićenih i nezasićenih masnih kiselina C<sub>14</sub> - C<sub>20</sub>. Poznato je da izopentil-acetat predstavlja atraktant, feromon, alomon, i kairomon kod nekih predstavnika redova Nematoda, Diptera, Coleoptera i Hymenoptera (Terrill & Dusenbery, 1996; Brockmann et al., 2006). Za dalja istraživanja ostaje da se utvrdi uloga nehinonskih komponenti odbrambenog sekreta julidnih diplopoda. Dalje, nalazi nehinonskih komponenti odbrambenog sekreta analiziranih julida aktuelizuju nalaze Hakera (1974) koji je sugerisao da i hinonska i nehinonska komponenta odbrambenog sekreta julida verovatno igraju ulogu u komunikacijama ovih artropoda.

Sledeći segment ove teze se odnosio na analizu odbrambenog sekreta kavernikolnih tiflojulidnih taksona. Rezultati hemijskih analiza odbrambenog sekreta kod izabranih predstavnika rodova *Serboiulus* i *Typhloiulus* pokazali su interesantan hemoprofil. Rod *Serboiulus* obuhvata kavernikolne diplopode, bez očiju, sa manje ili više izraženom pigmentacijom telesnih segmenata, koji je endemičan za Balkansko poluostrvo. Od ukupno četiri vrste ovog roda ispitivane su tri vrste: *S. kresnik*, *S.*

*lucifugus* i *S. deelemani*. Detaljnom uporednom analizom uočene su intarspecijske razlike u sastavu sekreta ove tri vrste. Kod vrste *S. lucifugus* okarakterisano je 13 hinonskih jedinjenja: **2, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 20** i **21**. Krezolna jedinjenja izostaju iz sekreta kod ove vrste, kao i jedinjenje 1,4-benzohinon (**1**) koje je predstavljalo komponentu u odbrambenom sekretu dve prethodno analizirane epigejske vrste *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus*. Kod pećinske vrste *S. deelemani* identifikovano je 12 hinonskih derivata: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2-metilhidrohinon (**11**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2-etilhidrohinon (**20**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**) i 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (**25**). Za razliku od prethodne vrste *S. lucifugus* u sastavu sekreta izostaju jedinjenja **4** i **13**, a prisutno je jedinjenje **25**. Takođe su kod vrste *S. deelemani* izolovana i krezolna jedinjenja iz odbrambenog sekreta: *p*-krezol (**5**) i *p*-etilfenol (**9**), dok kao i kod *S. lucifugus* 1,4-benzohinon (**1**) izostaje. Krezolna jedinjenja su se u sekretu pojavljivala kao minorne komponente, ili kao jedinjenja u tragovima. Prethodno je već pomenuto da *p*-krezol poseduje baktericidno i fungicidno dejstvo, kao i da odvrća brojne predatore, kako invertebrate, tako i vertebrate. Iako se radi u minornim komponentama sekreta, ova jedinjenja verovatno u određenoj meri povećavaju samu efektivnost odbrambenog sekreta (Duffey et al., 1977). Hinonski profil kavernikolne vrste *S. kresnik* je poslužio kao pretpostavka da se u ovom slučaju radi o novom taksonu, što je kasnija detaljna uporedno-morfološka analiza i potvrdila. Uočen je raznovrstan spektar hinona, predstavljen sa čak 17 jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2-metilhidrohinon (**11**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), etil-metil-1,4-benzohinon (**13**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2-etilhidrohinon (**20**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (**24**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (**25**) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (**26**). Jedino je kod ove vrste, od svih analiziranih vrsta u našim rezultatima, identifikovan hinon 2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (**24**); ovo jedinjenje je po prvi put registrovano

kod diplopoda generalno. GC-MS analize odbrambenog sekreta ove vrste nisu pokazale prisustvo krezolne komponente, a identično kao i kod prethodne dve analizirane vrste roda *Serboiulus* izostaje i jedinjenje **1**.

Sa hemotaksonomskog i filogenetskog aspekta značajno je istaći da je kod sve tri ispitivane vrste serbojulusa dominantna komponenta odbrambenog sekreta bio hinon 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), koji je registrovan i kod epigejske vrste *U. transsilvanicus*. Ovo jedinjenje nije registrovano kod blanjulida i parajulida, ali je registrovano kod dve vrste iz familije Julidae (Huth, 2000), kao i dve spirostreptide i dve spirobolide (Wu et al., 2007; Deml and Huth, 2000). Kod sve tri vrste rod *Serboiulus* dokazan je i 2-etilhidrohionon (**20**), koji do sada nije registrovan kod diplopoda generalno, kao minorna komponenta sekreta.

Drugi analizirani kavernikolni rod je *Typhloiulus* koji uključuje vrste sa slabo izraženom pigmentacijom tela, bez očiju, sa izmenjenim određenim delovima usnog aparata i dugim nogama, kao adaptaciju na kavernikolni način života (Mauriès et al., 1997). Na teritoriji naše zemlje je rasprostranjeno pet vrsti ovog roda, od kojih su u okviru ove teze analizirane dve: *T. nevoi* i *T. serborum*. Rezultati su pokazali da je u okviru hinonske komponente sekreta vrste *T. nevoi* okarakterisano devet jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2,3-dimetoksihidrohionon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**). Benzohinon **1** kao i kod prethodno analiziranih vrsta roda *Serboiulus* izostaje, a nisu identifikovani ni krezoli. Kod vrste *T. serborum* analize su pokazale prisustvo 12 hinonskih jedinjenja: **2, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 20** i **22**. Komparacijom sa svim prethodno analiziranim vrstama, kako epigejskim, tako i kavernikolnim, prisustvo 2,3,5,6-tetrametilhidrohionona (**22**) je registrovano jedino u odbrambenom sekretu *T. serborum*. Ovo jedinjenje je ujedno, prema našim saznanjima, nova komponenta, po prvi put izolovana iz sekreta diplopoda. Za razliku od grupe hinonskih jedinjenja identifikovanih kod *T. nevoi*, u slučaju *T. serborum* u sastavu odbrambenog sekreta izolovani su i sledeći hinoni: **11, 13, 18, 20**, i **22**, dok jedinjenja **12** i **19** izostaju. Kod *T. serborum* prisutna je i krezolna komponenta: *p*-krezol (**5**) i *p*-etilfenol (**9**), dok kao i kod svih prethodno ispitivanih

kavernikolnih vrsta diplopoda jedinjenje **1** izostaje. Kod obe analizirane vrste roda *Typhloiulus* dominantna komponenta sekreta je 2-etil-1,4-benzohinon (**6**).

Kod analiziranih tiflojulina (izuzev *T. serborum*) registrovan je značajno veći sadržaj nehinonske komponente u odnosu na sadržaj kod epigejskih taksona (Tabela 4). Visok procenat nehinonske komponente je registrovan i kod III postembrionalnog stupnja *C. boleti* (Tabela 5). Ovakva semiohemija odbrambenog sekreta tiflojulina ukazuje na moguće adaptacije na pećinski način života (što bi moglo značiti i da ove nehinonske komponente imaju ulogu i u intraspecijskim komunikacijama u uslovima male gustine populacije), ali i mogućnost da je sastav ozadena rezultat neotenijske. Ovo bi svakako bio interesantan pravac daljih istraživanja semiohemije julida, ali i diplopoda generalno.

Generalno, kod tiflojulidnih taksona postoji hinonska konzistentnost, ali su slično kao i kod epigejskih analiziranih julida, utvrđeni i specifični hemoprofilni svakog taksona ponaosob, što u krajnjoj istanci potvrđuje i njihov taksonomski status i potvrđuje značaj integrativne taksonomije.

Predstavnici familije Blaniulidae su izdužene i tanke stonoge (Blower, 1985), zapadno palearktičke distribucije, sa širokim rasprostranjenjem na evropskom kontinentu, gde je prisutno 19 rodova sa brojnim vrstama (Enghoff, 1984; Enghoff & Shelley, 1979; Hoffman, 1979). Jedan od najrasprostranjenijih evropskih rodova je *Nopoiulus* Menge, 1851. U okviru ove teze u cilju utvrđivanja hemoprofila na nivou familija, analizirana je vrsta ovog roda *N. kochii*. Ova troglofilna vrsta je jedna od sitnijih julida u Srbiji, sa brankasto obojenim telesnim segmentima, i nešto tamnije braon obojenim ozadenama. Ovaj blanijulidni takson prvi put je sakupljen na teritoriji jugoistočne Srbije (pećina Velika Balanica, selo Sićevo, u okolini Niša) 2005 godine i nakon toga detaljno opisan (Makarov & Tomić, 2011). Iz iste familije analizirana je i vrsta *C. phlepsii*, po prvi put zabeležena na teritoriji severne Srbije 2013 godine (Antić et al., 2013).

Nakon analiza sekreta vrste *N. kochii* okarakterisano je ukupno osam hinonskih jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-metilhidrohino (**11**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2,3-dimetilhidrohino (**18**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohino (**21**), dok je kod *C. phlepsii* nađeno

sedam hinoskih jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (2), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (4), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (16), 2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (23) i 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (14). Za razliku od prethodno ispitivanih kavernikolnih vrsta roda *Serboiulus* i *Typhloiulus*, kod kojih je dominantna hinonska komponenta sekreta bio 2-etil-1,4-benzohinon (6), kod *N. kochii* i *C. phlepsii* zapaženo je da u sekretu dominira frakcija 2-metil-1,4-benzohinona (2), kao što je to potvrđeno i u slučaju epigejskih vrsta *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus*. Međutim, kao ni kod kavernikolnih vrsta roda *Serboiulus* i *Typhloiulus*, analizama sekreta nije potvrđeno prisustvo 1,4-benzohinona (1).

Nakon komparacije rezultata ove teze sa podacima koji se odnose na prethodno analizirane vrstame iz familije Julidae, došlo se do zaključka da hemijski sastav odbrambenog sekreta pokazuje homogenost za juliformne diplopode, odnosno da su određene hinonske komponente karakteristične i da se pojavljuju kao poglavito dominantni alomoni u sekretu svih do sada ispitivanih vrsta. 2-Metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7) je identifikovan u sastavu odbrambenog sekreta kod svih analiziranih predstavnika familije Julidae (Tabela 17) (izuzetak je *J. terrestris*, što smo već objasnili na početku ovog poglavlja). Jedinjenje 2-metil-1,4-benzohinon (2) je takođe karakteristična hinonska komponenta za većinu vrste iz familije Julidae, nije identifikovan jedino kod tri vrste iz pomenute familije: *Allajulus dicentrus* (Latzel, 1884), *A. nitidus* (Verhoeff, 1891) i *Enantiulus nanus* (Latzel, 1884), kao ni kod dve vrste iz familije Parajulidae: *Oriulus venustus* (Wood 1864) i *Uroblaniulus canadensis* (Newport, 1844) (Tabela 17). Jedinjenje 1,4-benzohinon (1) izostaje iz sekreta ispitivanih pećinskih vrsta roda *Serboiulus* i *Typhloiulus* (rezultati ove teze, Tabela 18), kao i kod svih do sada analiziranih vrsta iz familije Blaniuludae. Njegovo odsustvo mogao bi biti još jedan hemomarker ove familije. Međutim, ovaj hinon nije identifikovan ni kod sledećih vrsta iz familije Julidae: *Allajulus dicentrus*, *A. nitidus*, *Enantiulus nanus*, *Cylindroiulus boleti*, *C. luridus*, *Megaphyllum bosniense*, *Ophiulus pilosus*, *Unciger foetidus*, kao ni kod parajulidne vrste *O. venustus* (Tabela 17).

Postoji veoma malo relevantnih studija novijeg datuma na semiohemiji odbrambenih sekreta evropskih julida, ali i juliformnih stonoga generalno. Tri skorašnje studije urađene na evropskim vrstama julida (Huth, 2000; Vujisić et al., 2011; Bodner &

Raspotnig, 2012) su pokazale slične hemoprofile odbrambenog sekreta u odnosu na vrste analizirane u okviru ove teze. Kod tri julidne vrste iz Srbije GC-MS analizama identifikovana je kompleksna mešavina 12 hinonskih jedinjenja u sastavu sekreta: 1,4-benzohinon (1), 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (2), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (4), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (19), 2-metilhidrohionon (11), 2-metoksi-5-metilhidrohionon (16), 2,3-dimetoksihidrohionon (12), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (15), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (19), 2-metoksi-3-metilhidrohionon (17) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohionon (21) (Vujisić et al., 2011). Generalno, prisustvo svih 12 navedenih hinona je potvrđeno kod analiziranih julida u ovoj tezi (Tabela 18). Od interesa je napomenuti da kod vrsta *L. trilineatus* i *C. boleti* 1,4-benzohinon izostaje (Vujisić et al., 2011), a isto je zapaženo i kod dva predstavnika familije Blaniulidae, kao i kod pečinskih vrsta roda *Serboiulus* i *Typhloiulus* koje su obuhvaćene rezultatima ove teze (Tabela 18.).

Jedina do sada analizirana vrsta roda *Unciger* (Brandt, 1841) je bila *U. foetidus* (Röper & Heyns, 1977). Kod ove vrste su identifikovana samo četiri hinonska derivata: 1,4-benzohinon (1), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7), 2-metil-1,4-hidrohionon (toluhidrohionon) (11) i 2-metoksi-3-metil-1,4-hidrohionon (17). U okviru eksperimentalnog dela ove teze analizirana je druga vrsta ovog roda *U. transsilvanicus*. Analizom odbrambenog sekreta ozadena kod vrste *U. transsilvanicus*, kao što je prethodno već istaknuto, identifikovano je 13 hinonskih jedinjenja, sa dominantnim toluhinonom i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohionom. Sva hinonska jedinjenja okarakterisana kod ove vrste, takođe predstavljaju alomone kod prethodno pomenutih vrsti rodova *Cylindroiulus* (Verhoeff, 1894), *Leptoiulus* (Verhoeff, 1894) i *Megaphyllum* (Verhoeff, 1894). Poređenje ovih rezultata sa hemijskim analizama vrste *U. foetidus* dovelo je do pretpostavke da analize rađene sedamdestih godina prošlog veka nisu bile pouzdane, pre svega zbog manje osetljivosti tadašnjih instrumentalnih tehnika, kao i zbog različitog načina pripreme uzoraka za ekstrakciju.

U okviru klade *Cylindroiulini*, kojoj pripadaju rodovi: *Cylindroiulus*, *Allajulus* (Koch, 1847) i *Enantiulus* (Attems, 1894) (Read, 1990), ispitivane vrste rodova *Cylindroiulus* i *Enantiulus* su pokazivale kompleksnu mešavinu različitih hinonskih derivata u svom sekretu, sa dominirajućim toluhinonom i 2-metoksi-3-metil-1,4-

benzohinonom (Schildknecht & Weis, 1961; Huth, 2000; Vujisic et al., 2011), dok je kod analiziranih vrsta roda *Allajulus* primećen izostanak toluhinona. Kod vrste *A. nitidus* iz sekreta je izolovano samo jedno hinonsko jedinjenje- 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (Tabela 4.1.), bez toluhinona, a kod vrste *Allajulus dicentrus* 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) takođe izostaje (Bodner & Raspotnig, 2012). Ni kod jedne od devet vrsta koje su analizirane u okviru ove teze nije primećen izostanak toluhinona (Tabela 18). Kod adultnih jedinki vrste *A. dicentrus* identifikovana su svega četiri hinonska jedinjenja: 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon, 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon, 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon i 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (Bodner & Raspotnig, 2012). Sva četiri pomenuta hinona su takođe identifikovana i u sastavu odbrambenog sekreta kod analiziranih vrsta u okviru ove teze, s tim što 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon kod vrsta *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus* izostaje.

Studija urađena na osam julidnih evropskih vrsta: *Julus scandinavus* (Latzel, 1884), *Leptoiulus proximus* (Nemec, 1896), *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758), *Tachypodoiulus niger* (Leach, 1814), *Enantiulus nanus*, *Cylindroiulus punctatus* (Leach, 1815), *C. meinerti* (Verhoeff, 1891) i *C. caeruleocinctus* (Wood, 1864) pokazala je prisustvo devet hinonskih jedinjenja u sekretu: 1,4-benzohinon, 2-metoksi-1,4-benzohinon, 2-etil-1,4-benzohinon, 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon, 2-metoksi-5-metil-1,4-benzohinon, 2-metoksi-6-metil-1,4-benzohinon, 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon i 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (Huth, 2000). Nakon poređenja rezultata ove teze sa pomenutom studijom primećene su određene razlike. Jedinjenje 2-metoksi-1,4-benzohinon, identifikovano kao jedinjenje u tragovima ili kao minorna komponenta sekreta kod osam prethodno navedenih vrsta, jedino je izolovano iz odbrambenog sekreta kod vrste *U. transsilvanicus* u okviru naših rezultata (Tabela 18). Takođe 2-metoksi-5-metil-1,4-benzohinon i 2-metoksi-6-metil-1,4-benzohinon nisu identifikovana kao komponente sekreta ni kod jedne vrste u okviru ove teze, dok je jedinjenje 2-etil-1,4-benzohinon prisustvo jedino u sekretu pećinskih vrsta roda *Serboiulus* i *Typhloiulus* (Tabela 18).

Pored intraspecijske razlike između analiziranih vrsta, uočena je i određena intragenerička razlika. Kod epigejskih vrsta rodova *Unciger* i *Pachyiulus* (Berlese, 1883) glavnu hinonsku komponentu sekreta su činila dva jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (2) i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (7), a sličan sastav



odbrambenog sekreta je primećen i kod adultnih jedinki (stadijum XI) analizirane vrste roda *Cylindroiulus*, odnosno jedinjenje **7** je bilo dominantno u sekretu. Ovi rezultati se slažu sa drugim studijama rađenim na vrstama roda *Cylindroiulus*. Kod vrste *C. boleti* već je ranije uočeno da glavnu komponentu sekreta predstavlja 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**) (Vujisić et al., 2011), a isto je zapaženo i kod još tri vrste pomenutog roda: *C. punctatus*, *C. meinerti* i *C. caeruleocinctus* (Huth, 2000). Na osnovu ovakih rezultata može se pretpostaviti da je jedinjenje **7** glavna komponenta odbrambenog sekreta vrsta roda *Cylindroiulus*. Ista situacija je zapažena i kod vrsta roda *Leptoiulus*; kod *L. proximus* (Huth, 2000) i *L. trilineatus* (Vujisić et al., 2011) u sastavu sekreta je dominantan 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**).

Kod svih do sada ispitivanih vrsta roda *Cylindroiulus* jedinjenje 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**) je bilo među glavnim komponentama sekreta (Huth, 2000; Vujisić et al., 2011). Kao što je već naglašeno, kod roda *Allajulus*, koji pripada istoj kladi cilindrojulini, ovaj hinonski derivat nije identifikovan, tako da se pretpostavlja da je za ovaj rod, koji se smatra parafiletским (Read, 1990) ovo karakteristično.

Takođe su uočene i određene razlike u kvalitativnom sastavu sekreta između analiziranih rodova *Unciger*, *Pachyiulus* i *Cylindroiulus*. Kod sva tri roda hemijski sastav sekreta pokazao je karakterističan obrazac hinonskih derivata. Značajno je naglasiti da kod roda *Cylindroiulus* jedinjenje 1,4-benzohinon (**1**) odsustvuje (Tabela 19), što se pokazalo i u rezultatima Vujisića i saradnika (2011). U okviru familije Julidae ovaj hinon nije identifikovan ni u odbrambenom sekretu kod rodova *Allajulus*, *Enantiulus*, *Unciger* i *Ophiulus* (Tabela 17.). U našim rezultatima i kod roda *Unciger* i kod roda *Pachyiulus* identifikovano je ovo jedinjenje. Bitno je istaći da je jedino kod roda *Unciger* identifikovano prisustvo hinonskih jedinjenja 2-etil-1,4-benzohinona (**6**) i hidrohina (**8**), kao i krezolne komponente sekreta koje čine *p*-krezol (**5**) i fenol (**3**). Sve navedene komponente nisu uočene kod analiziranih rodova *Pachyiulus* i *Cylindroiulus*.

Uporednom analizom rodova *Unciger*, *Pachyiulus* i *Cylindroiulus* sa kavernikolnim vrstama roda *Serboiulus* i *Typhloiulus* uočene su značajne razlike pre svega u kvantitativnom sastavu sekreta. U sekretu najzastupljenije jedinjenje kod svih pećinskih vrsta bilo je 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), za razliku od analiziranih epigejskih rodova kod kojih su u sastavu sekreta procento najzastupljenija bila jedinjenja **7** i **2**.

Među julidnim vrstama prisustvo 2-etil-1,4-benzohinona je do sada jedino potvrđeno kao minorne komponente odbrambenog sekreta kod vrsta *O. sabulosus* i *C. caeruleocinctus* (Huth, 2000), a u našim rezultatima identifikovano je jedino kod *U. transsilvanicus*, takođe kao jedinjenje u tragovima. Ovaj hinon prisutan je među diplopodama i kod pojedinih predstavnika Spirobolida (Wu et al., 2007), Spirostreptida (Deml & Huth, 2000), a registrovan je i kod opiliona iz familije Gonyleptidae (Sundevall, 1833) (Opiliones: Gonyleptidae) (Raspotnig, 2012), kao i kod nekih vrsta insekata iz redova Coleoptera, Dermaptera i Dycitoptera (Eisner, 2005). Moguća je pretpostavka da je razlika u hemijskom sastavu sekreta posledica načina života ovih vrsta, koje naseljavaju isključivo pećinske ekosisteme, gde je i broj potencijalnih predatora ograničen, uslovi na staništu su izmenjeni, s obzirom na da je evolucija odbrambenih sekreta usko povezana sa variranjem lokalnih uslova okoline.

Takođe je kod predstavnika rodova *Serboiulus* i *Typhloiulus* identifikovan i hinon 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), koji nije zabeležen kod rodova *Unciger*, *Pachyiulus* i *Cylindroiulus*. Pokazano je da je ovo hinonsko jedinjenje, kod jedne vrste opiliona iz prethodno pomenute familije Gonyleptidae efikasniji repelent za invertebrate (mravi i pauci), nego za vertebrate (Machado et al., 2005).

Kod rodova *Serboiulus* i *Typhloiulus* registrovana je i krezolna komponenta u sekretu : *p*-krezol (**5**) i *p*-etilfenol (**9**), a kao što je to bio slučaj i kod roda *Cylindroiulus*, nije identifikovan 1,4-benzohinon (**1**).

Komparacijom svih ispitivanih vrsta iz familije Julidae (Tabela 18.), uključujući i adultni stupanj vrste *C. boleti* (Tabela 19.), sa dva analizirana predstavnika iz familije Blaniulidae (Tabela 18.), primećene su značajne razlike u sastavu odbrambenog sekreta. Pre svega, kod blanijulida nije identifikovan tako širok spektar hinonskih jedinjenja, u odnosu na julidne vrste. Kao što je već prethodno rečeno, kod *N. kochii* okarakterisano je ukupno osam hinonskih jedinjenja, dok je kod vrste *C. phlepsii* broj hinonskih jedinjenja bio sedam. Jedina dosadašnja studija analize hemijskog sastava odbrambenog sekreta kod blanijulida urađena je na vrsti *Blaniulus guttulatus* (Fabricius, 1798) (Weatherston et al., 1971). Kod ove vrste identifikovana su svega dva hinonska derivata: 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon i 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon), ali je zato nehinonska komponenta od tri vrste acetata dugačkih lanaca bila zastupljena sa čak 20% u ukupnom procentom sastavu sekreta. Naši rezultati su pokazali da nehinonska

komponenta sačinjava znatno manju frakciju u sastavu sekreta (kod *N. kochii* 8,0%, a kod *C. phlepsii* 1,8%).

Jedinjenje 1,4-benzohinon (**1**) kod predstavnika familije Blaniulidae analiziranih ovom tezom odsustvuje, kao što je to bio i slučaj kod kavernikolnih vrsta julida i vrste *C. boleti*, ali je zato identifikovano kod epigejskih vrsta *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus*. Takođe kod blanijulidnih vrsta iz sekreta nisu izolovana jedinjenja 2-etil-1,4-benzohinon (**6**) i 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), koja su u velikoj meri bila zastupljena kod kavernikolnih vrsta, ali zato nisu identifikovana kod epigejskih vrsta (izuzetak je *U. transsilvanicus* kod koga se pojavljuje jedinjenje **6**). Kod blanijulida nisu zastupljeni ni sledeći hinonski derivati: **12**, **17**, **22**, **24** i **26**. Jedinjenja **13**, **20** i **25** nisu identifikovana kod analiziranih predstavnika blanijulida, kao ni kod vrsta *U. transsilvanicus*, *P. hungaricus* i *C. boleti*, ali su zato bila zastupljena kod pojedinih kavernikolnih julidnih vrsta (jedinjenje **13** kod *S. lucifugus*, *S. kresnik* i *T. serborum*, jedinjenje **20** kod *S. lucifugus*, *S. deelemani*, *S. kresnik* i *T. serborum* i jedinjenje **25** kod *S. deelemani* i *S. kresnik*).

Dalje, kod obe analizirane blanijulide je registrovan značajno manji sadržaj nehinonske komponente u odnosu na sadržaj kod analiziranih predstavnika familije Julidae. U ovom trenutku iznosimo hipoteze da je nisko prisustvo nehinona kod blanijulida hemotaksonomski marker ove familije, koji ih odvaja od svih juliformnih diplopoda. Ispitivanja na većem broju blanijulida će potvrditi da li je nizak sadržaj nehinonske komponente hemotaksonomski signal koji ima suprageneričku vrednost. Primećeno je i odsustvo krezolne komponente jedinjenja u sastavu odbrambenog sekreta kod blanijulida.

Ponovo ističemo da je u okviru nehinonske komponente odbrambenog sekreta kod pojedinih analiziranih julida u ovoj tezi registrovano prisustvo *p*-krezola, fenola i *p*-etilfenola, kao i heksil-estri zasićenih i nezasićenih C<sub>14</sub>–C<sub>20</sub> kiselina. Ističemo da je fenol (**3**) u našim rezultatima identifikovan jedino kod vrste *U. transsilvanicus*, ali je ujedno i prva identifikacija ovog jedinjenja kod svih julida. Jedinjenje *p*-krezol (**5**) je bilo zastupljeno kod vrste *U. transsilvanicus*, kao i kod kavernikolnih vrsta *S. deelemani* i *T. serborum*, dok je treća krezolna komponenta sekreta *p*-etilfenol (**9**) identifikovana kod vrsta *S. deelemani* i *T. serborum*.

Kao što je već prethodno naglašeno, *p*-krezol je karakterističan alomon za predstavnike reda Callipodida, s obzirom da je identifikovan kao glavna komponenta sekreta kod svih pet do sada analiziranih vrsta, dok kod predstavnika redova Spirobolida i Spirostreptida nije identifikovan, a u okviru reda Polydesmida *p*-krezol, kao i fenol, su jedino zastupljeni kod sedam vrsta (Shear et al., 2007; Kuwahara et al., 2011). Do sada je samo kod jedne julidne vrste uočeno prisustvo *p*-krezola: *O. venustus* iz familije Parajulidae (Eisner et al., 1978), dok fenol do sada nije izolovan iz odbrambenog sekreta julidnih vrsta. Izuzev kod kalipodida, kod predstavnika drugih redova *p*-krezol i fenol se uvek javljaju kao minorne komponente sekreta (jedini izuzetak od ovoga je polidezmidna vrsta *Leonardesmus injuncundus* (Shelley & Shear, 2006) kod koje se odbrambeni sekret sastoji isključivo od krezolnih jedinjenja (Shear et al., 2007)). Fenol je među terestričnim artropodama distribuiran kod nekih predstavnika opiliona (Travunoidea) (Rasputnig, 2012), kao i kod mnogih redova insekata (Coleoptera, Dytipotera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, ili *Romalea guttata* (Houttuyn, 1813) iz reda Orthoptera) (Eisner et al., 2005). Dobro je poznata baktericidna i fungicidna aktivnost *p*-krezola, kao i njegova odbrambena uloga u odvrćanju mnogih predatora, pre svega među invertebratama, tako da u kompleksnoj mešavini benzohinona kod *S. deelemani* i *T. serborum*, odnosno benzo- i hidrohina kod *U. transsilvanicus*, ovo jedinjenje povećava efikasnost i odbrambeni potencijal samog sekreta. Takođe, relativna procentna zastupljenost *p*-krezola, kao i fenola, u sastavu sekreta, može varirati i zavisno od sredinskih uslova na različitim staništima koja naseljavaju ispitivane vrste, kao što je to već pokazano u slučaju polidezmidne vrste *Chamberlinius hualienensis* (Wang, 1956) (Taira & Arakaki, 2002). Poznato je i da su fenolne komponente prekursori različitih benzohinona, i pretpostavljeno je da su stoga biosinteze fenola i benzohinona u korelaciji (Tschinkel, 1969).

Svakako je značajno pomenuti da je kod vrste *U. transsilvanicus* u okviru nehinonske komponente po prvi put identifikovan izopentilheksakozatetranoat, i izopentil-estri zasićenih i nezasićenih masnih kiselina C<sub>14</sub> - C<sub>20</sub>.

Za nehinonske komponente je već pomenuto da služe kao rastvarači za hinone (Eisner et al., 2000), a poznato je i da nehinonska jedinjenja identifikovana kod vrste *Anaulaciuyulus sp.* (Shimizu et al., 2012) kod pojedinih predstavnika artropoda funkcionišu kao feromoni (*n*-heksil-laurat, *n*-heksil-kaprat ili *n*-heptil-laurat), kao

signali za specijsku komunikaciju i prepoznavanje (*n*-heksil-miristat), ili pak imaju mikrobicidno dejstvo (*n*-heksil *n*-tridekanoat), ali je njihova odbrambena uloga još uvek pod znakom pitanja. Za neke aldehide identifikovane kod julida (npr. (*E*)-2-dekenal kod vrste *A. dicentrus*) je već ranije dokazano da imaju fungicidno dejstvo [(*E*)-2-dekenal kod vrste *Nezara viridula* je pokazao selektivnu fungistatičku aktivnost za određene entomopatogene gljive, uključujući i *Metarhizium anisopliae* (Gomez et al., 1997)].

Smatramo da je identifikacija *p*-krezola i fenola kod pojedinih analiziranih julida (*U. transsilvanicus*, *S. deelemani* i *T. serborum*) od važnosti razrešavanju filogenetskih odnosa između klada Juliformia (Julida, Spirobolida, Spirostreptida), Merocheta (Polydesmida), i Nematophora (Chordeumatida, Callipodida, Stemmiulida). Postoje različita tumačenja međuodnosa i filogenije navedenih grupa diplopoda, o čemu će detaljnije biti diskutovano u podpoglavlju 5.3.

Na kraju ističemo da s obzirom na relativnu homogenost identifikovanih, posebno glavnih hinonskih jedinjenja, pretpostavka je da bi nehinonska komponenta odbrambenog sekreta takodje mogla poslužiti kao potencijalni hemotaksonomski marker, uzevši u obzir i veliku raznovrsnost do sada izolovanih nehinonskih jedinjenja, kao i njihove kvantitativne razlike u sastavu sekreta.

## **5.2. Ontogenetski aspekti semiohemije odbrambenih supstanci kod analiziranih julida**

Posebna pažnja u ovoj tezi je posvećena analizi sastava odbrambenog sekreta različitih uzrasnih stadijuma tokom postembriogeneze vrste *C. boleti* iz familije Julidae, počev od III do XI stadijuma. Karakterističan tip postembrionalnog razvića kod svih julida je euanamorfoza. Kod ovog tipa postembrionalnog razvića svako presvlačenje uključuje dodavanje novih somita, čak i posle sticanja polne zrelosti. Ne postoji definisani poslednji stadijum u povećanju broja somita.

Analizama je identifikovano ukupno 10 hinonskih jedinjenja u sastavu odbrambenog sekreta različitih postembrionalnih stupnjeva: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2-metoksi-3-

metilhidrohinon (**17**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**).

Kod prvog analiziranog stadijuma (III) identifikovana su tri hinonska jedinjenja: 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-metoksi-3-metil-hidrohinon (**17**), sa preovlađujućom frakcijom 2-metil-3,4-metilendioksifenola (**15**) (58,7%). U narednom stadijumu (IV) dolazi do sinteze još tri hinonska derivata: 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinona (**14**), 2,3-dimetoksihidrohinona (**12**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinona (**21**), a kao glavna komponenta sekreta identifikovan je 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**). Kod stadijuma V, pored prethodno pomenutih hinonskih derivata, javljaju se još tri hinona: 2-metil-1,4-benzohinona (toluhinona) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinona (**4**) i 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinona (**19**), a ukupan broj identifikovanih hinonskih derivata bio je sedam. Interesanto je da jedinjenja **17** i **21**, koja su već sintetisana i identifikovana kod stadijuma IV, kod narednog analiziranog stadijuma (V) odsustvuju. Analizom stadijuma VI takođe je utvrđeno prisustvo sedam hinona, ali su uočene određene razlike u arsenalu hinonskih jedinjenja, u odnosu na stadijumV.

Tabela 19. Pregled hinonskih jedinjenja prisutnih u odbrambenim sekretima kod analiziranih postembrionalnih stadijuma vrste *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847).

Hinonska jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**).

Stadijum	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>21</b>
<b>III</b>	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
<b>IV</b>	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
<b>V</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
<b>VI</b>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
<b>VII</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>VIII</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>IX</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>X</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>XI</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Kod stadijuma VI jedinjenja **4** i **19** odsustvuju, ali su zato identifikovana jedinjenja **17** i **21**, koja nisu utvrđena kod stadijuma V. Već od stadijuma VII dolazi do sintetisanja gotovo većine hinona karakterističnih za adultne julide. Značajno je pomenuti da od stadijuma VII takođe dolazi i do pojave polnog dimorfizma, odnosno javljaju se začeci gonopoda (primordijalni začeci gonopoda) na sedmom telesnom segmentu kod mužjaka; konsekvntno mužjaci imaju jedan par nogu za hodaње manje u odnosu na ženke. Prvo pojavljivanje polnog dimorfizma prati završetak perioda diverzifikacije; normalne noge sedmog telesnog segmenta kod mužjaka se zamenjuju rudimentima gonopoda. Potpuna zrelost se dostiže nakon još dva postembrionalna stadijuma, tako da razviće gonopoda uključuje tri postembrionalna stupnja, kod nekih vrsta i više. Za većinu vrsta roda *Cylindroiulus* stadijum u kome se javlja polni dimorfizam je VII (Enghoff & Dohle, 1993). Kod stadijuma VII identifikovano je devet hinonskih jedinjenja: 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohion (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-3-metilhidrohion (**17**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohion (**21**).

Kod analiziranih stadijuma VIII, IX, X i XI identifikovan je identičan arsenal hinonskih derivata: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohion (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohion (**16**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohion (**21**). Uočeno je da se od stadijuma VIII prvi put pojavljuje i jedinjenje **16**, dok za razliku od prethodno analiziranih stadijuma (izuzev V), prisustvo jedinjenja 2-metoksi-3-metilhidrohiona (**17**) nije utvrđeno kod stadijuma VIII, IX, X i XI. Broj jedinki u uzorcima stadijuma VIII, IX, X i XI koji su analizirani dat je u okviru poglavlja 3 Rezultati (Tabela 15).

Dominantu frakciju odbrambenog sekreta od stadijuma IV činilo je jedinjenje 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**). Kao što je već istaknuto, prethodne studije rađene na adultnim vrstama roda *Cylindroiulus*: *C.boleti* (Vujisić et al., 2011) i *C. punctatus*, *C. meinerti* i *C. caeruleocinctus* (Huth, 2000) su takođe potvrdile da je ovaj hinon glavna komponenta sekreta.



Jedini do sada dostupan literaturni podatak o hemijskom sastavu odbrambenog sekreta kod postembrionalnih stupnjeva julida je rad austrijskih naučnika Bodnera i Raspotniga na vrsti *Allajulus dicentrus* (Bodner & Raspotnig, 2012). Ovom studijom obuhvaćeni su stadijumi III, IV, V i VI, kao i adultne jedinke, a identifikovana su samo četiri hinonska derivata: 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon, 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon, 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon i 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon. Evidentno je da kod navedene vrste nisu analizirani svi postembrionalni stadijumi. Već je ranije naglašeno da kod svih do sada ispitivanih vrsta roda *Allajulus* toluhinon izostaje kao komponenta odbrambenog sekreta. Ovo jedinjenje u našim rezultatima kod *C. boleti* identifikovano je tek od postembrionalnog stadijuma V.

Uporedna analiza rezultata ove teze sa rezultatima Bodnera i Raspotniga na vrsti *A. dicentrus*, koja takođe pripada porodici Julidae, pokazala je određenu sličnost, odnosno i kod juvenilnih jedinki vrste *A. dicentrus* (od stadijuma III do stadijuma VI), u sastavu sekreta takođe preovladava frakcija 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinona. Međutim, kod *C. boleti* dominantna frakcija u III stadijumu je jedinjenje **15**. Na osnovu ovakvih rezultata smatramo da je 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon primarni alomon kod ispitivanih vrsta (verovatno i šire) i da do njegove sinteze dolazi već u najranijim fazama ontogenetskog razvića. Takođe, smatramo da je verovatno i repelentna uloga ovog jedinjenja najsnažnija. Studija na *A. dicentrus* pokazala je da je hinon 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon zastupljen kao minorna komponenta sekreta kod svih analiziranih stadijuma (III, IV, V i VI), dok u našim rezultatima ovaj hinonski derivat odsustvuje kod stadijuma III, IV i VI, a kod stadijuma X je zastupljen kao supstanca u tragovima. Takođe su 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon i 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon kod *A. dicentrus* identifikovani kod svih stadijuma, dok kod *C. boleti* 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon u sekretu stadijuma III odsustvuje, a 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon nije zastupljen kod stadijuma III, IV i VI. Ovakvi rezultati snažno podržavaju ranije iznetu ideju u ovoj tezi o specifičnosti hemoprofila svakog pojedinačnog taksona. Drugim rečima i hemoprofilu tokom postembriogeneze različitih vrsta pokazuju specifičnosti.

Od važnosti je pomenuti da je u okviru rezultata ove teze samo kod prvog analiziranog stadijuma (III) uočeno da je procentna zastupljenost nehinonske komponente u ukupnom sastavu odbrambenog sekreta značajno veća od procetne

zastupljenosti hinonskih derivata (Tabela 5: nehinonska komponenta je iznosila 73,3%, dok je hinonska komponenta iznosila 26,7%). Na svim narednim analiziranim stadijumima taj odnos se srazmerno menja, odnosno hinonska jedinjenja su procetno zastupljenija u sastavu sekreta, što pokazuje podudaranje sa sekretom analiziranih adultnih jedinki. Rezultati Bodnera i Raspotniga na vrsti *A. dicentrus* nisu pokazali ovakvu situaciju. Kod analiziranih juvenilnih jedinki vrste *A. dicentrus* kao nehinonska komponenta identifikovana je serija alifatičnih (*E*)-alkenala ((*E*)-2-heptenal, (*E*)-2-oktenal, (*E*)-2-nonenal, (*E*)-2-dekenal) zajedno sa odgovarajućim alkoholima. Kod najranijih ispitivanih stadijuma (III i IV) uočene su samo frakcije hinonskih jedinjenja, dok je do pojave alkenola i alkenala došlo tek u kasnijim postembrionalnim stadijumima (V i VI). Pomenuti austrijski naučnici su prepostavili da do ovoga dolazi zbog toga što se biosinteza benzohinona i (*E*)-alkenala odigrava u različito vreme tokom ontogeneze. Moguća je pretpostavka da pojava ovako velike koncentracije nehinonskih jedinjenja u našim rezultatima kod stadijuma III vrste *C. boleti* omogućava veću efikasnost i pojačava odbrambenu moć sekreta, s obzirom na činjenicu da su kod ovog analiziranog stadijuma identifikovana samo tri hinonska jedinjenja.

Poznato je da se u odbrambenom sekretu kod većine artropoda koje sadrže benzohinone kao repelente, pojavljuju i ugljeni hidrati kao nehinonska komponenta. Pretpostavka je da oni služe kao rastvarači za hinone, kao što je to pokazano u slučaju vrste *Metrius contractus* (Escholtz, 1829) iz familije Carabidae, koja prilikom napada raspršuje benzohinone kao alomone, a u sastavu sekreta glavna komponenta je ugljeni hidrat, pentadekan (Eisner et al., 2000). Dokazano je da nepolarne komponente ubrzavaju transport aktivnih polarnih komponenti kroz voskiranu epikutikulu predatora (Mainwald & Eisner, 1995), kao i da kompleksna mešavina pruža veću odbrambenu efikasnost sekretu od pojedinačnih komponenti [kombinacija alkana i alkena je potencijalno efikasnija od dejstva ovih jedinjenja kada bi se pojavljivali pojedinačno (Peschke & Eisner, 1987)]. Međutim, u sekretu većine diplopoda odsustvuju ugljeni hidrati (Wu et al., 2007), kao i slična jedinjenja koja bi služila kao rastvarači za hinone (samo su u sekretu *Rhinocricus padbergi* identifikovani neki ugljeni hidrati velike molekulske težine, ali je najverovatnije da su poreklom iz kutikule; Arab et al., 2003). I pored ovoga, sekret diplopoda ostaje u tačnom stanju usled efekta depresije tačke topljenja kao posledice mešanja benzohinona sa drugim komponentama sekreta

(nehinonskim jedinjenjima) (Attygalle et al., 1993), i na ovaj način postaje efikasniji i potentniji za predatore.

### **5.3. Filogenetski značaj semiohemije odbrambenih supstanci diplopoda**

Klasifikacija na nivou familija i redova kod mnogih grupa artropoda nije bila predmet detaljnih savremenih filogenetskih analiza; takva je upravo situacija kod Diplopoda. Jednu od malobrojnih modernih studija vezanu za filogeniju ove grupe dao je Enghof (1984). On je koristio set morfoloških karaktera u kladističkoj filogeniji gde je ustanovio nekoliko klada: Penicillata, Pentazonia, Helminthomorpha, Colobognatha i Eugnatha. U navedenoj studiji ostalo je problematično filogenetsko tumačenje u okviru eugnatnih diplopoda. Poslednjih godine je urađeno nekoliko filogenetskih analiza koji su se zasnivali na molekularnim karakterima. Međutim ove analize su obuhvatile ograničen broj taksona, kao i ograničen broj molekularnih markera, što je rezultovalo u dodatnoj konfuziji u tumačenju filogenije ovih artropoda (Brewer & Bond, 2013).

Ova teza nije fokusirana na detaljnu filogeniju diplopoda ali nam dobijeni rezultati ukazuju na značaj semiohemije odbrambenih supstanci u filogenetskim interpretacijama. Stoga smatramo da je od interesa navesti činjenice koje imaju potencijalnu filogenetsku aplikativnost. Naime, Brewer i Bond (2013) su analizirali nekoliko diplopodnih taksona koristeći savremene metode molekularne biologije (transkriptomno sekvencioniranje) dobijajući rezultate koji su se razlikovali u odnosu na prethodne filogenetske studije. Po prvi put je ustanovljena grupa filogenetski vezanih taksona koja uključuje Juliformia, Merocheta i Stemmiulida. Navedeni autori su ukazali i na definitivni značaj određenih morfoloških karaktera. Tako su za utvrđivanje pleziomorfnosti kod diplopodnih taksona koristili tri karaktera: gonopode, spinneret i što je nama interesantno i vezano za ovu tezu ozopore (tačnije prisustvo ili odsustvo ozopora). Pored toga, ukazali su i na potencijalni značaj tipa odbrambenih supstanci, posebno kod helmintomornih diplopoda. Definitivno je prihvatljivo da se diplopode dele u dve velike klade Penicillata i Chilognatha. Prva klada uključuje stonoge koje nemaju kalcificiranu kutikulu, poseduju čitav niz specifičnih karaktera, ali ne poseduju hemijsku zaštitu. Druga klada se deli na Pentazonia i Chilognatha. Pentazonia

obuhvataju glomeridne stonoge, gde je jedino kod reda Glomerida prisutna hemijska zaštita. Položaj ozopore i jedinstven zajednički izvodni kanal ozadena odvaja morfološki glomeride od ostalih diplopoda sa hemijskom odbranom. Međutim, odbrambeni sekret sadrži specifične alkaloidne; druge vrste alkaloida su poznate kod polizonidnih stonoga koje spadaju u kladu Colobognatha i koje po Breveru i Bondu (2013) poseduju tubularne odbrambene žlezde. U ovom trenutku ne analiziramo opravdanost takve tvrdnje, ali pitanje prisutva alkaloida kod ove dve grupe ostaje otvoreno. S obzirom da analiza ove teze nije obuhvatila ni jednu od ove dve grupe, smatramo da je jedino opravdano u ovom trenutku istaći činjenicu da je jedino kod glomerida, pored alkaloida, registrovana i proteinska komponenta odbrambenog sekreta.

Klada Helminthomorpha obuhvata 12 redova diplopoda i podeljana je na pomenute Colobognatha i Eugnatha. Svi predstavnici helmintomorfnih diplopoda koji poseduju hemijsku zaštitu, imaju ozopore koje su locirane na bočnim stranama tela i svaka ozadena (par u jednom somitu) ima svoj zasebni izvodni kanal, za razliku od glomeridnih diplopoda koje poseduju jednu zajedničku ozoporu na dorzalnoj strani tela.

Eugnatne diplopode se dele na tri nadreda Merocheta, Nematophora i Juliformia. Sva tri nadreda imaju predstavnike sa hemijskom odbranom. Kod merocheta kao dominantna komponenta odbrambenog sekreta javlja se HCN, ali su registrovane i vrste bez ovog jedinjenja, kod kojih su prisutni kao alomoni krezol, nitroetenilbenzen ili geosmin. Kod nematofora je red Callipodida sa dominantnom krezolskom komponentom u odbrambenom sekretu, ali i sa fenolom u tragovima. Za juliformne stonoge dominantna odbrambena komponenta hemijskog sekreta su različiti tipovi hinona.

U filogenetskom kontekstu rezultati ove teze ukazuju na snažnu hinonsku konzistentnost odbrambenog sekreta analiziranih taksona. Do sada nije registrovan ni jedan juliformni takson bez neke vrste hinona. Pored toga, analize novijeg datuma pokazuju i konstantnost u prisustvu nehinonske komponente, različite po svom sastavu verovatno i na nivou vrsta. Ova studija je pokazala da se tokom ontogenije prvo javljaju nehinonske komponente u znatno većem relativnom procentnom udelu, dok se hinonski arsenal definiše u konačnom obliku tokom kasnijih faza postembriogeneze. Ovako složena semiohemija odbrambenih supstanci je svojstvena jedino juliformnim stonogama i možda predstavlja izvedeno stanje u odnosu na predačke forme. Pored toga,

tokom analiza je kod nekoliko taksona registrovano prisustvo krezola i fenola u tragovima. Kako se može filogenetski tumačiti njihovo prisustvo? Postoje dva objašnjenja. Prva je mogućnost da se radi o homoplaziji kod eugnatnih diplopoda. Druga mogućnost je da prisustvo ovih jedinjenja predstavlja pleziomorfnost koja se zadržala samo kod određenih forama. U ovom trenutku smatramo da je realnija druga mogućnost, s obzirom na činjenicu da su ove hemikalije registrovane kod bazalnih taksona julida, dok analizirane izvedenije forme nisu sadržale iste komponente. Pored toga prisustvo krezolnih jedinjenja kod eugnatnih stonoga podržava ideju o njihovoj filogenetskoj povezanost i mogućnost da dele zajedničkog pretka. Stoga smo mišljenja da je neophodno nastaviti istraživanja u tom pravcu, kao i proširiti na veći broj taksona, posebno eugnatnih diplopoda. Dobijeni rezultati će svakako biti od velike pomoći u rekonstrukciji filogenetskih odnosa eugnata, ali i diplopoda generalno.

## 6. Zaključak

Gasenom hromatografijom i masenom spektrometrijom analiziran je sadržaj odbrambenih vezikula kod 10 juliformnih vrsta diplopoda. Iz familije Julidae analizirane se vrste *U. transsilvanicus*, *P. hungaricus*, *T. nevoi*, *T. serborum*, *S. kresnik*, *S. lucifugus*, *S. deelemani*, kao i različiti postembrionalni stadijumi vrste *C. boleti*. Iz familije Blaniulidae analizirane su vrste *N. kochii* i *C. phlepsii*.

Identifikovano je i okarakterisano ukupno 26 jedinjenja, od toga 23 hinonska derivata: 1,4-benzohinon (**1**), 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2etil-1,4-benzohinon (**6**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), hidrohinon (**8**), 2-etil-3-metoksi-1,4-benzohinon (**10**), 2-metilhidrohinon (**11**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), etil-metil-1,4-benzohinon (**13**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**), 2,3-dimetilhidrohinon (**18**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**), 2-etilhidrohinon (**20**), 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**), 2,3,5,6-tetrametilhidrohinon (**22**), 2,5-dimetoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**23**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (**24**), 2,3-dimetoksi-5,6-dimetilhidrohinon (**25**) i 2-metoksi-1,4-benzohinon (**26**). Hidrohinon (**8**) je prema dosadašnjim literaturnim podacima izolovanim jedino kod predstavnika redova Spirostreptida i Spirobolida.

Pored dominantne hinonske komponente odbrambenih fluida, kod ispitivanih vrsta *U. transsilvanicus*, *S. deelemani* i *T. serborum* identifikovana su i tri jedinjenja koja predstavljaju krezolnu komponentu sekreta: *p*-krezol (**5**), fenol (**3**) i *p*-etilfenol (**9**). Takođe je analizama bila obuhvaćena i nehinonska komponenta sekreta, uglavnom predstavljena heksil- i izopentil-estrima zasićenih i nezasićenih C<sub>14</sub>–C<sub>20</sub> kiselina.

Na osnovu dobijenih rezultata, uočene su relevantne varijacije kako u kvantitativnom, tako i u kvalitativnom sastavu odbrambenog sekreta. Urađena je i komparacija sa dosadašnjim studijama julidnih vrsta stonoga i detaljno su prodiskutovane intraspecijske, interspecijske, intrageneričke, intergeneričke, kao i suprageneričke razlike u sastavu alomona radi utvrđivanja hemotaksonomskih karaktera svakog pojedinačnog taksona.

Kod svih analiziranih vrsta, kako epigejskih, tako i kavernikolnih, registrovani su 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-

metil-1,4-benzohinon (**7**) i 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**) (izuzetak je vrsta *S. deelemanni* kod koje nije identifikovano jedinjenje **4**).

Kod predstavnika reda Julida 2-metil-1,4-benzohinon (**2**) i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**) su široko distribuirana (jedinjenje **2** nije registrovano kod parajulida *U. canadensis* i *O. venustus*, kao ni kod dve vrste roda *Allajulus*, *A. dicentrus* i *A. nitidus*, dok jedinjenje **7** odsustvuje jedino kod parajulide *U. canadensis*). Dva pomenuta hinonska derivata su identifikovana kod svih analiziranih vrsta u okviru ove teze, a ujedno su kod epigejskih vrsta *U. transsilvanicus*, *P. hungaricus* i *C. boleti* predstavljala dominantnu komponentu odbrambenog sekreta. Komparacijom alomonskog sastava tri pomenute epigejske vrste, kao i juliformnih vrsta koje su obuhvaćene ranijim studijama, pokazuje snažnu hinonsku konzistentnost, prevashodno u pogledu dominantnih komponenti sekreta. Takođe hidrohinon (**8**) je izolovan jedino iz sekreta *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus* i ovo je ujedno prva potvrda prisustva ovog hinona kod predstavnika reda Julida. Nalaz hidrohinona kod julidnih stonoga potvrđuje veliku hemijsku konzistentnost hinonskog arsenala u odbrambenom sekretu juliformnih stonoga. Od značaja je istaći da je u našim rezultatima jedino kod *U. transsilvanicus* i *P. hungaricus* potvrđeno prisustvo 1,4-benzohinona (**1**), koji je do sada poznat kao sastavna komponenta odbrambenog arsenala mnogih juliformnih vrsta diplopoda. Od interesa je pomenuti da je 2-metoksi-3-metilhidrohinon (**17**) registrovan jedino kod epigejske vrste *P. hungaricus*. 2-Metoksi-5-metilhidrohinon (**16**) identifikovan je kod jedne vrste iz familije Blaniulidae (*C. phlepsii*), ali i kod vrste *S. kresnik*, kao i kod adultnih stadijuma vrste *C. boleti*. Ovaj hinon do sada nije nađen kod predstavnika redova Spirobolida i Spirostreptida, tako da se za sada može posmatrati kao hemotaksonomski marker julidnih vrsta.

Rezultati hemijskih analiza odbrambenog sekreta kod odabranih predstavnika rodova *Serboiulus* i *Typhloiulus* pokazali su interesantan hemoprofil. Posmatrajući hemotaksonomski aspekt, od značaja je istaći da je kod svih ispitivanih kavernikolnih vrsta dominantna komponenta odbrambenog sekreta bio 2-etil-1,4-benzohinon (**6**), koji je registrovan i kod epigejske vrste *U. transsilvanicus*. Ovo jedinjenje do sada nije registrovano kod blanijulida i parajulida, ali je registrovano kod dve vrste iz familije Julidae, kao i dve spirostreptide i dve spirobolide.

2,3,5,6-Tetrametilhidrohinon (**22**) izolovan je jedino iz odbrambenog sekreta vrste *T. serborum*, a ovo je ujedno i nova komponenta, po prvi put potvrđena u sastavu sekreta kod diplopoda. 2,3-Dimetoksi-5,6-dimetil-1,4-benzohinon (**24**) identifikovan je jedino kod vrste *S. kresnik*.

Kod obe analizirane blanjulidne vrste, *N. kochii* i *C. phlepsii*, uočen je manji sadržaj nehinonske komponente u odnosu na isti kod analiziranih predstavnika porodice Julidae, što ukazuje na mogućnost da je to hemotaksonomski marker ove porodice. Takođe je značajno naglasiti da kod blanjulidnih vrsta nije identifikovana krezolna komponenta sekreta, kao i da je arsenal izolovanih hinonskih derivata bio manji u odnosu na sadržaj hinona kod analiziranih predstavnika porodice Julidae (jedinjenja **1**, **6**, **8**, **10**, **12**, **13**, **17**, **20**, **22**, **24**, **25** i **26** nisu identifikovana).

Ontogenetska karakterizacija odbrambenog sekreta vrste *C. boleti* pokazala je da kod prvog analiziranog stadijuma (III) postoje samo tri hinonska jedinjenja: 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2-metoksi-3-metil-hidrohinon (**17**), sa preovlađujućom frakcijom 2-metil-3,4-metilendioksifenola (**15**) (58,7%). Već od stadijuma VII dolazi do sintetisanja gotovo većine hinona karakterističnih za adultne julide, dok je kod analiziranih stadijuma VIII, IX, X i XI identifikovan identičan arsenal hinonskih derivata: 2-metil-1,4-benzohinon (**2**), 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**), 2,3-dimetoksihidrohinon (**12**), 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**14**), 2-metil-3,4-metilendioksifenol (**15**), 2-metoksi-5-metilhidrohinon (**16**), 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon (**19**) i 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon (**21**). Dominantnu frakciju odbrambenog sekreta od stadijuma IV činilo je jedinjenje 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**7**).

U okviru nehinonske komponente odbrambenog sekreta kod pojedinih analiziranih julida u našim rezultatima registrovano je prisustvo *p*-krezola, fenola i *p*-etilfenola, kao i heksil-estara zasićenih i nezasićenih C<sub>14</sub>–C<sub>20</sub> kiselina. Fenol (**3**) je identifikovan jedino kod vrste *U. transsilvanicus*, ali je ovo ujedno i prva identifikacija ovog jedinjenja kod svih julida. Jedinjenje *p*-krezol (**5**) je bilo zastupljeno kod vrste *U. transsilvanicus*, kao i kod kavernikolnih vrsta *S. deelemani* i *T. serborum*, dok je treća krezolna komponenta sekreta *p*-etilfenol (**9**) identifikovana kod vrsta *S. deelemani* i *T. serborum*. Svakako je značajno pomenuti da je kod vrste *U. transsilvanicus* u okviru



nehinonske komponente po prvi put identifikovan izopentil-heksa-kozetetranoat, i izopentil-estri zasićenih i nezasićenih masnih kiselina C<sub>14</sub> - C<sub>20</sub>.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da predstavnici reda Julida pripadaju „hinonskoj kladi“ diplopoda. Evidentna je hinonska konzistentnost juliformnih diplopoda u pogledu sastava odbrambenog sekreta, odnosno postoji određena homogenost u sastavu odbrambenog sekreta, prevashodno među dominantim hinonskim komponentama. Međutim, ni jedno hinonsko jedinjenje koje je do sada registrovano u odbrambenom sekretu nije univerzalno prisustvo u svakom analiziranom juliformnom taksonu (Julida, Spirobolida i Spirostreptida). Svaka od analiziranih vrsta u ovoj tezi pokazala je svoj specifičan hinonski hemoprofil koji ni jednom slučaju nije bio identičan, pri čemu su minorne hinonske komponente odbrambenog sekreta određivale specijske i generičke razlike. Svakako, uzimajući u obzir veliku homogenost identifikovanih hinonskih derivata u alomonskom sastavu, pretpostavljamo da bi nehinonska komponenta odbrambenog sekreta mogla poslužiti kao potencijalni hemotaksonomski marker, uzevši u obzir i veliku raznovrsnost do sada izolovanih nehinonskih jedinjenja, kao i njihove kvantitativne razlike u sastavu sekreta.

## 7. Literatura

1. ALDRICH, J. R., 1988. Chemical ecology of the Heteroptera. – *Annual Review of Entomology* **33**: 211-238.
2. ARAB, A., G. G. ZACARIN, C. S. FONTANETTI, M. I. CAMARGO-MATHIAS, M. G. DOS SANTOS, A. C. CABRERA, 2003. Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). – *Entomotropica* **18**: 79-82.
3. ANTIĆ, D. Ž., B. P. M. ĆURČIĆ, V. T. TOMIĆ, S. B. ĆURČIĆ, D. Z. STOJANOVIĆ, B. D. DUDIĆ i S. E. MAKAROV, 2013. One hundred millipede species in Serbia (Arthropoda: Myriapoda: Diplopoda). – *Archives of Biological Science, Belgrade* **65** (4): 1559-1578.
4. ATTYGALLE, A. B., S. C. YU, J. MEINWALD AND T. EISNER, 1993. Defensive secretion of the millipede *Floridobolus penneri*. – *Journal of Natural Products* **56**: 1700-1706.
5. BAKER, G. H., 1985. Predators of *Ommatoiulus moreleti* (Lucas) (Diplopoda: Julidae) in Portugal and Australia. – *Journal of Australian Entomological Society* **24**: 247-252.
6. BEARD, R. L., 1963. Insect toxins and venoms. – *Annual Review of Entomology* **8**:1-18.
7. BÉHAL, A. AND M. C. PHISALIX, 1900. La quinone, principe actif du vėnin du *Julus terrestris*. – *Comptes Rendus de la Sociėtė de Biologie, Paris* **52**: 1036-1038.
8. BLOWER, J. G., 1969. Age-structures of millipede population in relation to activity and dispersion. – *Systematics Association Publications* **8**: 209-216.
9. BLOWER, J. G. and P. D. Gabbutt, 1964. Studies on the millipede of a Devon oak wood. – *Proceedings of the Zoological Society of London*, **143**: 143-176.
10. BLOWER, J. G., 1985. *Millipedes*. The Linnean Society of London, 241, The Estuarine and Brackish-Water Sciences Association, London-Leiden-Koln, Copenhagen.
11. BLUM, M. S., 1981. *Chemical Defenses of Arthropods*. Academic Press, New York, 562.
12. BLUM, M. S., T. H. JONES, D.W. PHILLIPS AND D. F. HOWARD, 1982. Anthraquinones and anthrones: Occurrence and defensive function in a Chrysomelid Beetle. *Naturwissenschaften* **69** (2): 91-92.

13. BLUM, M. S. AND J. P. WOODRING, 1962. Secretion of benylaldehyde and hydrogen cyanide by the millipede *Pachydesmus crassicutis* (Wood). *Science* **138**: 512-513.
14. BLUM, M. S. AND A. SANNASI, 1974. Reflex bleeding in the lampyrid *Photinus pyralis*: defensive function. – *Journal of Insect Physiology* **20**: 451-460.
15. BODNER, M. AND G. RASPOTNIG, 2012. Millipedes that smell like bugs: (*E*)-alkenal in the defensive secretion of the julid diplopod *Allajulus dicentrus*. – *Journal of Chemical Ecology* **38**: 547-556.
16. BREWER, S. M., AND J. E. BOND, 2013. Ordinal-Level Phylogenomic of the Arthropod Class Diplopoda (Millipedes) based on an analysis of 221 nuclear protein-coding loci generated using next-generation sequence analysis. *Plos one* **8** (11): 1-14.
17. BROCKMANN, A., D. DIETZ, J. SPAETHE AND J. TAUTZ, 2006. Beyond 9-ODA: Sex pheromone communication in the European honey bee *Apis mellifera* L. – *Journal of Chemical Ecology* **32**: 657-659.
18. BROWN, K. S., M. J. LACEY AND B. P. MOORE, 1988. Dihydromatricariate-based triglycerides, glyceride ethers, and waxes in the Australian soldier beetle, *Chauliognathus lugubris* (Coleoptera, Cantharidae). – *Journal of Chemical Ecology* **14**: 411-423.
19. CARAYON, J., 1971. Notes et documents sur l' appareil odorant metathoraciques des Hemipters. – *Annual Society of Entomology France* **7**: 737-770.
20. CARNEVALI, M. D. C. AND R. VALAVASSORI, 1982. Active supercontraction in rolling-up muscles of *Glomeris marginata* (Myriapoda, Diplopoda). – *Journal of Morphology* **172**: 75-82.
21. CARREL, J. E. 1990. Chemical defense in the pill millipede *Glomeris marginata*. – *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress of Myriapodology*, (ed. A. Minelli), 157-164. E. J. Brill, Leiden.
22. CAUSEY, N. B., 1943. Studies on the life history and the ecology of the hothouse millipede, *Orthomorpha gracilis* (C.L. Koch, 1847). – *American Midland Naturalist* **29**: 670-682.
23. CEDRIC, G., 2005. Entomology, third edition. Springer, The Netherlands.
24. ĆURČIĆ, B. P. M., S. E. MAKAROV, V. V. TEŠEVIĆ, M. B. JADRANIN AND Lj. B. VUJISIĆ, 2009. Identification of Secretary Compounds from the European

- Callipodidan Species *Apfelbeckia insculpta*. – *Journal of Chemical Ecology* **35**: 893–895.
25. DALOZE, D., J. M. PASTEELS AND M. ROWELL-RAHIER, 1986. Chemical defense in chrysomelid eggs and neonate larvae. – *Physiological entomology* **11**: 29-37.
  26. DE JONG, M. C. J. M. AND K. BLEUMINK, 1977. Investigative studies of the dermatitis caused by the larva of the brown tail moth, *Euproctischrysorrhoea* L. (Lepidoptera, Lymantridae). IV Further characterization of skin reactive substances. – *Archives of Dermatological Research* **259**:263-281.
  27. DE ROSA, S., A. GIULIO AND C. IODICE, 1994. Biological effects of prenylated hydroquinones: Structure activity relationship studies in antimicrobial, brine shrimp, and fish lethality assays. – *Journal of Natural Products* **57**: 1711-1716.
  28. DELIGNE, J., A. OUENNEDEY AND M.S. BLUM, 1982. The enemies and defense mechanism of termites. In *Social Insects*, H.R. Hermann, ed., 2:1-67. Academic. New York. 491 pp.
  29. DELIGNE, J., A. QUENNEDEY AND M. S. BLUM, 1982. The enemies and defensive mechanisms of termites. – *Social Insects* **2**: 1-76., Academic Press, New York.
  30. DETTNER, K., 1987. Chemosystematics and evolution of beetle chemical defenses. – *Annual Review of Entomology* **32**:17-48.
  31. DUFFEY, S. S., 1974. The biosynthesis of defensive chemicals by millipedes: Parallelism with plant biosynthetic pathways. – PhD Thesis, The University of British Columbia: 1-245.
  32. DUFFEY, S. S., 1977. Arthropod allomones: chemical effronteries and antagonists. – *Proc. XV Int. Congr. Entomol.*: 323-394. Entomological Society of America, College Park. Md. 824 Pp.
  33. EDWARDS, J. S., 1962. *Proceedings of International Congress of Entomology*, 11<sup>th</sup>, **3**: 259.
  34. EISNER T., M. DEYRUP, R. JACOBS AND J. MEINWALD, 1986. Necrodols: Anti-insectan terpens from defensive secretion of carrion beetle (*Necrodes surinamensis*) – *Journal of Chemical Ecology* **12**: 1407-1415.
  35. EISNER, O., D. ALSOP, K. HICKS AND J. MEINWALD, 1978. Defensive secretions of millipedes. – Pp. 41-72 in S. BETTINI (ed.) *Arthropod venoms (Handbook of experimental pharmacology volume 48)* – Springer-Verlag, Heidelberg–Berlin.

36. EISNER, T. AND J. MEINWALD, 1982. Defensive spray mechanism of a silphid beetle (*Necrodes surinamensis*). – *Psyche* **89**: 357-368.
37. EISNER, T., 1958. The protective role of the spray mechanism of the bombardier beetle, *Brachynus ballistarius*. – *Journal of Insect Physiology* **2**: 215-220.
38. EISNER, T. 1970. Chemical defense against predator in arthropods. In *Chemical Ecology* (ed. E. Sondheimer and J.B. Simeone), **157-217**. New York: Academic Press.
39. EISNER, T. AND J. MEINWALD, 1966. Defensive secretions of arthropods. – *Science* **153**:1341-1350.
40. EISNER, T. AND J. MEINWALD, 1995. *Chemical ecology- The Chemistry of Biotic Interactions*, National Academy Press, Washington, D.C.
41. EISNER, T. AND J. A. DAVIS, 1967. Mongoose throwing and smashing millipedes. – *Science* **155**: 577-579.
42. EISNER, T. AND H. E. EISNER, 1965. Mystery of a millipede. – *Natural History* **74**:30-37.
43. EISNER, T., J. J. HURST AND J. MEINWALD, 1963a. Defense mechanisms of arthropods. XI. The structure, function and phenolic secretions of the glands of chordeumoid millipede and a carabid beetle. – *Psyche* **70**: 94–116.
44. EISNER, T., H. E. EISNER, J. J. HURST, F. C. KAFATOS AND J. MEINWALD, 1963b. Cyanogenic glandular apparatus of a millipede. – *Science* **139**: 1218-1220.
45. EISNER, T., M. EISNER AND M. DEYRUP, 1996. Millipede defense: Use of detachable bristles to entangle ants. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 10848-10851.
46. EISNER, T., M. EISNER AND M. SEIGLER, 2005. *Secret weapons: Defenses of Insects, Spiders, Scorpions, and Other Many-legged Creatures*, Harvard University Press.
47. EISNER, T., M. EISNER, A. B. ATTYGALLE, M. DEYRUPS AND J. MEINWALD, 1998. Rendering the inedible: Circumvention of a millipedes chemical defense by a predaceous beetle larva (*Phengodidae*). – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1108-1113.
48. EISNER, T., E. VAN TASSELL AND J. E. CARREL, 1967. Defensive use of a 'fecal shield' by a beetle larva. – *Science* **158**: 1471.

49. EISNER, T., D. J. ANESHANSLEY, M. EISNER; A. B. ATTYGALLE, D. W. ALSOP AND J. MEINWALD, 2000. Spray mechanism of the most primitive bombardier beetle (*Metius contractus*). – *The Journal of Experimental Biology* **203**: 1265-1275.
50. ENGHOFF, H. AND R. M. SHELLEY ,1979. A revision of the millipede genus *Nopoiulus* (Diplopoda, Julida: Blaniulidae). – *Entomologica Scandinavica*, **10**: 65-72.
51. ENGHOFF, H. ,1984. A revision of the Nopoiulini, with notes on the classification of blaniulid millipedes (Diplopoda: Julida: Blaniulidae). – *Senckenberg. boil.* **64**: 393-427.
52. ENGHOFF, H. 1984. Phylogeny of millipedes – a cladistic analysis. *Zoologische Systematik Evolutionsforschung*, **22**: 8-27.
53. ENGHOFF, H. AND R. D. KIME (ed.): ,2005. *Fauna Europaea. Myriapoda*. Fauna Europaea, version 1.2, available from <http://www.faunaeur.org>
54. ENGHOFF, H., 2011. Trans-segmental serial colour patterns in millipedes and their developmental interpretation (Diplopoda). – *International Journal of Myriapodology* **6**: 1-27.
55. ENGHOFF, H., W. I. DOHLE AND J. G. BLOWER, 1993. Anamorphosis in millipedes (Diplopoda)- the present state of knowledge with some development and phylogenetic considerations. – *Zoological Journal of the Linnean Society* **109**: 103-234.
56. FILSHIE, B. K. AND D. F. WATERHOUSE, 1968. The fine structure of the lateral scent glands of the green vegetable bug, *Nazara viridula* (Hemiptera, Pentatomidae) – *Journal. Microscopie* **7**: 231-244.
57. FRAZER, J. F. D., 1965. Butterflies of chalk grassland: A conservation problem. – Proceedings of 12<sup>th</sup> International Congress of Entomology, London 8-16 July 1964 (P. Freeman, ed.), p. 355. London.
58. GOLOVATCH, S. I., 2009. Millipedes (Diplopoda) in extreme environments. – Festschrift towards the 75th Anniversary and a Laudatio in Honour of Academician Yuri Ivanovich Chernov, 87-112.
59. ГОЛОВАЧ, С. И., Н. ENGHOFF, 1990. Кивсяк *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) на Кавказе (Diplopoda, Julida, Blaniulidae). (ед. Стриганова, Б. Р.): *Фауна наземных беспозвоночных Кавказа, Академия Наук СССР, Сборник научных трудов*: 114-118.
60. GOMEZ, D. R: S., D. G: BOUCIAS AND J. L. NATION, 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* Cuticle and

- Fungistatic Effects of Cuticular Lipids and Aldehydes. – *Journal of Invertebrate Pathology* **69**: 31-39.
61. HERMANN, H. R., 1984. Defensive Mechanisms in Social Insects. Praeger Publishers, New York, 259.
  62. HOFFMAN, R.L., 1979. *Classification of the Diplopoda*. Muséum d'Histoire Naturelle, Genève.
  63. HOLMBERG, R. G., 1970. The Odiferous Glands of some Palpatores Phalangida (Opiliones) (Arachnida). M. Sc. Thesis, Saskatoon, University of Saskatchewan (Canada), p. 134.
  64. HOPKIN, S.P. AND H. J. READ, 1992. – The Biology of Millipedes. Oxford University Press. Oxford.
  65. HOWARD, D. F., M. S. BLUM, T. H. JONES AND M. D. TOMALSKI, 1982. Behavioral responses to an alkylpyrazine from the mandibular gland of the ant *Wasmannia auropunctata*. – *Insectes Sociaux*, Paris **29**: 369-374.
  66. HOWSE, P. E., 1984. Sociochemicals of termites. – *Chemical Ecology of Insects* : 475-519 (W. J. Bell and R. T. Carde, eds.) Sinaure Assoc. Sunderland, Massachusetts.
  67. HUTH, A., 2000. Defensive secretions of millipedes: More than just a product of melting point decrease? – *Fragmenta Faunistica* **43**:191-200.
  68. JONES, T. H., W. E. CONNER, A. F. KLUGE, T. EISNER AND J. MEINWALD, 1976. Defensive substances of opilionids. – *Experientia* **32**: 1234-1235.
  69. KAWAMOTO, F. AND N. KUMADA, 1984. Biology and venoms of Lepidoptera. – Handbook of Natural Toxins. (A. T. Tued. Marcel Dekker Inc., New York): 291-330.
  70. KLUGE, A. F. AND T. EISNER, 1971. Defense mechanisms of arthropods. XXVIII. A quinone and a phenol in the defensive secretion of a parajulid millipede. – *Annals of the Entomological Society of America* **64**: 314-315.
  71. KUDO, S. I., Y. AKAGI, S. HIRAOKA, T. TANABE AND G. MORIMOTO, 2011. Exclusive male egg care and determinants of brooding success in a millipede. – *Ethology* **117**: 19-27.
  72. MACHADO, G., V. BONATO AND P. S. Oliveira, 2002. Alarm communication: A new function for the scent gland secretion in harvestmen (Arachnida: Opiliones).- *Naturwissenschaften* **89**: 357-360.

73. MACHADO, G., P. C. CARRERA, A. M. POMINI AND A. J. MARSAIOLI, 2005. Chemical defense in harvestmen (arachnida, opiliones): do benzoquinones secretions deter invertebrate and vertebrate predators? – *Journal of Chemical Ecology* **11**: 2519-2539.
74. MAKAROV, S. E., B. M. MITIĆ, V. T. TOMIĆ AND B. D. DUDIĆ, 2005. Revision of the genus *Serboiulus* Strasser, 1962 (Diplopoda, Julidae). – *Archives of Biological Science* **57** (1): 47-52.
75. MAKAROV S. E. AND V. T. TOMIĆ, 2011. First Finding of *Nopoiulus kochii* (Diplopoda, Julida, Blaniulidae) in Serbia. – *Kragujevac Journal of Science* **33**:73-76.
76. MAKAROV, S. E., B. P. M. ĆURČIĆ, V. T. TOMIĆ AND A. LEGAKIS, 2004. The diplopods of Serbia, Montenegro, and the Republic of Macedonia. Institute of Zoology, Faculty of Biology, University of Belgrade, Hellenic Zoological Society, Committee for Karst and Speleology, Serbian Academy of Science and Arts. Monographs, **9**:1-440.
77. MAKAROV, S. E., B. P. M. ĆURČIĆ, LJ. V. VUJISIĆ, M. B. JADRANIN, V. V. TEŠEVIĆ, I. M. VUČKOVIĆ, T. LJ. SEKULIĆ, S. B. ĆURČIĆ AND B. M. MITIĆ, 2011. Defensive secretions in *Callipodella fasciata* (Latzel, 1882) (Diplopoda, Callipodida, Schizopetalidae). – *Chemistry and Biodiversity* **8**: 1284-1289.
78. MAKAROV, S. E., B. P. M. ĆURČIĆ, V. V. TEŠEVIĆ, M. B. JADRANIN, LJ. V. VUJISIĆ, S. B. ĆURČIĆ, B. M. MANDIĆ, T. LJ. SEKULIĆ AND B. M. MITIĆ, 2010. Defensive secretions in three species of polydesmids (Diplopoda, Polydesmida, Polydesmidae). – *Journal of Chemical Ecology* **36**:978-982.
79. MAURIÈS, J. P., S. I. GOLOVATCH AND P. STOEVIĆ, 1997. The millipedes of Albania: recent data, new taxa; systematical, nomenclatural and faunistical review (Myriapoda, Diplopoda). – *Zoosystema* **19**: 255-292.
80. MEINWALD, J., J. SMOLANOFF, A. T. MCPHAIL, R.W. MILLER, T. EISNER AND K. HICKS. – *Tetrahedron Letteres* 1975, 2367.
81. MEINWALD, Y. C., J. MEINWALD AND O. EISNER, 1966. 1, 2-Dialkyl-4(3H)-quinazolinones in the defensive secretion of a millipede (*Glomeris marginata*). – *Science* **154**: 390-391.
82. MILLER, R. W. AND A. T. MCPHAIL, 1978. Structure and revised absolute stereochemistry for nitorpolyzonamine, 2', 2'- dimethyl-6-nitor Spiro-(1-azabicyclo (3.3.0) octane-4, 1'- cyclopentane), a novel spirocyclic nitor compound from the



- defensive glands of the millipede *Polyzonium rosalbum*: x-ray analysis of nitorpolyzinammonium perchlorate. – *Journal of Chemical Research*. (S) **76**.
83. MOORE, B. P., 1969. Biochemical studies in termites. – *Biology of Termites* **1**: 407-432. (K. Krishna and F. M. Weesner, eds.). Academic Press: New York.
  84. MOORE, B. P., 1968. Studies on the chemical composition and function of the cephalic gland secretion in Australian termites. – *Journal of Insect Physiology* **14**: 33-39.
  85. MORROW, P. A., T. E. BELLAS AND T. EISNER, 1976. – *Oecologia* **24**: 193.
  86. NOIROT, C., 1969. Glands and Secretions. – *Biology of termites* **1**: 89-123.
  87. NOVAK, F., V. PELISSOU AND M. LAMY, 1987. Comparative morphological, anatomical and biochemical studies of the urticating apparatus and urticating hairs of some Lepidoptera: *Thaumetopoea pityocampa* Schiff., Th. Processionea L. (Lepidoptera, Thaumetopoeidae) and *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera, Saturniidae). – *Comparative Biochemical Physiology* **88**: 141-146.
  88. PAVAN, M., 1968. Defensive secretions of Arthropoda. – European Research Office, United States Army, U. S. Clearinghouse for Federal Scientific and Technical Information.
  89. PESCHKE, K. AND T. EISNER, 1987. Defensive secretion of a beetle (*Blaps mucronata*): physical and chemical determinants of effectiveness. – *Journal of Comparative Physiology* **161**: 377-388.
  90. POST, D. C., H. A. DOWNING AND R. L. JEANNE, 1984. Alarm response to venom by social wasps *Polistes exclamans* and *P. fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). – *Journal of Chemical Ecology* **10**: 1425-1433.
  91. PRESTWICH, G. D., 1975. In: *Pheromones and Defensive Secretions in Social Insects* (C. Noirot, P. E. Howse, i G. Le Masne, eds.), 149-152., Univ. Dijon Press.
  92. PRESTWICH, G. D., 1979. Chemical defense by termite soldiers. – *Journal of Chemical Ecology* **5**:459-480.
  93. PRESTWICH, G. D., 1984. Defense mechanisms in termites, – *Annual Review of Entomology* **29**: 201-232.
  94. QUENNEDEY, A., 1984. Morphology and ultrastructure of termite defensive glands – *Defensive mechanisms in Social insects* **259**: 151-200, New York, Praeger Scientific.
  95. RADOVIĆ I. AND B. PETROV, 2003. Raznovrsnost života I: struktura i funkcija, Biološki Fakultet, Beograd.

96. RASPOTNIG, G., 2012. Scent gland chemistry and chemosystematics in harvestmen. – *Biologia Serbica* **34**: 5-18.
97. RASPOTNIG, G., J. SCHWAB AND I. KARAMAN, 2012. High conservatism in the composition of the scent gland secretions in the Cyphophthalmi: evidence from Pettalidae (Arachnida, Opiliones). – *Journal of Chemical Ecology* **38**:437-440.
98. REMOLD, H., 1962. Über die biologische Bedeutung der Duftdrüsen bei den Landwanzen (Geocorisae). – *Z. Vergl. Physiol.* **45**: 636-694.
99. REMOLD, H., 1963 Scent glands of land-bugs, their physiology and biological function. – *Nature* **198**: 764-768.
100. REMY, P., 1950. On the enemies of Myriapods. – *Naturalist*: 103-108.
101. ROCHA, D. F. O., F. C. WOUTERS, D. S. ZAMPIERI, T. J. BROCKSOM, G. MACHADO AND A. J. MARSAIOLI, 2013. Harvestmen Phenols and Benzoquinones: Characterisation and Biosynthetic Pathway. – *Molecules* **18**: 11429-11451.
102. RÖPER, H. AND K. HEYNS, 1977. Spurenanalytik von p-Benzochinon- und Hydrochinon-Derivaten mit Gaschromatographie und Gaschromatographie/Massenspektrometrie. Identifizierung von Wehrsekret-Komponenten Europäischer Juliden. – *Zeitschrift für Naturforschung C* **32**:61-66.
103. RONCADORI R. W., S. S. DUFFEY AND M. S. BLUM, 1985. Antifungal activity of defensive secretions of certain millipedes. – *Mycologia* **77**(2): 185-191.
104. ROTHSCHILD, M., 1985. British aposematic Lepidoptera. – *The Moths and Butterflies of Great Britain and Ireland* **2**: 9-62. Harley Books, Colchester.
105. SANDS, W. A., 1982. Agonistic behavior of African soldiersless Apicotermitinae (Isoptera: Termitidae) – *Sociobiology* **7**: 61-72.
106. SAUDRAY, Y., 1953. Developpement post-embryonnaire d'un Iulide indigene *Cylindroiulus (Aneuloboiulus) silvarum* Meinert. – *Archives de Zoologie Experimentale et Generale* **89**: 1-14.
107. SCHAIDER, M. AND G. RASPOTNIG, 2009. Unusual organization of scent glands in *Trogulus tricarinatus* (Opiliones, Trogulidae): Evidence for a non-defensive role. – *Journal of Arachnology* **37**: 78-83.
108. SCHILDKNECHT, H. AND K. H. WEIS, 1961. Chinone als aktives Prinzip der Abwehrstoffe von Diplopoden. – *Zeitschrift für Naturforschung C* **16**: 810-816.

109. SCHILDKNECHT, H. AND W. KORNIG, 1968. Protective Materials in the Secretion from the Prothoracic Protective Gland of a Mexican Cybister Species. – *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **7**: 62-63.
110. SCHMITT, T., F. T. KRELL AND K. E. LINSENMAIR, 2004. Quinone mixture as attractant for necrophagous dung beetles specialized on dead millipedes. – *Journal of Chemical Ecology* **30**: 731-740.
111. SHIMIZU, N., Y. KUWAHARA, R. YAKUMARU AND T. TANABE, 2012. *n*-Hexyl laurate and fourteen related fatty acid esters: new secretory compounds from the julid millipede, *Anaulaciulus* sp. – *Journal of Chemical Ecology* **38**: 23-28.
112. SHEAR, W. A., T. H. JONES AND T. WESENER, 2011. Glomerin and homoglomerin from the the North American pill millipede *Onomeris sinuate* (Loomis, 1943) (Diplopoda, Pentazonia, Glomeridae). – *International Journal of Myriapodology* **4**: 1–10.
113. SHEAR, W. A., T. H. JONES AND H. M. MIRAS, 2007. A possible phylogenetic signal in milliped chemical defenses: The polydesmidan milliped *Leonardemus injucundus* Shelley & Shear secretes *p*-cresol and lacks a cyanogenic defense (Diplopoda, Polydesmida, Nearctodesmidae). – *Biochemical Systematics and Ecology* **35**: 838-842.
114. SHIMIZU, N., Y. KUWAHARA, R. YAKUMARU AND T. TANABE, 2012. *n*-Hexyl laurate and fourteen related fatty acid esters: new secretory compounds from the julid millipede, *Anaulaciulus* sp. – *Journal of Chemical Ecology* **38**: 23-28.
115. STADDON, B.W., 1979. The scent glands of heteroptera. – *Advances in Insects Physiology* **14**: 351-418.
116. STRASSER, K., 1962. Die Typhloiulini (Diplopoda Symphylognatha). – *Atti dei Museo Civico di Storia Naturale* **23**: 1-77.
117. SEKULIĆ, T. Lj., D. Ž. ANTIĆ, V. T. TOMIĆ, S. B. ĆURČIĆ, D. Z. STOJANOVIĆ, B. M. MITIĆ, S. E. MAKAROV AND B. P. M. ĆURČIĆ, 2013. The Review of the genus *Serboiulus* Strasser, 1962 (Diplopoda: Julida: Julidae), with description of A new species from Serbia. – *Archives of Biological Science, Belgrade*, **65** (2):739-744.
118. TERRILL, W. F. AND D. B. DUSENBERY, 1996. Threshold chemosensitivity and hypothetical chemoreceptor function of the nematode *Caenorhabditis elegans*. – *Journal of Chemical Ecology* **22**: 1463-1475.

119. TRAVE, R., L. GARANTIL AND M. PAVAN, 1959. Ricerche sulla natura chimica del veleno del miriapode *Archiulus (Schizophyllum) sabulosum* L. – *Industria Chimica* **41**: 19-29.
120. TSCHINKEL, W. R., 1969. Phenols and quinones from the defensive secretions of the tenebrionid beetle, *Zophobas rugipes*. – *Journal of Insect Physiology* **15**: 191-200.
121. TSCHINKEL, W. R., 1975. A comparative study of the chemical defensive system of tenebrionid beetles: chemistry of the secretions. – *Journal of Insect Physiology* **21**: 753-783.
122. VACHON, M., 1947. Contribution a l' etude de developpment post-embryonnaire de *Pachybolus ligulatus* Voges: Les etapes de la croissance. – *Annales des Sciences Naturelles Zoologie* (11) **9**: 109-121.
123. VUJISIĆ, LJ., 2013. Identifikacija odbrambenih supstancii odabranih vrsta stonoga iz klase Diplopoda i Chilopoda (Arthropoda, Myriapoda). – Doktorska disertacija, Hemijski Fakultet, Univerzitet u Beogradu.
124. VUJISIĆ, LJ. V., S. E. MAKAROV, B. P. M. ĆURČIĆ, B. S. ILIĆ, V. V. TEŠEVIĆ, D. M. GOĐEVAC, I. M. VUČKOVIĆ, S. B. ĆURČIĆ AND B. MITIĆ, 2011. Composition of the defensive secretion in three species of European millipedes. – *Journal of Chemical Ecology* **37**: 1358-1364.
125. WEATHERSON, J. AND J. E. PERCY, 1978. – Handbook of Experimental Pharmacology. **48**: 511-554.
126. WEATHERSON, J., J. E. PERCY, L. M. MACDONALD AND J. A. MACDONALD, 1979. Morphology of the prothoracic defensive gland of *Schizura concinna* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Notodontidae) and the nature of its secretion. – *Journal of Chemical Ecology* **5**: 165.
127. WEATHERSTON, J. AND J. E. PERCY, 1969. Studies of physiologically active arthropod secretions. III. Chemical, morphological, and histological studies of the defence mechanism of *Uroblaniulus canadensis* (Say) (Diplopoda: Julida). – *Canadian Journal of Zoology* **47**: 1389-1394.
128. WEATHERSTON, J., D. TYRRELL AND J. E. PERCY, 1971. Long chain alcohol acetates in the defensive secretion of the millipede *Blaniulus guttulatus*. – *Chemical Physics Letters* **7**: 98-100.

129. WHEELER, J. M., J. MEINWALD, J. J. HURST AND T. EISNER, 1964. Trans 2-dodecenal and 2-methyl-1,4 quinone produced by millipedes. – *Science* **144**: 540-541.
130. WOOD, W. F., J. SHEPHERD, B. CHONG AND J. MEINWALD, 1975. – Ubiquinone-O in defensive spray of African millipede. – *Nature* **253**: 625– 626.
131. WOOD, W. F., F. J. HANKE, I. KUBI, J. A. CARROLL AND P. CREWS, 2000. Buzonamine, a new alkaloid from the defensive secretion of the millipede, *Buzonium crassipes*. – *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 305-312.
132. WU, X., D. W. BUDEN AND A. ATTYGALLE, 2007. Hydroquinones from defensive secretion of a giant Pacific millipede, *Acladocricus setigerus* (Diplopoda: Spirobolida). – *Chemoecology* **17**: 131-138.
133. ГОЛОВАЧ, С.И. і Х. ЕНГХОФФ, 1990. Кивсяк *Noroilus kochii* (Gervais, 1847) на Кавказе (Diplopoda, Julida, Vlaniulidae). (ед. Стриганова, Б. Р.): *Фауна наземных беспозвоночных Кавказа, Академия Наук СССР, Сборник научных трудов*: **114-118**.

## **BIOGRAFIJA:**

Tatjana Lj. Sekulić rođena je 04.05.1984. godine u Smederevu. Prirodno-matematički smer Smederevske Gimnazije završila je 2003. godine i iste godine upisala Biološki Fakultet Univerziteta u Beogradu. Na studijskoj grupi ekologija i zaštita životne sredine diplomirala je 2009. godine i stekla zvanje diplomirani biolog zaštite životne sredine- master. Na Katedri za dinamiku razvića životinja Biološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu nastavlja doktorske studije. Od oktobra 2008. godine zaposlena je u Visokoj tehničkoj školi strukovnih studija u Požarevcu na radnom mestu asistenta. Vežbe održava na studijskoj grupi zaštita životne sredine.

## **BIBLIOGRAFIJA:**

### B1. Radovi u časopisima međunarodnog značaja

1. Makarov, S. E., B. P. M. Ćurčić, V. V. Tešević, M. B. Jadranin, Lj. V. Vujisić, S. B. Ćurčić, B. M. Mandić, **T. Lj. Sekulić**, B. M. Mitić. 2010. Defensive Secretions in Three Species of Polydesmids (Diplopoda, Polydesmida, Polydesmidae). *J. Chem. Ecol.*, **36**: 978-982.
2. Makarov, S. E., B. P. M. Ćurčić, V. V. Tešević, M. B. Jadranin, Lj. V. Vujisić, I. M. Vučković, S. B. Ćurčić, **T. Lj. Sekulić**, B. M. Mitić. 2011. Defensive Secretions in *Callipodella fasciata* (Latzel, 1882) (Diplopoda, Callipodida, Schizopetalidae). *Chemistry & Biodiversity*, **8** (7): 1284- 1289.
3. **Tatjana Lj. Sekulić**<sup>1</sup>, D. Ž. Antić<sup>1</sup>, V. T. Tomić<sup>1</sup>, S. B. Ćurčić<sup>1</sup>, D. Z. Stojanović<sup>2</sup>, B. M. Mitić<sup>1</sup>, S. E. Makarov<sup>1</sup> i B. P. M. Ćurčić<sup>1</sup>, 2013. The review of the genus *Serboiulus* Strasser, 1962 (Diplopoda: Julida: Julidae), with description of a new species from Serbia. *Archives of Biological Science*, Belgrade, **65** (2), 739-744.
4. **Tatjana Lj. Sekulić**<sup>1</sup>, Lj. V. Vujisić<sup>2</sup>, B. P. M. Ćurčić<sup>1</sup>, B. M. Mandić<sup>2</sup>, D. Ž. Antić<sup>1</sup>, Snežana S. Trifunović<sup>2</sup>, D. M. Gođevac<sup>3</sup>, Vlatka E. Vajs<sup>3</sup>, V. T. Tomić<sup>1</sup> i S. E. Makarov<sup>1</sup>. 2013. Quinones and non-quinones from the defensive secretion of a *Unciger transsilvanicus* (Verhoeff, 1899) (Diplopoda, Julida, Julidae), from Serbia.

Б2. Radovi u časopisima domaćeg značaja

1. Секулић, Љ., Д. Миловановић, В. Николић, Т. Секулић. 2008. Водоснабдевање и квалитет отпадних вода U.S. Stell Serbia. Вода и санитарна техника, 6/2008, Удружење за технологију воде и санитарно инжењерство - Београд.
2. Секулић, Т. Љ. 2010. Диверзитет фауне класе диплопода (Arthropoda, Myriapoda) у Србији. Зборник радова ВТШСС Пожаревац.

Б4. Kongresna saopštenja na skupovima domaćeg značaja

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M 64):

1. Ćurčić, B. P. M., Sekulić, T., Mitić, B. M., Makarov, S. E. 2009. Diverzitet faune hilopoda i diplopoda (Arthropoda, Myriapoda) u Srbiji. Simpozijum entomologa Srbije, Soko Banja, 23-27. IX 2009. Plenarni referati i rezimei, 12.
2. Ćurčić, B. P. M., Makarov, S. E., Sekulić, T. 2009. Odbrambeni mehanizmi kod diplopoda (Arthropoda, Myriapoda). Simpozijum entomologa Srbije, Soko Banja, 23-27. IX 2009. Plenarni referati i rezimei, 13.

**PROJEKTI:**

**Nacionalni  
projekti**

Godina 2011.- Naziv:  
2014. "Ontogenetska karakterizacija filogenije bioraznovrsnosti".  
Ministarstvo za nauku Republike Srbije, No.173038.

**Strani jezici:**

Engleski jezik

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Татјана Љ. Секулић  
број индекса Б 3332/ 2009

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом  
Онтогенетска, специјска и генеричка карактеризација одбрамбених супстанци код  
неких представника фамилије Julidae, Leach 1814

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

**Потпис докторанта**

У Београду, 9. 01. 2014.

Т. Секулић



Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Татјана Љ. Секулић

Број индекса Б 3332/ 2009

Студијски програм Биологија развића животиња

Наслов рада Онтогенетска, специјска, и генеричка карактеризација одбрамбених супстанци код неких представника фамилије Julidae, Leach 1814

Ментор Слободан Макаров

Потписани/а \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис докторанта**

У Београду, 9. 01. 2014.

Т. Секулић

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Онтогенетска, специјска и генеричка карактеризација одбрамбених супстанци код неких представника фамилије Julidae, Leach 1814

која је моје ауторско дело.

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

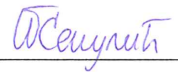
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 9. 01. 2014.



1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.