

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivan I. Šoštarić

**Fitohemijska i genetička varijabilnost
vrsta iz sekcije *Serpyllum* (Mill.) Benth.
roda *Thymus* L. (Lamiaceae) u Srbiji**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivan I. Šoštarić

**Phytochemical and genetical variability
of species from section *Serpyllum* (Mill.)
Benth. genus *Thymus* L. (Lamiaceae) in
Serbia**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2011

Ovde idu mentor i članovi komisije

Najveću zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Zori Dajić Stevanović i prof. dr Petru Marinu, koji su me od početka usmeravali, davali dragocene savete i podstrek da ovaj rad dovedem do kraja. Takođe želim da se zahvalim dr Sofiji Pekić Quarrie, dr Marini Mačukanović Jocić, dr Dragani Rančić, mr Ilinki Pećinar, Svetlani Aćić, Radenku Radoševiću i Maji Terzić, mojim kolegama sa Katedre za agrobotaniku Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beograd, koji nisu žalili truda da mi pomognu u svakoj situaciji. Prof. dr Radiši Jančiću, mr Danilu Stojanoviću i ostalim članovima Katedre za Botaniku Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sam zahvalan na pomoći i brojnim savetima. Veliko hvala prof. dr Vladi Matevskom koji mi je pomogao svojim neizmernim iskustvom pri determinaciji vrsta ovog komplikovanog roda. Izrada ove disertacije ne bi bila moguća bez svesrdne pomoći prof. dr Zlatka Šatovića i prof. dr Zlatka Libera i njihovih saradnika sa Sveučilišta u Zagrebu, te im se ovom prilikom od srca zahvaljujem. Takođe, veliko hvala i dr Monique Simmonds, dr Renée Grayer i ostalim članovima Jodrell Laboratory, Royal Botanical Gardens Kew, na omogućavanju izvođenja fitohemijskih analiza, kao i na pruženoj pomoći. Neizmerno hvala i velikim botaničarima i ljudima dr Mark W. Chase-u i dr Maichael Fay-u od kojih sam mnogo naučio kako o molekularnim markerima, tako i o strpljenju i toleranciji. Veliku zahvalnost dugujem i dr Stephen Quarrie-u na pomoći i korisnim savetima. Želim i da se zahvalim i mnogobrojnim kolegama, sa kojima sam delio dobro i zlo na terenskim i laboratorijskim ispitivanjima, mr Ivani Bjedov, mr Verici Stojanović, Jeleni Arsenijević, Milici Petrović i Milošu Bokorovu.

Naročito se zahvaljujem svojim mnogobrojnim preijateljima bez kojih život ne bi bio zanimljiv.

Hvala i mojim roditeljima na podršci i strpljenju tokom celog života.

Ova disertacija je posvećena Tanji, Sofiji i Marti bez kojih ništa ne bi imalo smisla.

Fitohemijaska i genetička varijabilnost vrsta iz sekcije *Serpyllum* (Mill.) Benth. roda *Thymus* L. (Lamiaceae) u Srbiji

Sažetak

Rod *Thymus* je po broju vrsta jedan od najznačajnijih u okviru familije Lamiaceae. U zavisnosti od pristupa autora broj vrsta unutar roda varira, međutim ukoliko se izabere pristup minimalne varijabilnosti, prema raspoloživim podacima opisano je 215 vrsta ovog roda. Vrste ovog roda podeljene su u osam sekcija. U flori Srbije opisana je, do sada, 31 vrsta i preko 100 infraspecijskih taksona, koje sve pripadaju podsekciji *Serpyllum*, sa izuzetkom vrsta *Thymus comptus* i *Th. striatus* (Sect. *Hyphodromi*) i *Th. vulgaris* (Sect. *Thymus*). Reproductivna izolacija između vrsta ovog roda je izuzetno slaba što čini taksonomska istraživanja još težim.

Vrste roda *Thymus* koriste se kao lekovite i aromatične biljke u tradicionalnoj i zvaničnoj medicini u svim krajevima u kojima se javljaju. Cilj ovog rada je bio da se opišu različiti hemotipovi unutar vrsta i populaciju ovog roda kao i da se analizom površinskih flavonoida i AFLP markera poboljša uvid u genetičke i evolutivne odnose između populacija vrsta ovog roda sa područja Srbije. U ovo istraživanje uključene su populacije vrsta *Th. pulegioides* (Subsect. *Alternantes*), *Th. glabrescens*, *Th. maschallianus* i *Th. pannonicus* (Subsect. *Isolepides*), *Th. balcanus* i *Th. praecox* (Subsect. *Peudomarginati*)

Analiza sastava etarskih ulja vršena je pomoću TD-GC-MS sistema, a jedinjenja su određen upoređivanjem RI i/ili masenog spektra sa literaturnim podacima. Identifikovana su ukupno 103 jedinjenja. Identifikovane su, po brojnosti, tri glavne grupe jedinjenja: seskviterpenski ugljovodonici, oksigenovani monoterpenski ugljovodonici i monoterpenski ugljovodonici. Statistička obrada sastava etarskih ulja uključila je korelacije, analizu glavnih komponenti i klaster analizu. Statistička obrada je pokazala da se, po relativnoj zastupljenosti jedinjenja, mogu razlikovati geraniolni, fenolni, germakren-D, citralni, linaloolni, (*E*)-kariofilen, α -terpinil acetat i linalil acetatni hemotip.

Analiza površinskih flavonoida vršena je pomoću LC-DAD i LC-APCI-MS. Utvrđeno je prisustvo 15 površinskih flavonoida. Ispitivane populacije se mogu podeliti

u dve grupe. U prvoj grupi su vrste koje imaju niske i srednje količine površinskih flavonoida, kao i one kod kojih su se površinski flavonoidi nalazili samo u tragovima. Kod ove grupe su najzastupljeniji flavoni sa 5,6-diOH-7-OMe i 5,6-diOH-7,8-diOMe supstitucionom šemom u A prstenu. U drugu grupu bi se mogle svrstati populacije koje, uglavnom, imaju malu količinu površinskih flavonoida i kod kojih je su najzastupljeniji flavoni sa 5-OH-6,7-diOMe i 5-OH-6,7,8-triOMe supstitucionom šemom u A prstenu. Prvoj grupi pripadaju populacije vrsta *Th. pulegioides*, *Th. glabrescens* i *Th. balcanus*, kao i neke populacije *Th. pannonicus*, dok drugoj grupi pripadaju populacije *Th. marschallianus*, neke populacije *Th. pannonicus* i *Th. praecox*.

AFLP markeri su korišćeni da bi se utvrdili genetički odnosi između odabranih populacija vrsta roda *Thymus*, sekcija *Serpyllum*. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) je pokazala da najviše genetičkog diverziteta potiče od razlika među individuama unutar populacija, dok je ostatak diverziteta gotovo jednako raspodeljen između vrsta i između populacija unutar vrsta. Dvosmerna AMOVA je dalje pokazala da je diferencijacija među vrstama bila značajna u svim slučajevima osim između *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus*. Sve jedinke koje su pripadale *Th. pulegioides* (Podsekcija *Alternantes*) formirale su dobro podržanu kladu, koja je najviše divergirala od ostalih vrsta. Prema dobijenim rezultatima podsekcija *Isolepides* je polifiletska. *Th. glabrescens* se jasno odvaja od druge dve vrste ove podsekcije (*Th. marschallianus*, *Th. pannonicus*). *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus*, iako se jasno razlikuju morfološki po indumentumu, na molekularnim nivo se ne mogu razdvojiti. Vrste koje pripadaju podsekciji *Pseudomarginati* su formirale monofiletsku kladu, mada ova nije bila podržana visokom bootstrap vrednošću. Ova klada se dalje delila u tri dobro podržane klade koje su predstavljale pojedinačne vrste (*Th. balcanus*, *Th. praecox* i *Th. moesiacus*).

Primena AFLP markera, u slučaju izabranih vrsta roda *Thymus*, se pokazala prikladnom za razrešavanje kompleksnih genetičkih odnosa koji uključuju i česte hibridizacije među vrstama, mada striktna retikulatna evolucija ne može biti određena. Svi pokazatelji populacione genetike u sekcij *Serpyllum* ukazuju da je reproduktivna izolacija među vrstama slaba i uključuje izražen retikulatni sistem, naročito u slučajevima kada se dve ili više vrsta javljaju simpatrički.

Ključne reči: *Thymus*, etarska ulja, hemotip, površinski flavonoidi, AFLP, genetički diverzitet, retikulatna evolucija.

Phytochemical and genetical variability of species from section *Serpyllum* (Mill.) Benth. genus *Thymus* L. (Lamiaceae) in Serbia

Abstract

In terms of the number of species, the genus *Thymus* is one of the most important genera within the Lamiaceae family. The number of species may vary depending on the approach of the author, but if the concept of minimal variability is chosen 215 species have been described. This genus is divided into 8 sections. In Flora of Serbia, 31 species and more than 100 infraspecific taxa have been described, all of which belong to section *Serpyllum*, except *Thymus comptus* and *Th. striatus* (Sect. *Hyphodromi*) and *Th. vulgaris* (Sect. *Thymus*). Reproductive isolation between species seems to be weak, which makes taxonomical studies in this genus even more difficult.

Species of genus *Thymus* are used as aromatic and medicinal plants in both traditional and modern medicine in all regions where they grow. The aim of this work was to describe different chemotypes within species and population of this genus and, by analysis of surface flavonoids and AFLP markers, provide better insight into genetic and evolutionary relationships among the populations and species of the genus *Thymus* from Serbia. This work included populations of *Th. pulegioides* (Subsect. *Alternantes*), *Th. glabrescens*, *Th. maschallianus* and *Th. pannonicus* (Subsect. *Isolepides*), *Th. balcanus* and *Th. praecox* (Subsect. *Peudomarginati*).

Analysis of essential oils was done by TD-GC-MS system, and compounds were identified by comparing RI and/or mass spectra with published data. 103 compounds were identified. Three major group of essential oil compounds were identified: monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpene hydrocarbons and sesquiterpene hydrocarbons. Based on relative abundance of compounds, Corelation, PCA and Cluster analysis were performed, and it revealed the existence of several chemotypes, such as geraniol, phenol, germacrene-D, citral, linalool, (*E*)-caryophyllene, α -terpinyl acetate and linalyl acetate chemotype.

Analysis of surface flavonoids was done by LC-DAD i LC-APCI-MS. Fifteen different flavones were identified. The analysed populations can be divided into two main profile groups; the first group comprises populations containing generally low and medium concentrations, as well as those with trace concentrations of surface

flavonoids. In this group the dominant flavones were with a 5,6-diOH-7-OMe and 5,6-diOH-7,8-diOMe A-ring substitution pattern. The second group comprises populations containing generally low quantities of surface flavonoids, and with dominant 5-OH-6,7-diOMe and 5-OH-6,7,8-triOMe A-ring substitution pattern. *Th. pulegioides*, *Th. glabrescens* i *Th. balcanus*, and some populations of *Th. pannonicus* belong to first group, while *Th. marschallianus*, some populations of *Th. pannonicus* and *Th. praecox* belong to the second group.

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers were used to assess genetic relations of 32 *Thymus* populations belonging to seven species of genus *Thymus*, section *Serpyllum* from Serbia. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that most of the genetic diversity was attributable to differences among individuals within populations, while the remaining variability was almost equally distributed among species and among populations within species. The pairwise AMOVA analyses further showed that species differentiation was significant in all cases, except between *Th. marschallianus* and *Th. pannonicus*. All the individuals belonging to *Th. pulegioides* (subsection *Alternantes*) formed a well-supported clade, the most divergent from all other species in this study. According to these results, the subsection *Isolepides* is polyphyletic. *Th. glabrescens* is clearly separated from the other two species of this subsection (*Th. marschallianus*, *Th. pannonicus*). Although morphologically distinguishable by leaf indumentum, individuals belonging to *Th. marschallianus* and *Th. pannonicus* could not be differentiated at the molecular level. The species belonging to subsection *Pseudomarginati* formed a monophyletic clade, although not supported by high bootstrap value. The clade is further divided into three well-supported clades representing distinct species (*Th. balcanus*, *Th. praecox* and *Th. moesiacus*).

AFLP markers demonstrated, in the case of selected species of genus *Thymus*, that they could be suitable for studying complex genetic relationships, including frequent interspecies hybridization events, although strict reticulate evolutionary history could not be determined. All the population genetic parameters in the section *Serpyllium* suggests that the reproductive incompatibility between species is very weak indicating strong reticulating system, especially in the case when two or more species occur sympatrically.

Key words: *Thymus*, essential oil, chemotype, surface flavonoids, AFLP, genetic diversity, reticulate evolution.

Sadržaj

1. UVOD.....	2
1.1. Taksonomski pregled porodice Lamiaceae.....	2
1.2. Taksonomski pregled roda <i>Thymus</i> i rasprostranjenje	4
1.2.1. Istorijska pozadina statusa i infrageneričke klasifikacije roda <i>Thymus</i>	4
1.2.2. Savremena klasifikacija roda <i>Thymus</i>	7
1.3. Naučni pristupi i metode u klasifikaciji vrsta roda <i>Thymus</i>	12
1.3.1. Morfologija i biologija roda <i>Thymus</i>	12
1.3.2. Fitohemijska istraživanja u okviru roda <i>Thymus</i>	15
1.3.3. Kariološka, palinološka i mikromorfološka istraživanja vrsta roda <i>Thymus</i>	31
1.3.5. Molekularna istraživanja	32
1.4. Opis izabranih taksona roda <i>Thymus</i>	33
1.5. Ciljevi rada	40
2. Metrijal i metode	41
2.1. Fitohemijska ispitivanja.....	41
2.1.1. Biljni materijal.....	41
2.1.2. Etarska ulja	41
2.1.3. Površinski flavonoidi.....	45
2.2. Molekularna ispitivanja	46
2.2.1. Biljni materijal.....	46
2.2.2. Ekstrakcija DNA i AFLP analiza	47
2.2.3. Analiza podataka	48
3. Rezultati.....	50
3.1. Fitohemijska ispitivanja.....	50
3.1.1. Etarska ulja	50
3.1.2. Površinski flavonoidi.....	91
3.2. AFLP markeri	97
4. Diskusija	103
4.1. Sastav etarskih ulja	103
4.2. Površinski flavonoidi.....	109
4.3. AFLP analiza	112
4.4. Opšta diskusija.....	115
5. Zaključci	119
Literatura	123

1. UVOD

1.1. Taksonomski pregled familije Lamiaceae

Predstavnici familije Lamiaceae imaju široko rasprostranjenje na Zemljinoj kugli, prisutni su na svim kontinentima izuzev Arktika. U okviru ove familije nalazi se oko 240 rodova i preko 7200 vrsta (Braüchler i sar., 2010). Klasifikacijom familije Lamiaceae bavili su se mnogi autori, ali najpoznatiji su radovi iz druge polovine XIX veka. Bentham (1876) je podelio familiju Lamiaceae na osam tribusa. Reviziju ove klasifikacije izvršio je Briquet (1895-1897) uzdižući neke od tribusa i subtribusa na nivo podfamilija i kao najupečatljiviju izmenu spojio dva najveća tribusa i dva manja u jedinstvenu podfamiliju Stachyoideae. Ovaj Briquet-ov sistem klasifikacije je do danas ostao u najširoj upotrebi (Cantino i Sanders, 1986).

Erdtman (1945) je predložio podelu familije Lamiaceae na dve prirodne podfamilije, podfamiliju Lamioideae, sa trikolpatnim polenovim zrnima (retko tetrakolpatnim), koja se raznose u dvoćelijskoj fazi, i podfamiliju Nepetoideae, sa heksakolpatnim polenovim zrnima (retko 8-, 10- ili 12-kolpatna), koja se raznose u troćelijskom obliku. Ovakvu podelu familije Lamiaceae podržala su brojna kasnija istraživanja, koja su osim palinoloških uključila i fitohemijska, embriološka i morfološka istraživanja (Cantino i Sanders, 1986). Međutim, ovakvom podelom familije Lamiaceae, ostao je problem, što je familija Verbenaceae parafiletska, dok je familija Lamiaceae polifiletska. Harley i sar. (2004) su familiju Lamiaceae podelili u sedam podfamilija: Ajugoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Prostantheroideae, Scutellarioideae, Symphorematoideae i Viticoideae. Od ovih podfamilija, Nepetoideae su najbolje definisane i odlikuju se, uz već navedene karakteristike, i prisustvom rozmarinske kiseline (Harley i sar., 2004). Takođe, molekularne analize su potvrdile da je ova grupa monofiletska (Wagstaff i sar., 1995; Wagstaff i Olmstead, 1997). Dalja podela ove podfamilije na tribuse uveliko zavisi od viđenja autora. Na osnovu morfoloških karaktera, ali i molekularnih istraživanja, Cantino i sar. (1992) su predložili novu podelu podfamilije Nepetoideae na četiri tribusa: Elsholtzieae, Ocimeae, Lavanduleae i

Mentheae, pri čemu je ovaj poslednji pretrpeo najveće promene u odnosu na prethodne klasifikacije. Ovakvu podelu su prihvatili i Harley i sar. (2004), s tim da su Lavanduleae uključili u Ocimeae. Tribus Mentheae obuhvata tri subtribusa, Salviinae, Nepetinae i Menthinae, ovom potonjem pripada oko 43 roda, od ukupno 66 rodova tribusa Mentheae, od kojih su mnogi lekovite i aromatične biljke.

Rod *Thymus* pripada tribusu Mentheae u subfamiliji Nepetoideae (Cantino et al, 1992). Najbliži su mu rodovi *Origanum*, *Satureja*, *Micromeria* i *Thymbra*. *Thymus* se smatra dobro definisanim rodом, što je zasnovano na morfološkim i hemijskim karakteristikama (Morales, 2002).

U zavisnosti od pristupa autora broj vrsta unutar roda varira, međutim ukoliko se izabere pristup minimalne varijabilnosti, prema raspoloživim podacima opisano je 215 vrsta ovog roda (Morales, 1996) i jedino su u ovoj familiji veći rodovi *Salvia*, *Hyptis*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Teucrium*, *Nepeta* i *Plectranthus*.

Hibridizacija u okviru roda *Thymus* je veoma česta kada dve ili više vrsta žive simpatrički. Do danas je na Iberijskom poluostrvu opisano oko 60 hibrida uz 35 vrsta koje su prisutne na ovom području (Morales, 1995). Neka hemijska istraživanja ukazuju da je ovaj rod veoma homogen, za razliku od rodova *Teucrium* i *Sideritis* koji su hemijski veoma heterogeni (Morales, 1986). Ove dve karakteristike ukazuju da je rod najverovatnije monofiletski (Morales, 2002). Unutar roda genetska nekompatibilnost između vrsta gotovo da ne postoji, što čini taksonomska istraživanja veoma teškim, naročito u nekim grupama kao što su na primer sekcija *Hyphodromi* a naročito sekcija *Serpyllum*, kod koje je jako teško primeniti koncept vrste (Morales 2002). Prema Moralesu (2002) ukoliko se primeni sinoptički kriterijum, verovatno bi se veliki broj formi, ponekada i ekoloških formi, uključio kao proste populacije u neki takson, međutim ukoliko bi se primenio analitički kriterijum, rizikuje se da se prevede postojeće vrste kao prirodne celine. U slučaju nedoumice Morales predlaže primenu sinoptičkog kriterijuma.

Na nivou vrsta u upotrebi je veliki broj imena, više od 1000, od kojih su mnoga sinonimi (Morales, 2002).

Tabela 1.1 Pregled tradicionalne klasifikacije familije Lamiaceae, prema Cantino i Sanders (1986).

Bentham 1876	Briquet 1895-1897	Erdtman 1945
Tribus Ajugeae	Subfam. Ajugoideae (uključuje i <i>Rosmarinus</i> iz Bentham-ovih Salviae)	Subfam. Lamioideae
Tribus Prostanthereae	Subfam. Prostantheroideae	
Tribus Prasieae	Subfam. Prasioideae	
Tribus Lamieae	Subfam. Scutellarioideae	
Tribus Nepeteae	Subfam. Lamioideae	Subfam. Nepetoideae
Tribus Salviae		
Tribus Mentheae		
Tribus Ocimeae	Subfam. Ocimoideae	
	Subfam. Lavanduloideae	
	Subfam. Catoptherioideae	

1.2. Taksonomski pregled roda *Thymus* i rasprostranjenje

1.2.1. Istorijska pozadina statusa i infrageneričke klasifikacije roda *Thymus*

Status i infragenerička klasifikacija roda *Thymus* pre Linné-a

Postoji nekoliko pretpostavki o poreklu imena *Thymus*. Neki autori smatraju da je latinski naziv *Thymus* izveden iz grčke reči *thyo* (miris), dok drugo tumačenje uzima grčku reč *thymos* (snaga, hrabrost) kao etimološki koren imena roda. Isprva je naziv „thymus“ obuhvatao grupu aromatičnih biljaka sa sličnim svojstvima, koje su korišćene za stimulaciju vitalnih funkcija. Mnoga narodna imena za vrste roda *Thymus* u romanskim jezicima izvedena su iz latinskog naziva. Isto važi i za englesko ime. U srpskom jeziku vrste ovog roda se nazivaju majčina ili majkina dušica, babina dušica,

bakina dušica, materina duša, materinka, duša, dušica, paprica, poponac, tamjanika, pismena trava, trup, vriješ (Simonović, 1959; Čajkanović, 1985).

U svom delu iz prvog veka, koje je preveo Laguna 1555. godine, Dioskorides piše o „*Thymo*“. Međutim, Laguna ne nalazi pod ovim imenom ni jednu vrstu roda *Thymus*, već biljku koja odgovara rodu *Stureja*. Na strani 294 Laguna opisuje *Serpol*, sa dva varijeteta, gajenim i samoniklim, gde bi ovaj drugi *Zygis*, mogao biti vrsta *Thymus*-a.

Status i infragenerička klasifikacija roda *Thymus* po Linné-u

Interesantno je kako se Linné odnosio prema rodu *Thymus* u svojim različitim delima. Njegovo znanje se uglavnom zasnivalo na pređašnjim autorima. U delu Hortus Califfortianus (1737) on navodi šest vrsta, od kojih dve poslednje, kako to danas znamo, pripadaju rodovima *Satureja* i *Acinos*. Njegov Br. 1 je *Th. erectus*, što je u stvari *Th. vulgaris*, Br. 2 je *Th. repens*, odnosno neka vrsta iz sekcije *Serpyllum*, Br. 3 je *Thymbra capitata* i Br. 4 *Th. mastichina*. U njegovom delu Hortus Upsalensis (1748) pominju se samo *Th. vulgaris* i *Th. mastichina*. U delu referentnom za botaničku binomnu nomenklaturu, Species Plantarum 1. izdanje (1753), uključeno je osam vrsta u rod *Thymus*: 1. *Th. serpyllum*, 2. *Th. vulgaris*, 3. *Th. zygis*, 4. *Th. acinos* (danas *Acinos arvensis*), 5. *Th. alpinus* (danas *Acinos alpinus*), 6. *Th. cephalotos* (danas *Th. lotocephalus*), 7. *Th. villosus* i 8. *Th. pulegioides*. U okviru *Satureja* je 4. *Satureja mastichina* (danas *Th. mastichina*).

U Genera Plantarum (1754) Linné navodi, 646. *Thymus: Serpyllum, Acinos i Mastichina*. U Species Plantarum 2. izdanje (1762) Linné je premestio *Th. mastichina* (ranije *Satureja mastichina*) pod rednim brojem 8 u *Thymus*. U prvom izdanju pod ovim brojem je bio *Th. pulegioides*. Line ovu promenu objašnjava sličnošću ove vrste sa oba roda. U Systema Nature 2 (12. izdanje, 1767) prvi put se pominje *Th. piperella*.

Status i klasifikacija roda *Thymus* nakon Linné -a

Brotero (1804) je opisao novu vrstu *Th. caespititus*. Takođe, Hoffmannsegg i Link (1809) u svom radu, Flora Portugalije, opisuju nekoliko novih vrsta, *Th. albicans*, *Th. capitellatus*, *Th. camphoratus* i *Th. sylvestris*. Bentham (1834) je prvi podelio rod

Thymus u sekcije: *Mastichina*, sa *Th. mastichina* i *Th. tomentosus*; *Serpyllum* sa *Th. vulgaris*, *Th. piperella*, *Th. villosus*, *Th. capitellatus* i *Th. capitatus*; i *Pseudothymbra* sa *Th. cephalotos* (danas *Th. lotocephalus*).

Edmund Boisser (1839-1845), čuveni švajcarski botaničar iz Ženeve, tokom svojih proputovanja kroz Španiju proučavao je i opisivao vrste roda *Thymus* sa Iberijskog poluostrva. Takođe je ostavio i vredne opise vrsta ovog roda iz severne Afrike, kao i iz Grčke i Turske, u svom delu *Flora Orientalis* (1867-1884). U svom delu *Elenchus* (1838) on je opisao *Th. willdenovi*, *Th. granatensis*, *Th. longiflorus* i *Th. membranaceus*. 1845 formirao je sekciju *Pseudothymbra*, a kasnije je opisao *Th. carnosus*, *Th. lusitanicus* i *Th. baeticus* kao varijetet *Th. hirtus*.

Willkomm (1868), nemački botaničar i autor dela *Prodromus Florae Hispanicae*, zajedno sa svojim danskim kolegom Lange, smatrao je da se rod *Thymus* sastoji iz pet sekcija, *Mastichina*, *Zygis*, *Piperella*, *Serpyllum* i *Pseudothymbra*. Sekcija *Serpyllum* bi obuhvatala dve grupe, prva sa *Th. chamaedrys*, *Th. serpyllum* i *Th. herba-barona* i druga sa *Th. bracteatus*, *Th. serpylloides* i *Th. granatensis*.

Briquet (1897) je izvršio reviziju Englerovog monumentalnog dela i opisao dve sekcije, *Pseudothymbra* i *Serpyllum*. Ovu drugu je podelio u pet podsekcija: *Bracteatae* (*Th. capitellatus*, *Th. villosus*, *Th. algarbiensis*, *Th. albicans*), *Serpylla*, *Piperellae* (*Th. piperella*, *Th. caespititus*, *Th. origanoides*, *Th. bovei*), *Vulgares* (*Th. vulgaris*, *Th. sabulicola*, *Th. hyemalis*, *Th. zygis*, *Th. carnosus*, *Th. hirtus*) i *Mastichinae* (*Th. mastichina*, *Th. tomentosus*, *Th. welwitschii*, *Th. fontanesii*).

Velenovsky (1906) u svom radu o rodu *Thymus* opisao deset sekcija: *Coridothymus*, *Vulgares*, *Orientales*, *Anomali* (*Th. antoninae*, *Th. portae*), *Mastichina* (*Th. fontanesii*), *Thymastra* (*Th. algarbiensis*, *Th. albicans*, *Th. capitellatus*), *Pseudothymbra* sa dve grupe (suffructosi: *Th. membranaceus*, *Th. longiflorus*, *Th. funkii* i herbacei: *Th. cephalotos*, *Th. villosus*, *Th. granatensis*), *Piperella*, *Micantes* i *Serpyllum* (u koju je uključio i *Th. serpyllastrum*).

Najvažniji španski autor koji je proučavao *Thymus* je Pau, čiji se interes za vrste ovog roda protezao kroz čitav njegov rad. U svom radu iz 1929. godine, "Introducción de los tomillos españoles", analizirao je predhodne radove Linnéa, Boissera i Willkomma. U ovom radu je dao zanimljive osvrtne na vrste roda *Thymus*. I drugi

španski autori su se bavili ovim rodom, Huguert del Villar (1934), Vicioso (1974) i Elena-Rosselló (1976), kao i mnogi drugi.

Iako je Španija uvek bila centar taksonomskih istraživanja na *Thymus*-u, mnogi veliki botaničari van Iberijskog poluostrava su se bavili ovim rodom. Treba posebno istaći Ronniger-a koji je sačinio veoma važan herbarijum, koji se danas nalazi u Beču, i Jakko Jalas-a, finskog botaničara koji je priredio rod *Thymus* u Flora Europaea (1972), Flora Iranica (1982) i Flora of Turkey and the East Aegean Islands (1982).

Klasifikacija roda *Thymus* u Flori Srbije

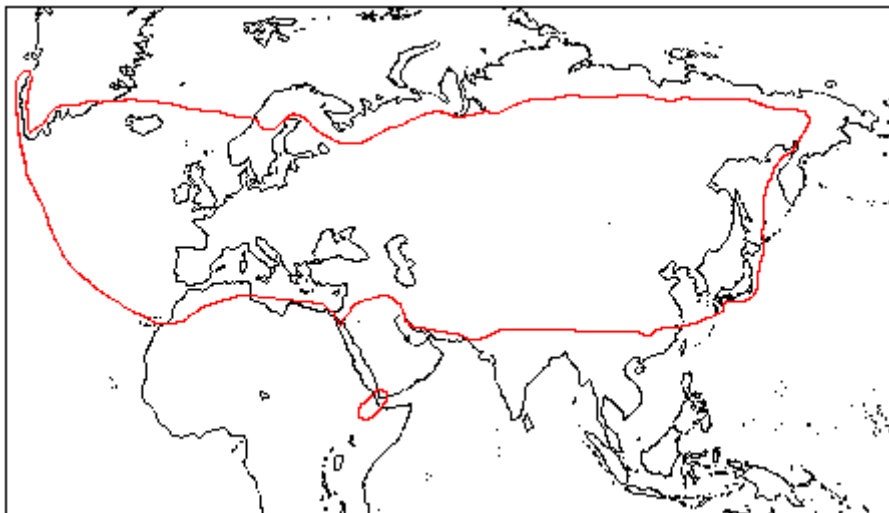
Pančić je u svom delu Flora u okolini Beogradskoj (1865) opisao samo *Thymus serpyllum*. U delu Flora kneževine Srbije (1874) Pančić, uz *Th. serpyllum*, navodi i *Th. nummularius*, a u delu Dodatak Flori kneževine Srbije (1884) i *Th. striatus*. U delu Flora okoline Niša (1882), Petrović navodi vrste *Th. serpyllum* i *Th. striatus*, s time da u okviru vrste *Th. serpyllum* navodi i niže kategorije *genuinus*, *latifolius*, *nummularis* i *Pannonicus*. U delu Dodatak Flori okoline Niša (1885) Petrović ne navodi nove vrste ali navodi nove odlike *angustifolius*, *acicularis*, *Serbicus*, *montanus* i *citrodus*.

Diklić (1974) je u Flori Srbije opisao 31 vrstu i preko 100 infraspecijskih taksona.

1.2.2. Savremena klasifikacija roda *Thymus*

Vrste roda *Thymus* su rasprostranjene u aridnim, toplim i hladnim regionima Starog Sveta, severno od Ekvatora pa do obala Grenlanda (Slika 1) (Morales 1989).

Region zapadnog Mediterana se smatra centrom diverziteta ovog roda. Rod je podeljen na osam sekcija: *Mastichina*, *Micantes*, *Piperella*, *Pseudothymbra*, *Thymus*, *Teucrioides*, *Hyphodromi* i *Serpyllum* (Jalas 1971).



Slika 1.1 Areal roda *Thymus* (Prema Morales, 2002).

Prvih pet se nalaze samo na Iberijskom poluostrvu, severozapadnoj Africi i Makroneziji (Zapadni Region). Ovih pet sekcija je manje više dobro proučeno (Morales 1986, 1994).

Sekcija *Mastichina* obuhvata dve vrste koje se nalaze samo na Iberijskom poluostrvu: *Th. mastichina*, ili divlji majoran, i *Th. albicans*.

Skcija *Micantes* obuhvata zeljastu Iberijsko-Makronezijsku vrstu *Th. caespititus* koja se nalazi u severozapadnom Atlanskom regionu Pirinejskog poluostrva i na Maderi i Azorskim ostrvima, i drvenaste vrste iz Maroka, *Th. saturejoides* i *Th. riatarum*.

Sekcija *Piperella* se sastoji od samo jedne endemične vrste *Th. piperella* iz istočne Španije.

Sekcija *Pseudothymbra* se karakteriše sa prisustvom dugih brakteja i cvetova. U nekim slučajevima su krunice dugačke i do 2 cm. Od 9 vrsta, 7 su nađene na jugu Pirinejskog poluostrva (*Th. lotocephalus*, *Th. villosus*, *Th. longiflorus*, *Th. membranaceus*, *Th. moroderi*, *Th. funkii*, *Th. antoninae*) dok 2 rastu u severozapadnoj Africi (*Th. bleicherianus*, *Th. munbyanus*).

Sekcija *Thymus* zastupljena je samo u zapadnom Mediteranu, i najvažnije vrste su *Th. vulgaris*, *Th. zygis* i *Th. willdenowii*. *Th. vulgaris* je rasprostranjena u severnoj Italiji, južnoj Francuskoj i u istočnom delu Španije, ova vrsta se danas inače gaji kao lekovita i začinska biljka u mnogim delovima Sveta. *Th. zygis* je veoma česta vrsta na Iberijskom poluostrvu, dok je *Th. willdenowii* rasprostranjen u Maroku, Alžiru i Gibraltaru. Ovoj sekciji, takođe, pripadaju i vrste *Th. capitellatus* i *Th. camphoratus* iz

Portugalije, *Th. carnosus* koji se javlja samo na jugo-zapadu Iberijskog poluostrva, *Th. baeticus*, *Th. loscosii*, *Th. serpylloides*, svi endemit Španije, i *Th. hyemalis* sa jugo-istoka Španije i severnog Maroka.

Sekcija *Teucrioides* je endemična za Balkansko poluostrvo. Vrste ove sekcije naseljavaju planine Grčke i Albanije. Ovom sekcijom su obuhvaćene tri vrste: *Th. teucrioides*, *Th. rechingeri* i *Th. leucospermus*. Ovu sekciju je proučavao Hartvig (1987), međutim, broj hromozoma još uvek nije poznat.

Sekcija *Hyphodromi* se javlja u celom regionu Mediterana i obuhvata oko 60 vrsta, svrstanih u tri podsekcije, *Subbracteati*, *Serpyllastrum* i *Thymbropsis*.

Podsekcija *Subbracteati* se karakteriše manje više revolucionarnim ili konvolutnim listovima i ima najverovatnije poreklo iz istočnog Mediterana. Samo jedna vrsta je prisutna u severnoj Africi, *Th. algeriensis*, od Maroka pa do Libije. *Th. mastigophorus* se javlja u centralnoj Španiji. *Th. spinulosus* je prisutan na Siciliji i u Italiji, a *Th. striatus* se javlja na Apeninskom i Balkanskom poluostrvu. Ove poslednje dve vrste su veoma varijabilne. *Th. aragaeus*, *Th. brachychilus*, *Th. cappadocicus*, *Th. cherlerioides*, *Th. convolutus*, *Th. pulvinatus* i *Th. revolutus* se javljaju u Turskoj, *Th. boisseri*, *Th. comptus*, *Th. dolopicus* i *Th. plasonii* na Balkanskom poluostrvu, *Th. atticus*, *Th. paranassicus* i *Th. leucotrichus* u Turskoj i Balkanskom poluostrvu, s tim da se poslednja vrsta javlja i u Siriji i Libanu. *Th. integer* je endemit Kipra, međutim verovatno se ne razlikuje od *Th. leucotrichus*. *Th. samius* se javlja na ostrvima u Egejskom moru. *Th. borysthenicus* i *Th. pallasianus* imaju areal severno od Crnog Mora, *Th. persicus* se javlja južno od Kavkaza, međutim poznat je samo jedan lokalitet ove vrste.

Podsekcija *Serpyllastrum* je grupa vrsta karakterističnih po prostratnim stablima i ravnim listovima koji su manje više široki. Pet vrsta iz ove podsekcije naseljava Španiju: *Th. bracteatus*, *Th. leptophyllus*, *Th. fontqueri*, *Th. granatensis* i *Th. lacaitae*. Ova podsekcija je takođe rasprostranjena na istoku Mediterana, međutim ni jedna vrsta ne nastanjuje severnu Afriku i Italiju. *Th. aznavoutii* i *Th. bracteosus* se javljaju na Balkanskom poluostrvu. *Th. canoviridis*, *Th. haussknechtii*, *Th. pectinatus* i *Th. spathulifolius* su rasprostranjeni u Turskoj, dok se areal vrste *Th. zygooides* proteže preko Balkanskog i Krimskog poluostrva i Turske. Ova vrsta i endemit Španije, *Th. lacaitae* su morfološki izuzetno slični. Ovoj podsekciji pripada i grupa vrsta koje se javljaju samo na Kavkazu: *Th. dagestanicus*, *Th. hadzhievii*, *Th. helendzihcus*, *Th. karjaganii*,

Th. ladjanuricus, *Th. lipskyi*, *Th. majkopiensis* i *Th. sosnowskyi*; kao i sedam vrsta iz centralne Azije: *Th. cuneatus*, *Th. eremita*, *Th. incertus*, *Th. irtychensis*, *Th. kirgisorum*, *Th. nerczensis* i *Th. petraeus*.

Podsekcija *Thymbropsis* obuhvata severnoafričke vrste *Th. broussonetii*, *Th. maroccanus*, *Th. lanceolatus*, *Th. numidicus*, *Th. pallescens* kao i dva endemita Grčke, *Th. laconicus* i *Th. holosericus*. Ovde spadaju još pet vrsta iz Turske, *Th. cariensis*, *Th. cilicicus*, *Th. eigii*, *Th. leucostomus* i *Th. sipyleus*. *Th. syriacus* se javlja u Libanu, Siriji i jednom lokalitetu u severnom Iraku, *Th. bovei* se javlja na Sinajskom poluostrvu, u Izraelu, Jordanu, Iraku i Saudijskoj Arabiji, dok se *Th. decussantus* javlja na Sinaju i u Saudijskoj Arabiji. Ovo je grupa uglavnom severnoafričkih i istočnoazijskih vrsta.

Sekcija *Serpyllum* se smatra najstarijom u rodu. Obuhvata oko 125 vrsta i pokriva ceo areal roda, osim Madeire i Azorskih ostrva. U okviru ove sekcije javlja se i najveća varijabilnost u broju hromozoma. Ovoj sekciji pripadaju kako manje više drvenaste vrste koje naseljavaju planine u suvim regionima, kao na primer *Th. organoides* sa Kanarskih ostrva, *Th. serrulatus* i *Th. schimperii* iz Etiopije i *Th. laevigatus* sa jugo-zapada Arabijskog poluostrva, tako i manje više zeljaste vrste koje nastanjuju planine Mediteranskog regiona i ostatak Evroazije sve do Japana i južnih obala Grenlanda. Ova potonja grupa izgleda da je u evolutivnom smislu mlađa i verovatno intenzivno evoluirala i kolonizuje nova područja od poslednje glaciacije. Sekcija *Serpyllum* obuhvata sedam podsekcija.

Podsekcija *Insulares* sadrži vrstu *Th. willkommii* koja je endemit Španije, zatim *Th. richardii* sa tri podvrste; supsp. *richardii* koja se javlja na Majorci i u Jugoslaviji, subsp. *ebusitanus* sa Ibice i subsp. *nitidus* sa ostrva Maretimo pored Sicilije. *Th. dreatensis* i *Th. guyonii* su severnoafričke vrste, dok je *Th. organoides* endemit Kanarskih ostrva. *Th. bornmulleri* je endemit severozapadne Turske.

Podsekcija *Kotschyani* obuhvata veliki broj Azijskih vrsta i u području Mediterana se javljaju samo *Th. transcaucasicus* i *Th. fallax* u Turskoj. Iz ove podsekcije su još zanimljive vrste *Th. laevigatus* iz planina Jemena, *Th. schimperi* i *Th. serrulatus* iz Etiopije.

Podsekcija *Pseudopiperellae* obuhvata vrste *Th. herba-barona*, koja je rasprostranjena na Majorci, Korzici i Sardiniji (Mayol et al, 1990), i *Th. nitens* sa juga Francuske.

Pet vrsta koje naseljavaju Balkansko poluostrvo pripada podsekciji *Isolepides*. To su *Th. bulgaricus*, *Th. glabrescens*, *Th. longedentatus*, *Th. pannonicus* i *Th. sibthorpii*.

Podsekcija *Alternantes* obuhvata *Th. linearis* sa Himalaje i evropske vrste *Th. pulegioides*, *Th. feoelichianus*, *Th. alpestris*, *Th. oehmianus*, *Th. bihorensis* i *Th. comosus*.

Podsekciji *Pseudomarginati* pripadaju vrste *Th. longicaulis* i *Th. praecox* koje su veoma česte u Evropi i Turskoj, kao i *Th. nervosus* koji je endemit Pirinejskog poluostrva i Centralniog masiva u Francuskoj. Ovoj podsekciji takođe pripadaju *Th. ocheus*, *Th. stojanovii* i *Th. tracicus* sa Balkanskog poluostrav i istočnog Mediterana.

Podsekcija *Serpyllum* obuhvata *Th. quinquecostatus* iz Japana, evropsku vrstu *Th. serpyllum*, *Th. talijevii* i još neke vrste rasprostranjene u Rusiji.

Podela roda *Thymus* koju je dao Menitsky (1973) značajno se razlikuje od one koju je dao Jalas (1972), i kasnije, podržao Morales (1985). On je rod *Thymus* podelio na jedanaest sekcija. Sekcije *Thymus*, *Teucroides*, *Mastchina*, *Pseudothymbra* i *Piperella* se ne razlikuju između ova dva autora.

Menitsky ne navodi sekciju *Hyphodromi* već podsekciji *Subbracteati*, kako je shvata Jalas, odgovaraju sekcija *Orientales* i gupa *Th. striatus* iz sekcije *Serpyllum*, podsekcija *Isolepides*. Podsekcija *Thymbropsis* je izdvojena u posebnu sekciju, a podsekcija *Serpyllastrum*, po Menitsky-om, pripada sekciji *Serpyllum*.

Menitsky navodi sekciju *Saturejoides* i u okviru sekcije *Serpyllum* podsekciju *Micantes* koje bi odgovarala Jalasovoj sekciji *Micantes*.

Najveće razlike između dva sistema klasifikacije su u odnosu na sekciju *Serpyllum*. Menitsky je *Th. serrulatus* iz podsekcije *Koschyana* uvrstio u sekciju *Serrulatus*, a ostale vrste iz podsekcije *Koschyana* uključio u sekciju *Marginati*. Ostale podsekcije, sekcije *Serpyllum*, kako ih vidi Menitsky, su *Micantes*, *Serpyllastrum*, *Isolepides*, koja nikako ne odgovara onoj kod Jalasa, i *Serpyllum*.

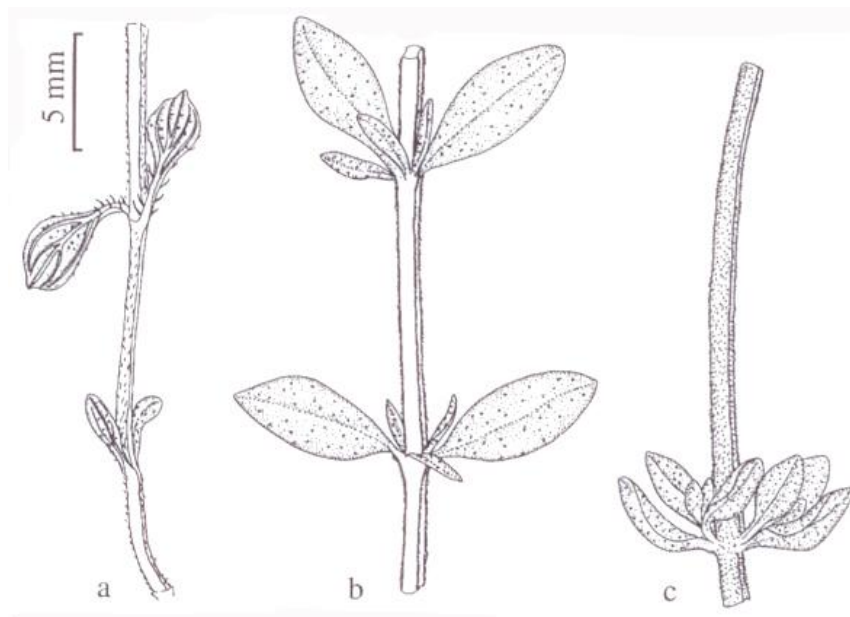
Menitsky opisuje sekciju *Marginati* sa dve podsekcije, *Marginatii* i *Verticillati*. Predstavnici iz ove sekcije, po Jalas-u, pripadaju sekciji *Serpyllum* i to podsekcijama *Pseudopiperella*, *Insulares*, *Kotschyana*, *Alternantes*, *Pseudomarginati* i *Isolepides*. U ovom radu koristiće se klasifikacija roda *Thymus* po Jalas-u (1971).

Sve vrste opisane u našoj flori pripadaju skciji *Serpyllum* osim vrsta *Thymus comptus* i *Th. striatus* (Sect. *Hyphodromi*) i *Th. vulgaris* (Sect. *Thymus*), koja je unesena u našu floru i gaji se kao začinska i lekovita biljka.

1.3. Naučni pristupi i metode u klasifikaciji vrsta roda *Thymus*

1.3.1. Morfologija i biologija roda *Thymus*

Biljke roda *Thymus* se karakterišu prema svom habitusu odnosno životnoj formi. Mogu se razlikovati dve grupe, jednu čine predstavnici koji imaju oblik žbunova, ne viši od 50 cm, kao na primer *Th. baeticus* i *Th. hyemalis* sa Iberijskog poluostrva, i druge koja obuhvata predstavnike sa puzećim stablima katkada sa adventivnim korenima. Ova životna forma je veoma česta kod vrsta iz skcija *Serpyllum* i *Hypodromi*. *Th. caespititus* predstavlja izuzetak sa cespitoznim habitusom koji može da ima veoma dugačke izdanke. Kao i većina predstavnika Lamiaceae, *Thymus* na poprečnom preseku ima četvrtasta stabla. Mladi izdanci su prekriveni dlakama. Dlake mogu prekrivati sve četiri strane stabla (holotrichous), dve naspramne strane, koje se smenjuju po internodijama (alelotrichous) ili se mogu nalaziti samo na rebrima (goniotrichous) (Slika 3). Uloga različitih tipova dlaka na stablu još uvek nije razjašnjena.



Slika 1.2. Pokrivenost stabla trihomima: a) alelotrichous (*Th. praecox*); b) goniotrichous (*Th. pulegioides*) i c) holotrichous (*Th. piperella*) (iz Morales, 2002).

Listovi mogu biti uži ili širi sa ravnom lisnom pločom ili mogu biti sa podavijenim ivicama (revolutni). Indumentum je veoma varijabilan. Tektorne dlake kod *Thymus*-a su uvek proste, ali retko jednoćelijske. Listovi su često sa trepljama na obodu, bilo celom dužinom, bilo samo pri osnovi i petioli. Glandularni trihomi su veoma bitni pošto sadrže etarska ulja. Postoje dve vrste grandularnih trihoma: kapitatne žlezde sa gornjom ćelijom punom etarskih ulja i peltatne žlezde sa ćelijama u osnovi koje su tipične za Lamiaceae.

Cvetovi se uglavnom javljaju u grupama u nodusima. Mali broj vrsta ima samo dva cveta po nodusu (*Th. antoninae*), a znatno češće se u nodusima nalazi veći broj cvetova. Vrste sa kraćim internodijama imaju loptaste i glavičaste cvasti. Ukoliko je ovo slučaj, brakteje se razlikuju po obliku i veličini od ostalih listova. Ovo naročito važi za *Th. membranaceus*, *Th. carnosus* i druge pripadnike skcija *Pseudothymbra* i *Thymus*. Kod nekih vrsta brakteje mogu biti izuzetno dugačke, kao npr kod *Th. satureioides*.

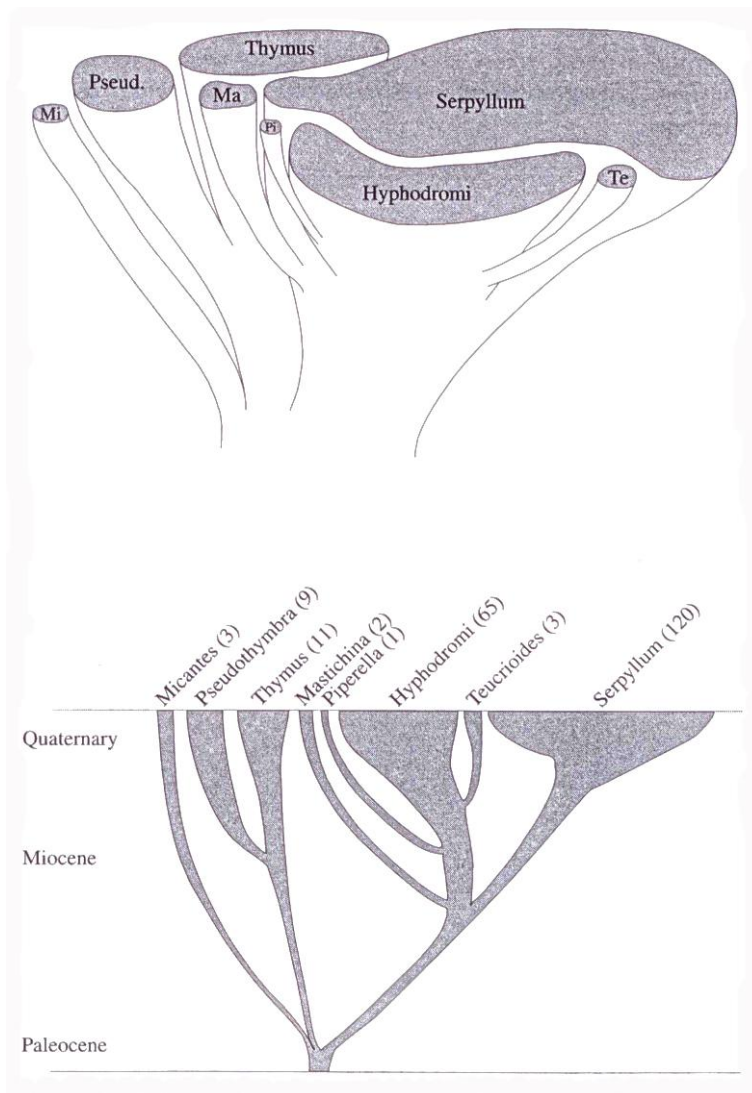
Čašica kod *Thymus*-a u suvom stanju igra veoma važnu ulogu pri rasejavanju plodova. S tim u vezi grlo je zatvoreno sa dlakama i vetar je može preneti na velike udaljenosti. Čašice kod nekih vrsta, kao npr. *Th. mastichina*, imaju izduženi zub prekriven cilijama koji služi za rasejavanje slično papusu kod Asteraceae. Čašica obično

ima pet zubaca, tri gornja i dva donja, gde su ovi potonji uvek duži i obično savijeni na gore. Oni verovatno imaju ulogu u pričvršćivanju cevi krunice. Kod nekih vrsta tri gornja zupca su redukovana na jedan (*Th. caespititus*). Krunica varira od 4 do 10 mm u dužinu i završava se sa jednim gornjim i tri donja lobusa. Ovo je tipična struktura za oprašivanje pčelama ili drugim sličnim insektima. Produkcija polena u četiri prašnika je niska.

Kod populacija iz roda *Thymus* je česta ginodiecija, odnosno da se u populacijama javljaju dva tipa jedinki, one koje imaju hermafroditne cvetove i one sa cvetovima bez prašnika. Pokazano je da oprašivači brže oprašuju ženske cvetove od hermafroditnih.

Plod je merikarpijum koji se raspada na četiri orašice, međutim često neke abortiraju tokom ranih faza razvića.

Ukoliko se ovi svi karakteri posmatraju sa evolutivnog stanovišta, smatra se da su vrste sa ravnim listovima i bez dlaka primitivnije od onih sa revolutnim listovima i trepljama na obodu. Takođe loptičaste cvasti sa cvetovima čije se brakteje razlikuju od ostalih listova smatraju se izvedenijim. Drvenaste vrste sa uspravnim odrvenelim stablima su, verovatno, filogenetski starije od onih sa zeljastim izdancima, odrvenelim samo pri osnovi (Morales, 2002), prikaz evolutivne istorije roda dat je na Slici 1.3.



Slika 1.3. Evolutivni odnosi unutar roda *Thymus*, u zagradama je dat broj vrsta (Morales 2002).

1.3.2 Fitohemijska istraživanja u okviru roda *Thymus*

1.3.2.1 Sastav etarskih ulja

Vrste roda *Thymus*, kao i mnogi drugi predstavnici familije Lamiaceae, su aromatične biljke, žlezdani trihomi na listovima i drugim delovima biljke su bogati monoterpenoidnim etarskim uljima (Thompson, 2002). Najveći broj komponenti etarskih ulja pripadaju grupi monoterpena, čak i do 90%. Seskviterpenska jedinjenja su

uvek prisutna u etarskom ulju kod *Thymus*, međutim, uglavnom u veoma malom procentu. U uljima roda *Thymus* opisano je prisustvo oko 270 terpena. Međutim njihovo samo prisustvo nije dovoljno za karakterizaciju roda već se treba uzeti u obzir i kvantitativni aspekt svake komponente (Stahl-Biskup, 2002).

Prema broju taksona u kojima su zastupljeni, timol i karvakrol su najznačajnije komponente etarskih ulja. Taksoni koji ne sadrže ova fenolna jedinjenja mogu se svrstati u nefenolnu grupu. U okviru fenolne grupe su i taksoni sa bilo timolom ili karvakrolom, bilo i sa jednom i sa drugom komponentom. Osim kod *Thymus*-a ova dva jedinjenja se javljaju u veoma ograničenom broju taksona. Unutar familije Lamiaceae samo neke vrste iz rodova *Coridothymus*, *Origanum*, *Satureja* i *Monarda* imaju timol i karvakrol kao glavne komponente etarskih ulja. U ostatku biljnog sveta samo je kod vrste *Trachyspermium copticum* (Apiaceae) utvrđeno prisustvo ove dve komponente (Stahl-Biskup, 2002).

Prisustvo i visok procenat monoterpenkih ugljovodonika, *p*-cimena i γ -terpinena, ne može se posmatrati nezavisno od prisustva timola i karvakrola, pošto su ova jedinjenja prkursori fenolnih jedinjenja, tako da se ona uglavnom javljaju istovremeno u etarskim uljima, mada ponekad procenat ova dva jedinjenja prelazi procenat prisustva fenola, ovakva ulja se ipak mogu smatrati „fenolnim“ (Stahl-Biskup, 2002).

Linalool je treća komponenta po važnosti u okviru roda *Thymus*. U etarskom ulju kod velikog broja populacija javlja se sa preko 10%. Za razliku od fenolnih komponenti linalol ima slatkast miris i biljke sa dominantnim linalolom imaju sasvim drukčiji karakter. Ovo takođe važi i za geraniol. Linalol je veoma široko rasprostranjena komponenta u biljnom svetu i *Thymus* nije glavni izvor ove komponente već su mnogo značajnija lavanda (*Lavandula angustifolia*), ili muskatna žalfija (*Salvia sclarea*), kao i *Coriandrum sativum* (Apiaceae). Kod nekih vrsta roda *Thymus*, populacije sadrže i fenolne jedinke i linalolne jedinke.

Sa borneolom na šestom mestu po prisutnosti, biciklična monoterpenaska struktura dobija na značaju. Kod taksona kod kojih prelazi 10% uglavnom se nalazi zajedno sa strukturno sličnim monoterpenima, kao što su kamfor i kamfen. 1,8-cineol se nalazi na sedmom mestu. U etarskim uljima često se javlja zajedno sa kamforom i borneolom, i odgovoran je za relativno često prisustvo kamfora koji je čest i u uljima

borneolnog tipa. Eukaliptol (1,8-cineol) je česta komponenta kod predstavnika porodice Myrtaceae, naročito u okviru vrsta roda *Eucalyptus*, ali je takođe glavna komponenta ulja vrste *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). Ostale komponente etarskih ulja nisu prisutne u značajnom broju taksona roda *Thymus*, ipak po značaju se mogu izdvojiti α -terpinil acetat, α -terpineol, geranil-acetat, kamfor, citral (geranial+neral), linalil-acetat, mircen i terpinen-4-ol.

Kako je već navedeno, kod vrsta roda *Thymus* seskviterpenska jedinjenja nisu previše značajna. Najčešći je β -kariofilen koji je prisutan u etarskim uljima mnogih biljnih vrsta. Ovo jedinjenje je registrovano kod određenog broja vrsta *Thymus* u procentu većem od 10%, ali nikada nije registrovan kao glavna komponenta etarskih ulja. Ovo takođe važi i za germakren-D koji je veoma često prisutan u etarskim uljima, ali retko prelazi 10%. Znatno je ređe prisustvo oksigenovanih germakrena koji su uz T-kadinol i nerolidol široko rasprostranjeni kod vrsta *Thymus*-a severne Evrope.

Neterpenoidna alifatična jedinjenja prisutna su u etarskim uljima mnogih vrsta roda *Thymus*, ali u malim procentima. Jedinjenja sa lancem od osam ugljenikovih atoma su najčešće, kao na primer oktanol-3, okten-1-ol-3, oktil-3 acetat i okten-1-il-3 acetat. Odgovarajući heksanski derivati su sledeći po zastupljenosti, a potom nonanski derivati. Uz ova jedinjenja česti su i određena jedinjenja sa razgranatim lancima. Do sada je opisano prisustvo 62 neterpenoidna alifatična jedinjenja u etarskim uljima različitih vrsta roda *Thymus*.

Neterpenoidna aromatična jedinjenja sačinjavaju C_6C_1 -, C_6C_2 - i C_6C_3 -derivati, od kojih su ova poslednja poznata i kao fenilpropanska jedinjenja. Sva zajedno sačinjavaju negde oko 7,8% konstituenta ulja kod *Thymus*. Od ove grupe jedinjenja najznačajnija su izoeugenol i cinamol, pošto se bar kod jedne vrste *Thymus* javljaju sa više od 10%. Sva ostala jedinjenja iz ove grupe se, uglavnom, javljaju u tragovima.

1.3.2.2 Populaciona varijabilnost sastava etarskih ulja

Biljke u okviru iste populacije mogu varirati u odnosu na glavnu monoterpensku komponentu etarskih ulja. U prirodnim populacijama *Th. vulgaris* sa juga Francuske uočeno je prisustvo jednog ili nekoliko od ukupno šest hemotipova. Ovih šest hemotipova dobili su oznaku prema glavnoj komponenti etarskih ulja, geraniol, α -

terpineol, tujanol-4, linalool, karvakrol i timol (Passet, 1971; Vernet i sar., 1986). U populacijama iz Španije nije utvrđeno prisustvo geraniol hemotipa, dok je primećen sedmi hemotip 1,8-cineol (Adzet i sar., 1977a). Neki od ovih hemotipova se mogu prepoznati i na terenu samo na osnovu čula mirisa, što je naročito iskazano kod geraniol tipa, koji ima izražen miris na limun, kao i kod dva fenolna hemotipa koji imaju karakterističan miris timijana, što ih jasno razlikuje od nefenolnih hemotipova.

Prvi opisi varijabilnosti etarskih ulja kod *Th. vulgaris* javili su se ranih šezdesetih godina XX veka (Granger i sar., 1963), a usledile su znatno detaljnije studije u narednih nekoliko godina.

Ekološka uloga sekundarnih metabolita može se podvesti pod tri kriterijuma, adaptacija na abiotičke uslove sredina, kompetitivne interakcije sa drugim biljkama (McPherson i Muller, 1969) i hemijska odbrana od herbivora i patogena (Simeon de Bouchberg i sar., 1976; Bryant i sar., 1991; Shonle i Bergelson, 2000). Jasno je da ovi faktori ne deluju nezavisno jedan od drugog, već je dinamika sekundarnih metabolita uslovljena kombinovanim uticajem abiotičkih i biotičkih faktora sredine.

Postoji određeni dokazi koji pokazuju da varijabilnost monoterpenске komponente može predstavljati adaptivnu strategiju u relaciji sa uslovima sredine (Thompson, 2002). Prvi dokaz adaptivne varijacije predstavlja geografska i lokalizovana distribucija hemotipova kod *Th. vulgaris* u južnoj Francuskoj. Na osnovu podataka dobijenih analizom sekundarnih metabolita združenih uzoraka biljaka iz južne Francuske primećeno je da fenolni hemotipovi (timol i karvakrol) dominiraju u populacijama timijana sa toplih i suvih staništa blizu Sredozemnog mora, dok nefenolni hemotipovi (geraniol, linalol, alfa-terpinol i tujanol-4) dominiraju u populacijama koje su dalje u kopnu, naročito iznad 400m nadmorske visine, to jest, na staništima sa vlažnijom i hladnijom klimom (Passet, 1971; Granger i Passet, 1973). Ovo je potvrđeno ispitivanjem i upoređivanjem učestalosti biljaka svakog hemotipa u 15 populacija od kojih su neke bile sa malih nadmorskih visina (ispod 300m), a neke sa nadmorskih visina preko 400m (Thompson i sar., 2003). Kod populacija koje su rasle preko 400m nadmorske visine nisu pronađene fenolne jedinice.

Prostorni raspored hemotipova kod *Th. vulgaris* javlja se i na manjim područjima, od svega 8x10 km u dolini Martin-de-Londres, u okolini Monpeljea u Francuskoj (Vernet i sar., 1977 a, b; Gouyon i sar., 1986). Ova dolina ima specifičnu

mikroklimu, gde tokom zime temperatura u dolini može biti i nekoliko stepeni niža nego na obroncima brda koja je okružuju. Ovde je na osnovu zbirnih uzoraka biljaka utvrđeno da u dolini dominiraju nefenolni hemotipovi, dok na plićim zemljištima i toplijim mestima na obroncima brda dominiraju fenolni hemotipovi.

U studiji 336 populacija *Th. vulgaris* utvrđeno je prisustvo oko 20% populacija sa samo jednim hemotipom, 165 populacija, ili oko 50%, sa dva hemotipa, od kojih je 72 bilo sa dva nefenolna hemotipa, 69 sa dva fenolna hemotipa, dok je svega 24 populacije sadržavalo jedan fenolni i jedan nefenolni hemotip (Gouyon i sar., 1986). Ovo ukazuje da, iako su populacije sa dva hemotipa česte, one sa nefenolnim i fenolnim hemotipom predstavljaju retkost.

Raspored hemotipova je u korelaciji sa tipom zemljišta na kojem se neka populacija razvija. Fenolne populacije se javljaju na suvljim i plićim zemljištima nego nefenolne populacije koje su vezane za vlažnija i dublja zemljišta. Među nefenolnim hemotipovima utvrđeno je da je α -terpineol hemotip najčešći na najvlažnijim podlogama, dok je, što se fenolnih tiče, karvakrol hemotip najčešći na najsuvljim podlogama, a timolni hemotip nije u toj meri specijalizovan (Gouyon i sar., 1986).

Drugi jasan faktor koji utiče na zastupljenost određenih hemotipova je temperatura. Uočeno je odsustvo fenolnih hemotipova, a naročito karvakrolnog, iz delova staništa koja su izložena temperaturama ispod 0°C. Ovo je moguća posledica što su nefenolne jedinice manje izložene oštećenjima usled niskih temperatura od fenolnih, s obzirom da su fenolna jedinjenja toksičnija od nefenolnih ukoliko dođe do oštećenja ćelija (Thompson, 2002).

Kod populacija različitih vrsta roda *Thymus* sa Balkana, takođe je utvrđeno postojanje različitih hemotipova.

U flori Makedonije opisan je veliki broj taksona ovog roda. Za *Th. albanus* ssp. *albanus* navodi se da je glavna komponenta etarskih ulja (E)-neroldiol, a sledi β -kariofilen (Kulevanova i sar., 1998c), za *Th. jankae*, kod koga su ispitivana tri varijeteta, var. *jankae*, var. *pantotrichus* i var. *patentipilus*, utvrđeno je da je glavna komponenta linalool, a na drugom mestu geranial (Kulevanova i sar., 1998a). Kod *Th. longidens* var. *dassareticus* glavna komponenta je α -terpinil acetate, a slede sa približno istim koncentracijama, α -terpineol, linalool i geraniol (Kulevanova i sar., 1996a). Kod *Th. longidens* var. *lanicaulis* utvrđeno je postojanje dva hemotipa, kod jednoga je glavna

komponenta karvakrol, a kod drugog timol, dok je u oba slučaja drugi po zastupljenosti geraniol (Kulevanova i sar., 1996a). Kod *Th. macedonicus* ssp. *macedonicus* utvrđeno je postojanje hemotipa kod koga je glavana komponenta geraniol (Kulevanova i sar., 1996; 1999), linalool i α -terpinil acetat (Kulevanova i sar., 1999). Glavna komponenta ispitivanog etarskog ulja *Th. moesiacus* iz Makedonije je geraniol (Kulevanova i sar., 1996b), a kod *Th. rohlenae* *p*-cimen (Kulevanova i sar., 1998b). Kod vrste *Th. tosevii* ispitivano je više infraspecijskih takson i utvrđeno postojanje nekoliko hemotipova sa različitim glavnim komponentama etarskog ulja, geraniol, α -terpinil acetat, timol i karvakrol (Kulevanova i sar., 1995; 1996c; 1997).

1.3.2.2 Flavonoidi

Do sada je identifikovan veliki broj biljnih pigmenata, koji su podeljeni u četiri osnovne grupe: flavonoidi, karotenoidi, hinonoidi i betalaini. Flavonoidi su dalje podeljeni na antocijane, žute flavonoide i bezbojne flavonoide (Marin, 1995).

Antocijanini su najznačajnija grupa hemijskih komponenti odgovornih za boju određenog biljnog organa i tkiva. Sa njihovim ispitivanjem je početo u prvoj polovini 20. veka, ali struktura pojedinih antocijanina nije bila potpuno objašnjena te je postojala potreba za ponovnim ispitivanjem. Nakon otkrića da su malonilovani (zwitterionic) antocijanini veoma česti kod Lamiaceae, mnoge vrste su ponovo ispitane (Harborne i Boardley, 1985; Harborne i sar., 1986).

Žuti flavonoidi su odgovorni za žutu boju kod niza biljnih vrsta. Ovo je kompleksna grupa pigmenata koja je dalje podeljena na sledeće grupe: žuti flavonoli, žuti flavoni, halkoni i auron. Poslednje dve grupe poznate su još pod nazivom antohlori. Žuti flavonoli zasnovani su na dve komponente – gosipetinu i kvercetagetinu (Marin, 2003).

Gosipetin i njegovi derivati su, do sada, nađeni u 12 familija cvetnica, a čak su detektovani i kor rastavića (*Equisetum*). Kvercetagetin je nešto manje rasprostranjen, detektovan je kod oko 8 familija. Oba tipa žutih flavonola prisutna su u dve velike familije cvetnica, Asteraceae i Fabaceae (Harborne, 1975).

Najpoznatiji žuti flavoni, koji odgovaraju gore pomenutim flavonolima, su hipolaetin i 6-hidroksiluteolin. Međutim oni su češći u listovima nego u cvetovima.

Glavnina biljnih flavonoida nije direktno obojena, apsorbuju ultraljubičasti deo spektra, i nevidljivi su u vidljivom delu spektra, ali su važni kao kopigmenti antocijaninima (Harborne i Turner, 1984). Najčešći bezbojni flavonoidi su flavonoli i flavoni. Kod predstavnika familije Lamiaceae poznati su sledeći flavonoidi: flavoni, flavonoli, flavanoni, dihidroflavonoli i halkoni (Marin, 1995). Takođe, kod *Origanum vulgare*, utvrđeno je prisustvo i jednog auroana (Barberán, 1986). Halkoni su veoma retki u ovoj familiji (Tomimori i sar., 1984, 1985; Messana i sar., 1990)

Flavoni su glavna grupa bezbojnih flavonoida prisutnih u familiji Lamiaceae. Veoma su česti i aglikoni i glikozidi flavonoida (67-75%) (Marin, 1995). Od ukupno 147 flavonoida koji su identifikovani u familiji Lamiaceae, oko 60% su flavoni (Tomás-Barberán i Gil, 1992).

Verovatno najčešći flavonski aglikon u ovoj familiji je apigenin kao i odgovarajući metil etri (acetatin, hrizoeriol, diosmetin, itd). Jedna od prvih studija flavona listova i petala kod Lamiaceae, navodi luteolin kao glavni flavon kod rodova *Teucrium*, *Mentha*, *Lycopus*, *Salvia*, *Thymus*, *Stachys* i *Lavandula* (Hörhammer i Wagner, 1962).

Neki veoma interesantni i retki flavoni su, izgleda, prisutni kod samo malog broja rodova familije Lamiaceae. Tako su baikalein i skutelarein locirani u korenu i listovima vrsta roda *Scutellaria*, dok kod nekih vrsta *Scutellaria* javlju kao 7-glukoronidi. Kod *Satureja douglasii* je otkriven ksantomikrol. Nakon ovih rezultata Harborne (1967) je saopštio da je ostalo da se utvrdi prisustvo još velikog broja retkih i zanimljivih flavona u ovoj familiji. I zaista, brojni visoko metoksiolovani flavoni su utvrđeni kod raznih vrsta Lamiaceae. Salvigenin kod *Salvia virgata*, sideritoflavon (5,3',4'-trihidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon) kod *Sideritis leucanta*, timonin kod *Tymus vulgaris*, timusin kod *Thymus membranaceus* (Ferrerres i sar., 1985; Barberán, 1986), 5,6-dihidroksi-7-8,3',4'-tetrametoksiflavon kod *Mentha piperita* (Jullien i sar., 1984), 8-metoksicirzilneol kod *Sideritis mugronensis* (Rodriguez 1977). Nepetin (5,7,3',4'-tetrahidroksi-6-metoksiflavon) je prvo detektovan kod *Nepeta*, a potom i kod drugih rodova (*Rosmarinus* i *Salvia*). Flavoni sa oksigenovanim C-6 i C-8 mogu se smatrati karakterističnim za familiju Lamiaceae.

Sideritoflavon je utvrđen i kod drugih rodova, na primer *Thymus*, *Mentha* i *Stachys*, kao i salvigenin kod *Thymus*, *Rosmarinus*, *Ballota*, *Coleus*, itd (Tomás-Barberán i Wollenweber, 1990).

U tribusu *Menthae* (=Saturejeae) prisutne su sledeće komponente: timonin (5,6,4'-trihidroksi-7,8,3'-trimetoksiflavon), timusin (5,6,4'-trihidroksi-7,8-dimetoksiflavon), pebrelin (5,6-dihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon), ladanein (5,6-dihidroksi-7,4'-dimetoksiflavon), 5,6-dihidroksi-7,8,3',4'-tetrametoksiflavon i 5,6-dihidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavon. Ova se jedinjenja kod *Micromeria*, *Satureja* i srodnih vrsta uglavnom nalaze na površini listova rastvorena u terpenoidnom matriksu (Tomás-Barberán i sar., 1988b; Tomás-Barberán i Gil, 1992).

Posmatrajući flavone može se zaključiti da su kod Lamiaceae uglavnom povezani sa šećerima (glikozidi). Najčešća veza između različitih šećera sa flavonskim aglikonima je na 7. mestu. Najčešća komponente su mono-O-glikozidi (glikozidi, glukuronidi i retko ksilozidi, ramnozidi arabinozidi i galaktozidi). Od diglikozida, rutinozidi, soforozidi i alozil (1,2) glikozid (Tomás-Barberán i Gil, 1992) su najčešći.

Flavon C-glikozidi su manje česti u ovoj familiji. Apigenin 6,8-diC-glikozid (vicenin-2) je pronađen kod *Teucrium*, *Origanum* i nekih srodnih rodova (Husain i sar., 1982). Viteksin je identifikovan kod *Majorana hortensis*, luteolin C-glikozid (orienin) kod *Phlomis*, *Ajuga*, *Dracocephalum* i *Majorana* i dva hrizin C-glikozida kod *Scutellaria* (Takagi i sar., 1981).

U literaturi se navodi da flavonol aglikoni čine oko 16%, a flavonol glikozidi oko 10% ukupnih flavonoida kod familije Lamiaceae (Tomás-Barberán i Gil, 1992). Međutim, ispitivanja vrta skoro 50 rodova su pokazala da flavonol aglikoni nisu zastupljeni u toj meri. Utvrđeno je prisustvo kaempferola kod *Origanum vulgare*, izokampferida, retusina ajanina i kumatakenina kod *Salvia glutinosa* (Barberán, 1986), kao i purpurascenina kod *Pogostemon* (Patwardhan i Gupta, 1981), itd.

Kod vrsta familije Lamiaceae pronađeno je nekoliko flavonol glikozida, kvercetin 3-O-glikozid i 3-O-galaktozid kod *Glechoma hederacea* (Barberán, 1986), kao i još neki derivati kvercetina kod drugih vrsta (Harborne, 1967).

Flavanoni se, takođe, pojavljuju kod familije Lamiaceae u formi aglikona (oko 20%) i glikozida (oko 13%).

Flavanon aglikoni su pronađeni kod različitih rodova Lamiaceae, naringenin kod *Micromeria* i srodnih rodova (Bellino i sar., 1980), eriodiktol kod *Mentha* spp. (Burzanska-Hermann, 1978; Marin, 1989).

Kod vrsta *Micromeria*, *Acinos* i *Calamintha* utvrđeno je prisustvo flavanon glikozida kao što je neoponcirin (Bellino i sar., 1980), dok su kod *Mentha* i *Sutellaria* spp. nađeni razni eriodiktiol glikozidi. Takođe, kod *Mentha* spp. i *Hyssopus* je utvrđeno prisustvo hesperetin glikozida (Barberán, 1986).

Dihidro flavonoli i halkoni su retki kod familije Lamiaceae, i kao aglikoni i kao glikozidi. Njihovo prisustvo je utvrđeno kod malog broja vrsta (Barberán, 1986; Venturella i sar., 1980)

Na osnovu veoma obimne literature pokazalo se da su flavonoidi, kao taksonomski markeri, pokazali najbolje rezultate na nivou roda (Marin, 2003), ali se koriste i kod viših i kod nižih nivoa klasifikacije.

Određena populaciona varijabilnost flavonoida je utvrđena kod *Mentha* (Marin, 1989), ali glavne komponente su uvek bile iste u okviru jedne vrste. Kod *Sideritis leucantha* je praćena sezonska dinamika slobodnih flavonski aglikona i utvrđeno je da se njihov sastav tokom sezone ne menja, već samo njihova količina, te da se oni mogu koristiti kao pouzdani taksonomski karakteri (Barberán i sar., 1985).

Kod vrste *Thymus striatus* primećena je varijabilnost u dlakavosti, veličini listova i čašice (Menitsky, 1973). Analizom površinskih flavonoida populacija ove rvrste iz crne Gore, utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u flavonoidnim profilima između populacija, kako različitih po ovim morfološkim karakteristikama, tako i po geografskoj distribuciji (Marin i sar., 2005). Kod većine ispitivanih populacija ksantomikrol je bio glavna komponenta, a kod dva uzorka kod kojih je bio dominantan javljao se u veoma visokom procentu (Marin i sar., 2005).

Horwath i sar. (2008) su proučavali varijabilnost u sastavu površinskih flavonoida 71 populacije vrsta *Thymus hyemalis* i *Th. baeticus*, kao i njihovih putativnih hibrida sa područja Andaluzije u Španiji, i utvrdili prisustvo 22 flavona, 5 flavanona, 2 dihidroflavonola, 1 flavonol i dve nedeterminisane komponente. Većina površinskih flavona je imala 3',4'-oxigenovan prsten za razliku od taksona sa Balkana gde je dominirala 4'-oksigenacija B-prstena tj. derivati apigenina (Marin i sar., 2003). Ova značajna razlika ukazuje da je geografska izolacija dovela do genetičke divergencije

ovih taksona tokom vremena, što za posledicu ima da su vrste ustalile enzimsku konsitituciju koja favorizuje određene flavonoide.

Primećena geografska varijabilnost i distribucija flavonoida ukazuje na značaj ovih sekundarnih metabolita pri adaptaciji biljaka na lokalne uslove u kojima žive (Tomás-Barberán i Gil, 1992), tj. da jedinke *Thymus* iz različitih regiona su razvile specifične fiziološke adaptacije na uslove sredine u kojima žive (Horwath i sar., 2008).

Kod mnogih rodova familije Lamiaceae je utvrđeno postojanje hibrida, a naročito su česti kod *Thymus*, *Mentha*, *Stachys*, *Sideritis*, itd. Postoje čak i hibridi vrsta različitih rodova, kao na primer *Micromeria* i *Calamintha* (Šilić, 1979). Upravo česta hibridizacija i odsustvo morfoloških karaktera po kojima bi se hibridi razlikovali je uzrok mnogih teškoća u taksonomiji ove familije, s toga je moguće tražiti odgovore primenom biohemijske taksonomije.

Analizom sastava vakuolarnih i površinskih flavonoida, primenom HPLC i TLC, utvrđeno je postojanje hibrida između *Sideritis incana* i *S. angustifolia* (Tomas-Lorente i sar., 1989). Hibridi su imali flavonoidni profil karakterističan za roditeljske vrste. Takođe, utvrđena je i korelacija između prisustva žlezda i površinskih flavonoida kod proučavanih taksona. U drugoj studiji pokazano je prisustvo hibrida između simpatričkih vrsta *Sideritis bourgaeana* i *S. serrata* HPLC analizom površinskih i vakuolarnih flavonoida. Hibridi su pokazali prisustvo komponenti koje su karakteristične za roditeljske vrste (Ferrerres i sar., 1989). Navedeni rezultati su pokazali i da su površinski flavonoidi pouzdaniji karakter od vakuolarnih flavonoidnih glikozida za utvrđivanje hibridizacije. Ovo je navelo na zaključak da površinski flavonoidi mogu biti veoma korisni pri rešavanju taksonomskih problema.

Nekoliko ekstenzivnih studija flavonoida ukazuje da su ovi sekundarni metaboliti kod cvetnica najefikasniji u proučavanju taksonomije na nivou roda i unutar roda (Markham i sar., 1970; Swain, 1975; Harborne, 1975, 1977, 1984; Greger, 1978; Gurni i Kubitzki, 1981; Young i Sterner, 1981).

I rodovi u okviru familije Lamiaceae su ekstenzivno proučeni sa aspekta flavonoida. Kod roda *Origanum* i srodnih rodova, pokazano je da se na osnovu prisustva ili odsustva derivata luteolina, hrizoeriola, apigenina i skutelareina ovaj rod može podeliti u šest grupa. Ovo podržava podelu roda na dve sekcije, *Origanum* i *Majorana* (Fernandes i Heywood, 1972; Ietswaart, 1980). Međutim, ovi rezultati niti

podržavaju izdvajanje *Origanum amanum* u zasebnu sekciju, kako je predložio Ietswaart (1980), niti podelu preostalih vrsta, sekcija *Amaracus*, u posebnu sekciju. Takođe, pokazano je da prisustvo apigenin 6,8-di-C- glikozida (vicenin-2) ne zavisi od geografskog položaja, već je prisutan samo kod vrsta iz sekcije *Majorana*, tako da može predstavljati važan taksonomski karakter na nivou sekcija kor roda *Origanum*. Vicenin-2 se pojavljuje i kod vrsta rodova *Hyssopus* i *Thymus* ukazujući na blisku srodnost ova tri roda u okviru tribusa Mentheae.

Rod *Thymus* predstavlja još jedan zanimljiv rod sa aspekta hemotaksonomije. Taksonomski je veoma težak zbog velikog polimorfizma mnogih vrsta, i predloženo je nekoliko reklasifikacija (Jalas, 1972; Morales, 1985). Analizom površinski flavonoida 23 vrste sa Iberijskog poluostrva, registrovano je prisustvo 16 slobodnih flavonskih aglikona (Hernández i sar., 1987). Prikazani rezultati podržavaju podelu roda *Thymus* na dve dobro definisane grupe, koje se mogu tretirati i kao podrodovi, ali je potrebna i potvrda morfoloških karaktera (Hernández i sar., 1987). Uopšteno govoreći, sastav površinskih flavonoida proučavanih vrsta, podržava taksonomsku reviziju roda *Thymus* datu na osnovu morfoloških karaktera (Morales, 1985).

Rezultati proučavanja površinskih flavonoida 40 vrsta i infraspecijskih taksona sa područja Makedonije pokazala su da se ove vrste mogu svrstati u dva flavonoidna profila (Marin i sar., 2003). Prvoj grupi pripadaju vrste sa visokim do umerenim sadržajem površinskih flavonoida koji uključuju flavanone eriodiktiol i naringenin, kao i jedinjenja sa 5,6-dihidroksi-7,8-dimetoksi-, a naročito, 5,6-dihidroksi-7-metoksi substitucijam u A prstenu, pri čemu je 5,6-dihidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavon najprisutnija komponenta u najvećem broju slučajeva. Grupa 2 sadrži vrste sa malom do umerenom količinom površinskih flavonoida, i u kojoj je osim eriodiktiola i naringenina prisutani i metoksilovani flavanoni, kao na primer izosakuranetin. 5,6-dihidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavon i drugi flavoni sa 5,6-dihidroksi-7-metoksi A prstenom uglavnom nisu prisutni u ovoj grupi, s izuzetkom ladaneina koji se kod nekih predstavnika javlja u tragovima. Ove grupe, donekle, odgovaraju podeli na sekcije koje je dao Menitsky (1973). Flavonoidnom profilu grupe 1 pripada pet od osam proučavanih vrsta iz sekcije *Marginati*, podsekcija *Marginati* i pet od sedam ispitivanih vrsta sekcija *Marginati*, podsekcija *Verticillati*. Flavonoidni profil grupe 2 javlja se kod dve vrste iz sekcije *Pseudothymbra*, dok je kod preostale tri proučavane vrste sadržaj

flavonoida izuzetno nizak, te se njihov sastav ne može sa sigurnošću odrediti, kod dve vrste iz sekcije *Serpyllum*, podsekcija *Isolepides*, i kod tri od osam proučavanih vrsta iz sekcije *Marginati*, podsekcija *Marginati*, *Th. jankae*, *Th. albanus* i *Th. balcanus*.

Podela sekcije *Marginati*, podsekcija *Marginati* na dva flavonoidna profila je veoma neočekivana, pošto sve proučavane vrste pripadaju agregatu *Th. praecox*, i neki ih autori smatraju jednom vrstom, međutim u ovoj studiji se pokazalo da *Th. longicaulis*, *Th. rohlenae* i *Th. moesiacus* pripadaju grupi 1, a da *Th. jankae*, *Th. albanus* i *Th. balcanus* pripadaju grupi 2. Ipak, iako obe grupe imaju veoma sličan habitus, postoje morfološke razlike među njima (Marin i sar., 2003). Kod vrsta iz *Th. praecox* agregata sa Iberijskog poluostrva utvrđeno je prisustvo različitih komponenti (Hernández i sar., 1987) u odnosu na one iz Makedonije, ali bi se oni mogli svrstati u flavonoidni profil 2. Kod makedonskih vrsta ovog agregata primećena je razlika ne samo između različitih vrsta ovog agregata, već i među podvrstama i varijetetima iste vrste (Marin i sar., 2003). Kod vrste *Th. pulegioides* takođe je postojala značajna razlika između uzoraka sa Iberijskog i Balkanskog poluostrva. Prema rezultatima Hernández i sar. (1987) *Th. pulegioides* sa Iberijskog poluostrva je, za razliku od makedonskih populacija, pripadao bi profilu grupe 1, a ovi profilu grupe 2. Ovo ukazuje na veoma visoku populacionu varijabilnost ove vrste (Marin i sar., 2003).

Najveći broj vrsta iz podsekcije *Verticillati* pokazuje flavonoidni profil 1, s time da su kod najvećeg broja vrsta iz ove podsekcije prisutna jedinjenja 5,6,4'-trihidroksi-7,3'-dimetoksiflavon i timusin, koji nisu utvrđeni ni kod jedne druge ispitivane vrste iz podsekcije *Marginati*, osim *Th. oehmianus* koji sadržao 5,6,4'-trihidroksi-7,3'-dimetoksiflavon kao glavnu komponentu. Menitsky (1973) razlikuje dva agregata u ovoj podsekciji, agregate *Th. marschlianus* i *Th. glabrescens*, među kojima su morfološke razlike neznatne tako da su tu mnoga taksonomska pitanja otvorena (Marin i sar., 2003).

Iz sekcije *Pseudothymbra* Marin i sar. (2003) su uključili sedam vrsta i u svima, osim *Th. karadzicensis* i *Th. paranassicus*, je detektovana veoma mala količina površinskih flavonoida koji nisu mogli sa sigurnošću biti određeni. Flavonoidni profili kod *Th. karadzicensis* i *Th. paranassicus* su bili slični, karakteristični po prisustvu flavonoida sa 5-hidroksi-6,7,8-trimetoksi supstitucijama u A prstenu i potpunom

odsustvu sa drukčijim A prstenom. Flavanoni eriodiktol i naringenin su, takođe, izgledna odsutni kod ovih taksona.

Kod dve vrste, *Th. pseudoatticus* i *Th. comptus* iz sekcije *Serpyllum*, podsekcija *Isolepides*, utvrđen je flavonoidni profil sličan vrstama iz podsekcije *Pseudothymbra*, s time da su kod *Th. pseudoatticus* bili prisutni i flavoni sa 5-hidroksi-6,7-metoksi supstitucijama u A prstenu, a eriodiktiol i naringenin su bili prisutni kod obe vrste. Takođe, postojale su i određene sličnosti sa flavonoidnim profilima *Th. jankae*, *Th. albanus* i *Th. balcanus* iz sekcije *Marginati*, podsekcija *Marginati* (Marin i sar., 2003).

Iz svega iznetog Marin i sar. (2003) smatraju da je infargenerička klasifikacija od strane Menitskog (1973) bolje podržana rezultatima dobijenim analizom površinskih flavonoida nego ona koju je predložio Jalas (1972).

U nekim slučajevima površinski flavonoidi mogu se koristiti pri odluci kom rodu neki takson pripada. Tako su flavonoidi *Thymbra capitata* (L.) Griseb. proučavanu sa hemotaksonomskog aspekta (Barberán i sar., 1986). Do tada se smatralo da ova vrsta pripada rodu *Thymus*, *Thymus capitatus* (L) Hoffmann i Link, ili *Corydothymus*, *Corydothymus capitatus* (L) Reichenb. fill. Ovi rezultati u kombinaciji sa prethodnim istraživanjima su ustanovili prisustvo nekih zajedničkih flavonoida sa *Thymbra capitata* i time sugerisali da ova vrsta pripada rodu *Thymbra* (Barberán i sar., 1986).

Flavonoidi mogu biti korisni taksonomski markeri i pri određivanju granica između blisko srodnih rodova, kao na primer *Micromeria*, *Calamintha*, *Acinos*, *Satureja* i *Clinopodium* (Marin 1996). Thomas-Barberán i sar. (1988) su pokazali da distribucija 5,6-dihidroksiflavona, koji su izuzetno lipofilni, može biti značajna za razlikovanje blisko srodnih rodova. Takođe, pokazali su da je prisustvo ovih jedinjenja vezano samo za neke rodove podfamilije Nepetoideae i to uglavnom iz tribusa Mentheae. Površinski flavonoidi su kod *Satureja* veoma prikladni hemotaksonomski karakteri na nivou sekcija (Thomas-Barberán i sar., 1991). Uz to, poručavanja vakuolarnih flavonoida kod *Micromeria* su pokazala neophodnost podele ovog roda na sekcije i potvrdila Boisserovu klasifikaciju (1879) na sekcije *Pseudomelissa* i *Eumicromeria*.

Flavonoidi su proučavani i kao taksonomski karakteri i na nivo tribusa, podfamilija i familija kod viših biljaka (Harborne, 1984). Ova grupa jedinjenja je takođe bila analizirana i unutar familije Lamiaceae kao i odnosa ove familije sa srodnim familijama (Verbenaceae, Scrophulariaceae, Boraginaceae, itd). U radovima koji se

bave proučavanjem flavonoida kao taksonomskih karaktera u okviru porodice Lamiaceae, pokazano je da rodovi iz tribusa Mentheae (*Micromeria*, *Acinos*, *Calamintha*, *Origanum*, *Thymus*, *Mentha* i *Satureja*) imaju sličan sastav, naročito, površinskih flavonoida. Vrste iz ovih rodova akumuliraju 5,6-dihidroksi-7,8-dimetoksiflavone koji nisu prisutni u ostalim rodovima iz porodice Lamiaceae (Thomas-Barberán i sar., 1988; Thomas-Barberán i Gill., 1992). Ove se komponente, dakle, mogu smatrati taksonomskim karakteristikama na nivou tribusa, ali treba napomenuti da nisu pronađene kod roda *Clinopodium* koji takođe pripada ovom tribusu.

Takođe, rezultati proučavanja flavonoidnih glikozida su pokazali da su rodovi *Galeopsis*, *Leonurus*, *Ballota*, *Anisomeles*, *Marubium*, *Phlomis*, *Stachys*, *Sideritis* i *Pogostemon* blisko srodni (Thomas-Barberán i Gill., 1992). Vrste iz ovih rodova sintetiziraju ili flavonoid p-kumaroil-glikozid ili 8-hidroksiflavon 7-alozil-glikozid, koji nisu prisutni kod ostalih rodova iz porodice Lamiaceae.

1.3.2.3 Biološka aktivnost sekundarnih metabolita

Vrste roda *Thymus* su veoma značajne i dobro poznate kao lekovite i aromatične biljke, u upotrebi skoro u svim regionima gde rastu. Njihova etarska ulja se dobijaju industrijski putem destilacije. Takođe se koriste i kao ukrasne biljke i dobijen je veliki broj sorti.

Fadli i sar. (2012) su ispitivali antibakterijsku aktivnost etarskih ulja vrsta *Th. maroccanus* i *Th. broussonetii* na bakterijske sojeve otporne na antibiotike i pokazali da etarska ulja obe vrste imaju antibakterijsku aktivnost koja se može povezati sa visokim koncentracijama karvakrola. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja deset biljnih vrsta je ispitivana i na bakterijske sojeve patogene za čoveka i tom prilikom je pokazano da najjaču aktivnost imaju etarska ulja *Th. vulgaris* i *Origanum vulgare* (Soković i sar., 2007), odnosno da su komponente sa najvećom antibakterijskom aktivnošću mentol, timol, a naročito karvakrol. Ovi autori takođe navode da je antibakterijska aktivnost jača protiv Gram-pozitivnih nego Gram-negativnih bakterija. Inhibitorna aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija, kao i antifungalna aktivnost, je pokazana i kod etarskog ulja vrste *Th. algeriensis* kod kojeg su dominirale ne fenolne komponente (Zouari i sar., 2011).

Antifungalna aktivnos etarskih ulja *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* i *Thymus vulgaris* ispitivana je na vrsti *Penicillium expansum* (Nguefack i sar., 2012) pokazano je da najveće dejstvo ima etarsko ulje *Ocimum gratissimum* kod kojeg je glavna komponenta timol. Takođe je primećeno da je antifungalni efekat etarskog ulja *Th. vulgaris* manji nego onaj kod *Cymbopogon citratus*, mada je glavna komponenta etarskog ulja ove vrste citral (neral i geranial), što objašnjavaju prisustvom borneola i bornil-acetata u etarskom ulju kod *Th. vulgaris* što samnjuje aktivnost. Antifungalna aktivnost je ispitivana i kod *Th. zygis* subsp. *sylvestris*, pri čemu je utvrđeno postojanje hemotipovi, kao i da je karvakrolni hemotip imao najjaču antifungalnu aktivnost na dermatofitne sojeve (Gonçalves i sar., 2010). Pri tretmanu gljivične infekcije izazvane dermatomicetama kod laboratorijskih pacova etarsko ulje *Th. vulgaris*, a thimol naročito, su pokazali visoku antifungalnu i terapeutsku aktivnost (Soković i sar., 2008). Soković i sar. (2009) su poređenjem antifungalne aktivnosti etarskih ulja vrsta *Th. tosevii*, *Th. vulgaris*, *Mentha spicata* i *M. piperita*, konstatovali da je ova mnogo izraženija kod etarskih ulja vrsta roda *Thymus*, odnosno da je u zavisnosti od koncentracije fenolnih komponenti.

Etarska ulja imaju i antioksidativnu aktivnost za koju su takođe odgovorne fenolne komponente, timol i karvakrol. Ispitivajem antioksidativne aktivnosti etarskog ulja *Th. pulegioides* metodom gašenja stabilnih slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala i ABTS metodom, utvrđeno je da hemotipovi sa visokom koncentracijom timola i/ili karvakrola imaju jače dejstvo (Ložienė i sar., 2007). Visoka koncentracija karvakrola u etarskom ulju *Th. caramanicus*, takođe, je uslovljavala visoki DPPH inhibitorski potencijal (Safaei-Ghomi i sar., 2009).

Navodni terapeutski efekti mnogih narodnihg lekova mogu biti pripisani prisustvu flavonoida, čiji je farmakološki efekat u vezi sa njihovom inhibicijom odedenih enzima i njihove antioksidativne aktivnosti (Marin, 2003). Pokazano je da ekstrakti *Scutellaria*, *Mentha*, *Nepeta*, *Origanum* i *Thymus* imaju antibakterijska dejstva. Utvrđeno je da flavonoid aglikoni cirsimarin, baikalein i drugi imaju značajna antibakterijska dejstva (Barberán, 1986). Antibakterijska aktivnost je utvrđena za metanolni ekstrakt *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*, a od čistih komponenti, kvercetin 3-*O*- β -D-rutinozid, verbaskozid i naringenin 7-*O*- β -D-glucozid su imali najveću antibakterijsku aktivnost (Rigano i sar., 2007).

Antiviralna aktivnost flavonida je razmatrana u studiji Wang i sar. (1998). Neki od virusa na koje flavonoidi imaju uticaj su herpes simplex virus, respiratorni sincitijalni virus, virus parainfluence i adenovirus. Kvercetin je pokazao da ima i antinfekcijska i antireplikacijska svojstva (Kaul i sar., 1985). Abad i sar. (1997) su analizirali etanolne ekstrakte dvanaest biljnih vrsta i, takođe, utvrdili da neki od njih imaju inhibitorno dejstvo na herpes simplex virus.

Barberán (1986) je u analizi flavonoida porodice Lamiaceae dao i pregled do tada poznatih podataka o antiinflamatornoj aktivnosti flavonoida iz ove porodice. Navedeni su rodovi *Stachys*, *Mosla*, *Sideritis* i *Nepeta*, čije se vrste koriste u te svrhe u narodnoj medicini. Kod ekstrakata tri vrste roda *Salvia* utvrđena je antiinflamatorna aktivnost za koju se smatra da su odgovorni flavonoidi (Çadirci i sar., 2012).

Antioksidativna aktivnost je naročito interesantna u industriji hrane zbog usporavanja oksidativne degradacije lipida. Ekstrakti *Origanum* mogu se koristiti kao antioksidanti s obzirom da sadrže značajnu količinu flavonoida. Luteolin, siderit flavon i 8-metoksicirsineol, mogu se smatrati veoma aktivnim antioksidantima hrane (Marin, 2003). Marinova i Yanishlieva (1996) su analizirale antioksidativnu aktivnost ekstrakata iz odabranih vrsta porodice Lamiaceae i utvrdile da, od ispitivanih vrsta, etanolni ekstrakt *Satureja hortensis* ima najveću aktivnost. Antioksidativna aktivnost je utvrđena i kod vodenog ekstrakta vrsta *Scutellaria immaculata* i *S. ramosissima*, s time da izolovani skutelarin i majčin aktivnost od drugih prisutnih flavonoida (Mamadaliyeva i sar., 2011). Pri *in vitro* ispitivanju antioksidativne aktivnosti ekstrakata 18 vrsta iz porodice Lamiaceae, najjači efekat imali su polarni ekstrakti *Lycopus europaeus*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare* subsp. *virens* and *Lavandula latifolia* (López i sar, 2007).

Sve ovo pokazuje da sekundarni metaboliti imaju široki spektar delovanja koja su u velikoj meri od koristi za čoveka. Od sastava etarskih ulja i od flavonoidnog profila zavisi i spektar biološke aktivnosti, tako da je njihovo poznavanje veoma bitno pri izboru određene biljne vrste za upotrebu u narodnoj i oficijelnoj medicini.

1.3.3 Kariološka, palinološka i mikromorfološka istraživanja vrsta roda *Thymus*

Hromozomi su kod roda *Thymus* veoma sitni (Morales, 2002). Veličina im se kreće od 1 do 2 μm i pod svetlosnim mikroskopom vide se kao tačke. Poznati su sledeći brojevi hromozoma $2n=24, 26, 28, 30, 32, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 84$ i 90, koji odgovaraju diploidnom, tetraploidnom i heksaploidnom nivou. Od osnovnog broja $x=7$, verovatno su nastali sekundarni osnovni brojevi $x=14$ i $x=15$. Najčešći brojevi hromozoma su $2n=28, 30, 56$ i 60. Aneuploidi zauzimaju važno mesto u evoluciji ovog roda i odgovorni su za ostale brojeve.

Polenova zrna u okviru ovoga roda su veoma homogena, uglavnom heksakolpatna i sa supraretikularnom ornamentacijom. Veličina im varira između 21 – 46 μm i P/E između 0,9 i 1,3 (Morales, 1986).

Kod vrsta iz Fmilije Lamiaceae su rađena i ispitivanja mikromorfoloških karaktera, kao što su izgled i građa žlezdanih i nežlezdanih trihoma, kao i skulpturacija orašica.

Kod familije Lamiaceae taksonomski značaj nekih karktera orašica opisan je kod više rodova (Marin, 1996). Kod tribusa Menthae, ispitivanjem vrsta 57 rodova, utvrđeno je značajno variranje u obliku, morfologiji abscisionog ožiljka, distribuciji trihoma i površinskoj skulpturiranosti orašica (Moon i sar., 2009a). Primećeno je pet tipova površine orašica, i ove karakterisitke se mogu korikstiti za filogenetske analize na nivou roda. Özkan i sar. (2009) su ispitivali orašice vrsta roda *Salvia* iz Turske i upoređivanjem oblika, veličine, boje i površinske skulpturiranosti orašica došli do zaključka da su ovi karkter korisni pri razlikovanju grupa vrsta, kao i samih vrsta i podvrsta. Takođe, kod vrsta roda *Nepeta* (Kaya i Dirmenci, 2008) i vrsta roda *Stachys* (Salmaki i sar., ,2008) mikromorfološke karakteristike orašica, naročito spoljašnjaj skulpturiranost, mogu poslužiti kao taksonomski karkteri. Analizom površinskih karaktera orašica kod tribusa Westringieae utvrđeni su, dosta dobro, filogenetski odnosi (Guerin, 2005). Kod vrsta iz roda *Thymus* analizirane su vrste *Th. pulegioides*, iz sekcije *Serpyllum*, i *Th. zygis*, iz sekcije *Thymus*, kao i jedna vrsta ovog roda koja nije bila u potpunosti determinisana (Marin, 1996). Merikarpi kod vrste *Th. pulegioides* i *Th. zygis* su imali različiti tip skulpturiranost. Površina orašica kod *Th. pulegioides* je nepravilno

naborana, bez jasnih struktura. Orašice *Th. zygis* su imale ovalna jasno omeđena polja sa talasastim marginama. Ornamentisanost orašica kod nepotpuno određene vrste je bilo veoma slično vrsti *Th. zygis*. Međutim, Marin (1996) smatra da bi za sigurnije zaključke o značaju ornamentacije orašica u infrageneričkoj klasifikaciji ovog roda trebalo izvršiti šire uzorkovanje.

Moon i sar. (2009b) su utvrdili prisustvo dve grupe trihoma na listovima u okviru tribusa *Menthae*, nežlezdane i žlezdane. Kod nežlendanih su razlikovali unicelularne, uniserijatne i razgranate trihome, dok sus od žlezdanih kod ovog tribusa opisali kapitatne, pilatne i peltatne trihome. Ovi autori smatraju da su mikromorfološki karakteri listova sa taksonomskog aspekta ograničeni na subtribalni nivo, i da za jasniju sliku treba koristiti veći broj karaktera. Kod vrsta *Thymus maly* (Marin i sar., 2008) i *Th. glabrescens* (Dajic Stevanovic i sar., 2008) su takođe opisane glandularne i peltatne trihome, kao i neglandularne trihome.

1.3.5 Molekularna istraživanja

Za dve decenije od kako je opisana, PCR (Polymerase Chain Reaction) je postala skoro sinonim za istraživanja u molekularnoj biologiji. Najveći doprinos PCR metode molekularnoj sistematici je brza amplifikacija pojedinačnih regiona DNK, što omogućuje sekvenciranje redosleda nukleotida.

U početku primene PCR metoda za filogenetske studije kod biljaka najviše se koristio hloroplastni genom, a kasnije su počele da se koriste i nuklearne sekvence DNK (kao na primer ITS i 18S rDNK). U zavisnosti od tksonomskog nivoa koji se proučava, koriste se različiti hloroplastni, nuklearni ili mitohondrijalni regioni DNK (Soltis i Soltis, 2000).

Za filogenetska ispitivanja neki od njačešće korišćenih plastidnih markera su *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, *ndhF*, *matK* i *rps16*. Za filogenetsku analizu i radijaciju u flori Kapske oblasti 73 vrste roda *Moraea* (Iridaceae) korišćeni su markeri *rbcL* egzon, *trnL* intron, *trnL-trnF* intergenski spejser i *rps16* intron (Goldblatt i sar., 2002). Pri ispitivanju filogenetskih odnosa unutar familije Fabaceae Sulaiman i sar. (2003) su koristili *rbcL* dok su Chase i sar. (1993) analizirali filogeniju semenjača na osnovu *rbcL*.

Od nuklearnih molekularnih markera najviše se koriste ITS, 26S rDNK i 18S rDNK. 26S rDNK i 18S rDNK su pogodni markeri za ispitivanje filogenija na višem taksonomskom nivou (Kuzoff i sar., 1998). U redu Cornales je utvrđeno postojanje osam dobro podržanih klada, i to: *Cornus*, *Alangium*, nyssoide (*Nyssa*, *Davidia*, and *Camptotheca*), mastixioide (*Mastixia* and *Diplopanax*), Hydrangeaceae, Loasaceae, *Grubbia-Curtisia*, and *Hydrostachys* (Fan i Qiu-Yun Xiang, 2003). ITS se uglavnom koristi za proučavanje filogenija na nivou rod i vrsta. Tako je, na primer, analizirano monofiletsko poreklo i filogenija roda *Monandra* (Prather i sar., 2002) i divergencija u okviru roda *Cuminia* (Ruiz i sar., 2001).

AFLP markeri (Amplified fragment length polymorphism) su za mnoge taksonome prvi izbor pri odabiru molekularnih markera za rešavanje filogenije na nivou rodova i vrsta u slučaju kada su klade imale radijaciju u bliskoj evolutivnoj prošlosti (na pr. Dixon i sar., 2009; Moghaddam i sar., 2009; Rahimmalek i sar., 2011).

U poslednje vreme pojavio se veliki broj studija koje se bave molekularnom sistematikom podfamilije Nepetoideae, sa fokusom na Ocimeae (Paton i sar., 2004), a naročito Mentheae. Većina se bavila određenim rodovima, kao npr. *Bystropogon* (Trusty i sar., 2004, 2005), *Conradina* (Edwards i sar., 2006, 2008a,b), *Mentha* (Bunsawat i sar., 2004), *Micromeria* (Bräuchler i sar., 2005), *Minthostachys* (Schmidt-Lebuhn, 2007, 2008), *Monarda* (Prather i sar., 2002) i *Salvia* (Walker i sar., 2004; Walker and Sytsma, 2007), dok su neki bili usredsređeni na subtribalni nivo (Bräuchler et al, 2010). Postoje brojne studije koje se bave hemijskim polimorfizmom i biološkim interakcijama kod roda *Thymus* (npr. Horwath i sar., 2008; Rota i sar., 2008; Maksimović i sar., 2008b), ali jako mali broj istraživanja je vršen na molekularnom nivou u okviru ovog roda, i to isključivo na jednoj vrsti (Echeverrigaray i sar., 2001; Trindade i sar., 2008; Trindade i sar., 2009).

1.4. Opis izabranih taksona roda *Thymus*

Thymus balcanus Borb. (Slika 1.4) Stabljike dugačke, puze po zemlji, na krajevima se završavaju sterilnom rozetom listova. Cvetne grane se razvijaju u nizovima duž položenog stabla. Listovi debeli, kožasti eliptični ili loptičasti, 2 do 3 put duži od širine, dugački oko 10 mm, sa razvijenom lisno drškom, na licu goli ili pokriveni

proređenim dugačkim dlakama, bočni nervi na naličiju liske jako istaknuti, debeli, jako lučno savijeni, najčešće se ne spajaju u jedan obodni nerv. Cvetovi složeni na vrhu grana u okruglaste, ređe izdužene cvasti. Cveti od maja do avgusta. Javlja se na kamenjarima, na krečnjaku i serpentinu u planinskom i subalpijskom pojasu. Endemit je Balkanskog poluostrva. Prema Flori Evrope *Th. balcanus* je opisan kao *Th. praecox* subsp. *polytrichus*.



Slika 1.4. *Thymus balcanus*, populacija P25 (Foto I. Šoštarić).

Thymus glabrescens Willd (Slika 1.5) rasprostranjen je u centralnoj i istočnoj Evropi i u Srbiji je veoma česta vrsta, koja uspeva na zatravljenim, osunčanim površinama. Stabljika je prividno puzeća, leži na zemlji, a zatim se izdiže i završava fertilnim izdankom. Cvetne grane su ravnomerno pokriveno stršećim dlakama. Listovi na cvetnim granama izduženo lancetasti ili izduženo eliptični, na vrhu zaobljeni, sa lisno drškom izdvojenom i kratkom, na licu goli, a pri osnovi pokriveni dugačkim trepljama. Od vrha ka osnovi grana listovi se postepeno smanjuju. Cvetovi sakupljeni na vrhu

grana i stabljike u klasolike cvasti. Vrsta je rasprostranjena u centralnoj i istočnoj Evropi.



Slika 1.5. *Thymus glabrescens*, populacija P33 (Foto: D. Stojanović).

Thymus marschallianus Willd. (Slika 1.6) je rasprostranjen u celoj Evropi i na Balkanskom poluostrvu. U Srbiji ova vrsta ima veoma široko rasprostranjenje na livadama, sušnim brežuljcima i pored drumova. Glavno stablo je odrvenelo, uspravno ili se izdiže, završava se cvašću, najčešće sa brojnim fertilnim izdancima, koji su pokriveni stršećim dlakama. Listovi su linearno lancetasti do široko lancetasti ili eliptični, svi iste veličine ili su donji nešto sitniji, goli, samo pri osnovi sa dugačkim trepljama. Cvetovi skupljeni u klasolike cvasti. Prema Flori Srbije, vrsta je rasprostranjena u Evropi i na balkanskom poluostrvu. Flora Evrope ovu vrstu tretira kao deo vrste *Th. pannonicus*.



Slika 1.4. *Thymus marschallianus*, populacija P13 (Foto I. Šoštarić).

Thymus moesiacus Vel. (Slika 1.7) je vrsta sa stabljikom koja je puzeća, jako izdužena, vrhom neprestano raste i zavšava se sterilnom rozetom listova. Nežne cvetne grane se javljaju u nizovima duž položenog stabla iz pazuha listova, dugačke 5 do 8 cm, pokrivenne celom dužinom naniže okrenutim dlakama. Listovi koji se nalaze pri osnovi cvetnih grana, rozetasto su zbijeni, šilasti, mali, dugački svrga 5 do 6 mm i široki oko 1 mm, dok su listovi na sredini i u gornjem delu cvetnih grana veći, objajasti i dugački 11 do 20 mm i široki 2 do 5 mm sa utisnutim sitnim žlezdama. Listovi na stolonama su najčešće veći, ali ne i širi od listova na cvetnim granama. Svi listovi su na licu goli, a vrlo retko pokriveni dlakama. Cvetovi su složeni na vrhu cvetnih grana u kratke okruglaste, ređe nezbatno izdužene, cvasti. Čašica je dugačka oko 3 mm i sa svih strana pokrivena dugačkim, stršećim dlakama. Čašična cev je široko zvonasta, često kraća od čašičnih zubaca. Cvetne drške nisu pokrivenne žlezdama sa drškama. Krunica spolja gola ili skoro gola. Ova vrsta je rasprostranjena na Balkanskom poluostrvu. U Flori Evrope navodi se da je *Th. moesiacus* sinonim za vrstu *Th. longicaulis*.



Slika 1.7. *Th. moesiacus*, populacija P30 (Foto: I. Šoštarić).

Thymus pannonicus All. (Slika 1.8) je biljka sa odrvenelom stabljikom koja donjim delom puzi po zemlji, dok se srednjim i donjim izdiže. Cvetne grane i sterilni izdanci su manje više uspravni. Ceo izdanak je gusto pokriven dlakama, cvetne grane i listovi su sa stršećim dugačkim dlakama. Listovi su linearno lancetasti ili izduženo lancetasti sa razvijenom lisno drškom. Na licu i na naličiju su utisnute subsesilne žlezde.

Cvasti je klasoliko izdužena ili ređe okruglasta i skraćena. Cveta od maja do jula. Ova vrsta se javlja na osunčenim, zatravnjenim staništima. Rasprostranjena je u celoj Evropi, dok se u Srbiji javlja sporadično i to subvar. *griseus*.



Slika 1.8. *Th. pannonicus*, populacija P23 (Foto: I. Šoštarić).

Thymus pulegioides L. (Slika 1.9) je busenasta biljka sa skoro uspravnim stabljikama, ili ove delimično delom leže na zemlji, dok krajevi sa cvastima stoje manje više uspravno. Stolone ili nisu razvijene ili su kratke. Cvetne grane su oštro četvorouglaste, uglovi malo istaknuti, sve do cvasti pokriveni naniže okrenutim dlakama. Stranice su gole. Listovi jajasti, eliptično jajasti, izduženi ili lancetasti. Cvetovi sakupljeni na vrhu cvetnih grana u vršne, izdužene klasolike ili okruglaste cvasti. Čašična cev i zupci na gornjoj usni goli ili pokriveni dlakama, zupci donje čašične usne uvek duž oboda pokriveni trepljama. Ova vrsta ima veoma široko rasprostranjenje. Javlja se u severnoj, centralnoj i jugoistočnoj Evropi.



Slika 1.9. *Th. pulegioides*, populacija P05 (Foto: I. Šoštarić).

Thymus praecox Opiz. je sa stabljikama koje su dugačke, puze po zemlji završavaju se sterilnom rozetom listova. Cvetne grane se razvijaju u nizovima, duž položenog stabla i visoke su 3 do 5 cm, pokrivene stršećim dlakama koje su kraće od prečnika stabljike. Donji listovi cvetnih grana loptičasto okruglasti sa dugačkom lisno drškom, nisu zbijeni u rozete, srednji listovi su jajasti, a gornji jajasto okruglasti, postepeno sve veći, svi sa dobro razvijenom lisno drškom, kožasti na licu goli, bočni nervi na naličiju liske istaknuti, debeli, me ulivaju se u isto tako debeli obodni nerv. Cvetovi su složeni na vrhu cvetnih grana u okruglaste cvasti. Čašica je dugačka oko 4 mm i sa trbušne strane je pokrivena dlakama. Prema Flori Srbije ova vrsta je endemit

Balkanskog poluostrva, dok Flora Evrope navodi da je areal ove vrste znatno širi, od južnih obala Grenlanda, pa sve do jugoistočne Evrope.

1.5 Ciljevi rada

Vrste roda *Thymus* koriste se kao lekovite i aromatične biljke u tradicionalnoj i zvaničnoj medicini u svim krajevima u kojima se javljaju. Aktivne supstance uglavnom su u sastavu etarskih ulja te je poznavanje različitih hemotipova od velikog značaja pri odabiru populacija za kolekcionisanje biljnog materijala.

Pri determinaciji vrsta roda *Thymus* morfološki karakteri često su nedovoljno jasni, tako da se ukazuje potreba za dodatnim karakterima za određivanje vrsta. Shodno tome, analiza površinskih flavonoida i AFLP molekularnih markera poboljšaću uvid u genetičke i evolutivne odnose između populacija vrsta ovog roda sa područja Srbije. Na kraju, na osnovu dobijenih rezultata fitohemijskih i molekularnih istraživanja i utvrđenih srodničkih odnosa između istraživanih vrsta kao model sistema unutar roda *Thymus*, očekuje se i rasvetljavanje određenih taksonomskih pitanja. Dobijeni rezultati treba da ukažu na smernice za dalja taksonomska i filogenetska istraživanja ne samo vrsta iz drugih sekcija roda *Thymus*, nego i srodnih rodova iz tribusa Mentheae, jedne od najznačajnijih, najkompleksnijih i najintrigantnijih grupa familije Lamiaceae.

2. Metrijal i metode

2.1 Fitohemijaska ispitivanja

2.1.1 Biljni materijal

Biljni materijal za fitohemijaska ispitivanja sakupljan je tokom vegetacione sezone 2008. godine sa svojih prirodnih staništa. Spisak vrsta sa lokalitetom i njegovom geografskom dužinom i širinom dat je u tabeli 2.1. Uzorci su determinisani u skladu sa Flora Europaea i Florom SR Srbije. Herbarski uzorci se čuvaju u Herbarijumu Katedre za agrobotaniku Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

2.1.2 Etraska ulja

2.1.2.1 Analiza sastava etrskih ulja

TD-GC-MS sistem se sastojao od an ATD400 termo-desorpcione jedinice, AutoSystem XLGC i TurboMass quadrupole MS (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Oko 3mg vazdušno sušenog biljnog materijala je držano između staklene vune u staklenoj cevi i stavljeno u standardnu desorpcionu cev od nerđajućeg čelika. Uzorak je potom desorbovan 10 minuta na 150°C u toku helijuma od 60 mL/min koji je prolazio do Tenax TA trap (80-100 mesh) držanog na 4 °C bez rascepa ulaza. Nakon desorpcije Tenax trap je grejana na 300 °C u helijumovoj atmosferi na 15 psi sa ispušnim rascepljenim protokom od 18.75 mL/min. Isparljive komponente su propuštane kroz deaktivacionu staklenu kapilarnu liniju na 200 °C na 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm DB-5MS kapilarnu GC kolonu (Agilent J&W, Santa Clara, CA) i hromatografija je bila nastavljena upotrebom temperaturnog programa od 60-300 na 6 °C/min pod pritiskom ATD. MS je bio opremljen EI izvorom koji je radio na 70 eV sa temperaturom izvora od of 180 °C, dok su maseni spektri bili zabeleženi u opsegu m/z 38-600. Operativni

softver je bio Turbomass version 4.1.1. Retencioni indeksi (RI) su bili određeni u relaciji sa serijom n-alkana (C8-C20, Supelco, United Kingdom), dok je integracija pikova bila izvedena do RI 1900 (t.j. pre izlaska palmitinske kiseline). Jedinjenja su određeni upoređivanjem RI i/ili masenog spektra sa literaturnim podacima (Adams, 2001; Ausloos i sar., 1992).

2.1.2.2 Statistička obrada sastava etarskih ulja

U statističku obradu sastava etarskih ulja za svaku podsekciju uključene su komponente koje se u makar jednom uzorku javljaju sa 10 ili više procenata. Kod podsekcije *Alternantes* u analizu je uključeno 5 komponenti etarskih ulja, kod podsekcije *Isolepides* 15 komponenti i kod podsekcije *Pseudomarginati* 10 komponenti (Tabela 2.2).

Korelacije: Na osnovu Pearsonovog korelacijskog koeficijenta izračunate su korelacije između najzastupljenijih komponenti etarskog ulja unutar svake podsekcije upotrebom programa Statistica 8.0 (StatSoft).

Analiza glavnih komponenti: PCA(Principal Component Analysis) je multivarijaciona statistička metoda koja veliki broj korelisanih promenljivih transformise u nekorelisanih skup promenljivih koje se nazivaju glavne komponente. Analiza glavnih komponenti je sprovedena na osnovu najzastupljenijih komponenti etarskog ulja unutar svake podsekcije pomoću programa Statistica 8.0 (StatSoft). Izrađeni su dijagrami, za svaku podsekciju, u kojima je u koordinatnom sistemu tačkama prikazan položaj analiziranih populacija, kao i dijagrami u kojima je tačkama prikazan položaj pojedinih komponenti etarskog ulja.

Klaster Analiza: Na osnovu najzastupljenijih komponenti etarskog ulja izračunata je Euklidska udaljenost između populacija unutar svake podsekcije. Matrica Euklidske udaljenosti korištena je u Analizi skupina (Cluster Analysis) u svrhu izrade dendrograma odnosno utvrđivanja stepena sličnosti među populacijama. Klaster analiza je izvršena neponderisanom metodom za sparivanje skupina na temelju prosečnih vrednosti (Unweighted pair-group method using arithmetic averages; UPGMA). Klaster analiza je izvršena na standardizovanim podacima.

Tabela 2.1. Populacije vrsta roda *Thymus* uključene u fitohemijska ispitivanja.

ThAFLP_No	Vrsta	Podsekcija	Geografska širina (N)	Geografska dužina (E)	Nadmorska visina (m)
P01	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.84	21.68	592
P02	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.88	20.66	473
P03	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.45	21.47	648
P04	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.61	20.55	264
P05	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.38	22.60	1163
P06	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	44.17	21.12	877
P09	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	45.16	19.75	474
P10	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	44.82	21.34	80
P11	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.07	21.38	132
P12	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.29	20.43	84
P13	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.10	21.39	155
P14	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.48	20.34	79
P15	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.16	19.75	474
P33	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.28	20.38	83
P16	<i>Th. marschallianus</i>	<i>Isolepides</i>	45.00	20.89	145
P17	<i>Th. marschallianus</i>	<i>Isolepides</i>	44.90	21.22	114
P18	<i>Th. marschallianus</i>	<i>Isolepides</i>	43.60	21.88	793
P19	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	43.59	21.89	926
P20	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	43.73	21.85	802
P21	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	44.17	21.12	877
P22	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	44.18	22.13	975
P23	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	45.12	21.32	402
P34	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	44.19	22.16	869
P24	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.36	22.58	1491
P25	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.37	22.62	1758
P26	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.27	22.81	1551
P27	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.25	22.81	1454

ThAFLP_No	Vrsta	Podsekcija	Geografska širina (N)	Geografska dužina (E)	Nadmorska visina (m)
P31	<i>Th. moesiacus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.61	20.55	275
P32	<i>Th. praecox</i>	<i>Pseudomarginati</i>	44.18	22.14	1162

Tabela 2.1 Nastavak

Tabela 2.2. Sastojci etarskog ulja uključena u statističku obradu.

Jedinjenje	KI Literaturno	Tip jedinjenja	Podsekcija kod koje je uključena *
α -Pinene	939	Monoterpenski ugljovodonici	I;
Myrcene	991	Monoterpenski ugljovodonici	I; P;
p-Cymene	1025	Ostalo (aromatični ugljovodonik)	A; I;
Limonene	1029	Monoterpenski ugljovodonici	I;
(E)- β -Ocimene	1050	Monoterpenski ugljovodonici	I;
γ -Terpinene	1060	Monoterpenski ugljovodonici	A; I;
Linalool	1097	Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici	I; P;
α -Terpineol	1189	Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici	I;
Thymol methyl ether	1235	Ostalo (fenolni etar)	I;
Neral	1238	Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici	I; P;
Geraniol	1253	Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici	A;
Linalyl acetate	1257	Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici	P;
Geranial	1267	Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici	I; P;
Thymol	1290	Ostalo (fenol)	A; I;
Carvacrol	1299	Ostalo (fenol)	A; I;
alpha-Terpinyl acetate	1349	Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici	P;
Neryl acetate	1362	Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici	P;
(E)-Caryophyllene	1419	Seskviterpenski ugljovodonik	I; P;
Germacrene-D	1485	Seskviterpenski ugljovodonik	I;
Bicyclogermacrene	1500	Seskviterpenski ugljovodonik	P;
(E)-gamma-Bisabolene	1531	Seskviterpenski ugljovodonik	I; P;

* A – *Alternantes*; I – *Isolepides*; P- *Pseudomarginati*;

2.1.3 Površinski flavonoidi

2.1.3.1 Ekstrakcija površinskih flavonoida

Za analizu je korišćeno 0.5g vazdušno sušenih, celih listova su bili potopljeni u 10ml dietil etra i ostavljeni na sobnoj temperaturi preko noći. Dietil etar je filtriran i ostavljen da ispari u digestoru. Suvi ostatak je zatim rastvoren u 80% MeOH, filtriran i prebačen u autosampler HPLC vijalu.

2.1.3.2 Analitički HPLC sa diodnom UV detekcijom (LC-DAD)

HPLC sistem se sastojao od Waters LC 600 pumpe i 996 fotodiodnim UV detektorom. Korištene su kolone Merck LiChrospher 100RP-18 (5 μ m), 4.0 mm (i.d.) \times 250 mm. Gradijentni profili su bili zasnovani na dva rastvarača, 2% vodenim HOAc i MeOH–HOAc–H₂O, 18:1:1. Početni uslovi su bili 75% vodenog rastvarača i 25% metanolnog rastvarača. Proporcija ovog drugog rastvarača je rasla sa linearnim gradijentom, dostižući 100% sa $t=20$ min. Posle ovoga je sledila izokratska elucija 100% metanolnog rastvarača do $t=25$ min, nakon čega se program vraćao na početni odnos rastvarača. Temperatura kolone je održavana na 30°C, a protok na 1.0 ml min⁻¹. Injekcije (40 μ l) su vršene autosamplerom.

2.1.3.3 HPLC sa hemijski jonizujućom masenom spektrometrijom na atmosferskom pritisku (LC-APCI-MS)

LC-MS analiza je izvedena na sličan način kao i analitička HPLC metoda, s tim što je koncentracija sirćetne kisleine u mobilnim fazama bila 1%. Maseni spektri su snimljeni kvadrupol – jonska zamka masenim spektrometrom (ThermoFinnigan LCQ 'classic') sa hemijskim jonizacionim izvorom pri atmosferskom pritisku (APCI) u pozitivnom modu. Temperatura grejača jonske probe je bila 550 °C, pritisci gasa pri direktnom i kružnom protoku kroz jonsku probu iznosili su 80 i 20 psi, respektivno, temperatura kapilare 150 °C, a jačina jonizacione struje je bila 5 μ A. Masenim

spektrometrom je upravljano preko programa Xcalibur 1.2 (ThermoFinnigan). Spektri su snimani u opsegu 125 – 500 m/z. Najobilniji joni u svakom spektru su izdvojeni u jonskoj zamci (širina izolovanja od 5 amu) i zatim podvrgnuti kolizionoj disocijaciji (CID) primenom kolizione energije od 45% (bez energije aktivacije). CID spektri koeluirajućih komponenti su zabeleženi automatski dinamičkim isključivanjem bez prethodnog poznavanja njihovih molekulskih masa.

2.2 Molekularna ispitivanja

2.2.1 Biljni materijal

Biljni materijal za molekularna ispitivanja sakupljan je tokom vegetacione sezone 2008. godine sa svojih prirodnih staništa. Spisak vrsta sa lokalitetom i njegovom geografskom dužinom i širinom dat je u tabeli 2.3. Uzorci su determinisani u skladu sa Flora Europaea i Florom SR Srbije. Herbarski uzorci se čuvaju u Herbarijumu Katedre za agrobotaniku Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Tabela 2.3. Vrste i populacije roda *Thymus* uključene u AFLP analizu.

Poulacija	Vrsta	Podsekcija	Geografska širina (N) #	Geografska dužina (E)	Broj uzoraka.
P01	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.84	21.68	3
P02	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.88	20.66	3
P03	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.45	21.47	3
P04	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.61	20.55	3
P05	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.38	22.60	2
P06	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	44.17	21.12	3
P07	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	43.19	22.14	3
P08	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	44.26	19.89	3
P09	<i>Th. pulegioides</i>	<i>Alternantes</i>	45.16	19.75	2
P10	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	44.82	21.34	2
P11	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.07	21.38	3
P12	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.29	20.43	3
P13	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.10	21.39	3
P14	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.48	20.34	2
P15	<i>Th. glabrescens</i>	<i>Isolepides</i>	45.16	19.75	3
P16	<i>Th. marschallianus</i>	<i>Isolepides</i>	45.00	20.89	3
P17	<i>Th. marschallianus</i>	<i>Isolepides</i>	44.90	21.22	2
P18	<i>Th. marschallianus</i>	<i>Isolepides</i>	43.60	21.88	3
P19	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	43.59	21.89	2
P20	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	43.73	21.85	3
P21	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	44.17	21.12	1
P22	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	44.18	22.13	2
P23	<i>Th. pannonicus</i>	<i>Isolepides</i>	45.12	21.32	3
P24	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.36	22.58	1
P25	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.37	22.62	2
P26	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.27	22.81	3
P27	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.25	22.81	3
P28	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	44.17	21.12	3
P29	<i>Th. balcanus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	44.17	21.12	2
P30	<i>Th. moesiacus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.88	20.66	3
P31	<i>Th. moesiacus</i>	<i>Pseudomarginati</i>	43.61	20.55	3
P32	<i>Th. praecox</i>	<i>Pseudomarginati</i>	44.18	22.14	3

2.2.2 Ekstrakcija DNA i AFLP analiza

Totalna genomska DNA je ekstrahirana iz 20mg suvih listova sušenih u silika gelu upotrebom DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®). Koncentracija DNA je merena upotrebom Qubit Fluorometer (Invitrogen®). AFLP je izveden u skladu sa protokolom kako su ga opisali Vos et al. (1995), ali uz nekoliko modifikacija. Restrikciona digestija i ligacija adaptera su vršene simultano na 200ng genomske DNA u totalnoj zapremini

33 μ l u trajanju od 2 sata na 37°C, a potom 14 sati na 23°C. Restrikciona digestija i ligacija adaptera, preamplifikacija i selektivna amplifikacija su izvođene na GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems[®]). Za amplifikaciju je izabrano osam kombinacija prajmera, i to:

- FAM-*EcoRI*ACA+*Tru1*ICAG,
- NED-*EcoRI*AGC+*Tru1*ICGG,
- VIC-*EcoRI*ACGC+*Tru1*ICAG,
- PET-*EcoRI*ATG+*Tru1*ICGG,
- FAM-*EcoRI*ACT+*Tru1*ICAG,
- NED-*EcoRI*AGC+*Tru1*ICAG,
- VIC-*EcoRI*ACG+*Tru1*ICGA i
- PET-*EcoRI*ACC+*Tru1*ICGA.

Pripremljeni uzorci su detektovani pomoću ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®]). Prisustvo ili odsustvo fragmenata je zabeleženo sa GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems[®]). Svi fragmenti između 50 i 500 bp su zabeleženi. Dobijeni pikovi su automatski prebačeni u binarni matriks. Ukoliko je pik prelazio apsolutnu vrednost od 50, prema automatskom podešavanju donje granice amplitude GeneMapper 4.0, pik je bio registrovan kao prisutan (1), a u suprotnom kao odsutan (0).

2.2.3 Analiza podataka

Šenonov informacioni indeks kao mera diverziteta AFLP unutar vrste je računat kao $H_j = -\sum (p_i \log_2 p_i)$, gde je p_i fenotipska frekvencija (Lewontin, 1972). Šenonov indeks je korišćen i za izražavanje totalnog diverziteta (H_t) kao i za prosečni intraspecijski diverzitet (H_{sp}) i proporciju diverziteta unutar (H_{sp}/H_t) i među vrstama $[(H_t - H_{sp})/H_t]$.

Analiza molekularne varijanse (AMOVA; Excoffier et al., 1992) je sprovedena na Nei i Lievoj matrici udaljenosti među jedinkama upotrebom Arlequin ver. 2.000 (Schneider et al., 2000).

Dvosmerna AMOVA je korišćena da bi se totalna varijansa raščlanila među vrstama, među populacijama unutar vrsta i unutar populacionih komponenti. Dodatne jednosmerne AMOVA-e su sprovedene da bi se totalna varijabilnost raščlanila na, među i unutar populacionu komponentu svake vrste *Thynus* (osim *Th. praecox* kod kojega je ispitivana samo jedna populacija).

Komponentne varijanse su testirane statistički neparametarskim nasumičnim testom uz upotrebu 10.000 permutacija. Međusobno poređenje vrsta pomoću AMOVA-e rezultovalo je sa ϕ_{ST} vrednostima koje su ekvivalentne totalnoj varijansi koja je podeljena između dve vrste i može biti interpretirana kao prosečna međuspecijska udaljenost između bilo koje dve vrste (Huff, 1997).

Klaster analiza zasnovana na Nei i Lijevoj matrici rastojanja između individual je izvedena upotrebom Neighbour Joining metoda (Saitou i Nei, 1987) primenom TREECON for Windows ver. 1.3 b (Van de Peer i De Wachter, 1994). Bootstrap analiza je izvršena na 1000 bootstrap uzoraka (Felsenstein, 1985).

Modelno zasnovan klusterski metod je primenjen na multilocus AFLP podatke da bi se dobila genetska struktura i odredio broj klastera u skupu podataka upotrebom softvera STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Za datu vrednost broja klastera, ovaj metod pridružuje pojedinačne genotipove iz ukupnog uzorka klasterima na takav način da neuravnoteženost povezivanja (LD) bude najbolje objašnjena. Za svaku vrednost K izvršeno je 10 prolaza uzimajući broj klastera (K) od 1 do 10. Svaki prolaz se sastojao od burn-in perioda od 20.000 koraka, posle čega je izvršeno 10^5 MCMC (Monte Carlo Markov Chain) replikacija uz pretpostavku admixture modela i korelacije alelskih frekvencija. Nisu korišćene nikakve prethodne informacije za definisanje klastera. Izbor najverovatnijeg broja klastera (K) izvršen je upoređivanjem prosečnih procena sličnosti podataka $\ln[\Pr(X|K)]$, za svaku vrednost K (Pritchard et al. 2000), kao i izračunavanjem ad hoc statistike ΔK , zasnovane na stopi promene logaritma verovatnoće podataka za uzastopne vrednosti K, kako je opisano u Evanno et al. (2005).

3. Rezultati

3.1 Fitohemijaska ispitivanja

3.1.1 Etarska ulja

U etarskim uljima ispitivanih populacija roda *Thymus* sa područja Srbije utvrđeno je prisustvo ukupno 103 jedinjenja, dok se učešće determinisanih jedinjenja kretalo od 88.98% kod *Th. praecox* (**P32**) do 99.47% kod *Th. glabrescens* (**P13**).

Najbrojnija grupa jedinjenja, sa ukupno 39 detrerminisanih komponenti, su seskviterpenski ugljovodonici. Nakon njih po brojnosti dolaze oksigenovani monoterpenski ugljovodonici, sa ukupno 30 jedinjenja, i monoterpenski ugljovodonici sa 17 jedinjenja. Osim toga, u sastav etarskih ulja ispitivanih vrsta roda *Thymus*, ulaze i 4 aromatična ugljovodonika, 3 oksigenovana seskviterpenaska ugljovodonika, 3 fenolna jedinjenja, 3 nezasićena alkohola, 2 fenolna etra i po 1 nezasićeni alkohol i keton.

3.1.1.1 Sastav etarskih ulja *Thymus pulegioides*

Kod sedam ispitivanih populacija vrste *Th. pulegioides* utvrđeno je prisustvo 73 komponente u etarskim uljima, i to 16 monoterpenskih ugljovodonika, 18 oksigenovanih ugljovodonika, 26 seskviterpenskih ugljovodonika i 12 jedinjenja koja ne pripadaju ni jednoj od tri glavne grupe (Tabela 3.1) . Kod populacije **P02** determinisana je ukupno 41 komponenta, kod populacije **P05** i populacije **P01** 39 komponenti, kod populacije **P06** 38 komponenti, kod populacije **P03** 32 komponente, kod populacije **P04** 30 i kod populacije **P09** 26 komponenti.

Monoterpenski ugljovodonici: U etarskim uljima ispitivanih populacija *Th. pulegioides* identifikovano je prisustvo 16 monoterpenskih ugljovodonika. Učešće ove grupe jedinjenja kretao se od 0,86%, kod populacije **P06**, do 27,01%, kod populacije **P02**. U etarskim uljima populacije **P06** od 10 jedinjenja iz ove grupe ni jedno nije imalo

značajnu zastupljenost, što je bio slučaj i kod populacija **P01** (11 jedinjenja, 0,95%), **P04** (11 jedinjenja, 3,44%), **P03** (12 jedinjenja, 1,21%), **P09** (8 jedinjenja, 2,64%) i **P05** (13 jedinjenja, 6,56%). Kod populacije **P02** pojedinačno je jedino γ -terpinen imao koncentraciju od 21,39%.

Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici: Učešće ove grube jedinjenja u etarskim uljima ispitivanih populacija se kretalo od 0,27%, kod populacije **P04**, pa do 88,60% kod populacije **P03**. Koncentracija oksigenovanih monoterpenskih ugljovodonika je bila visoka i kod populacija **P06** (87,47%) i **P01** (87,32%). Kod ove tri populacije najzastupljenija komponenta etarskih ulja bio je geraniol sa 87,92% kod populacije sa **P03**, 87,12% kod populacije **P01** i 86,97% kod populacije **P06**. U preostalim populacijama ni jedno iz ove grupe jedinjenja nije bilo zastupljeno u značajnijem procentu.

Seskviterpenski ugljovodonici: Ova grupa jedinjenja nije bila značajnije zastupljena u etarskim uljima ni jedne ispitivane populacije. Kod populacije **P06** 17 jedinjenja činilo je ukupno 8,93%, kod populacije **P01** 19 jedinjenja činilo je ukupno 8,48%, kod populacije **P02** 12 jedinjenja činilo je ukupno 7,53%, kod populacije **P03** 10 jedinjenja činilo je ukupno 6,50%, kod populacije **P04** 7 jedinjenja činilo je ukupno 6,27%, kod populacije **P05** 10 jedinjenja činilo je ukupno i kod populacije **P09** 3 jedinjenja činilo je ukupno 3,69%.

Ostala jedinjenja: Kod ispitivanih populacija *Th. pulegioides* utvrđeno je prisustvo 12 jedinjenja koja ne pripadaju ni jednoj od gore pomenutih grupa. Timol, koji je fenolno jedinjenje je glavna komponenta u etarskim uljima populacija **P02** sa 52,95% i u etarskim uljima populacije **P05** sa 62,92%. Timol je značajno zastupljen i kod populacije **P09** sa 22,12%. Cimen, koji je aromatični ugljovodonik, je glavna komponenta etarskih ulja kod populacije **P09** sa 48,59% i **P04** sa 42,59% kod koje je značajno zastupljeno i fenolno jedinjenje karvakrol sa 39,95%. U etarskim uljima populacija **P03**, **P01** i **P06** ova jedinjenja nisu značajno zastupljena.

3.1.1.2 Sastav etarskih ulja *Thymus glabrescens*

Kod sedam ispitivanih populacija *Th. glabrescens* u etarskim uljima je determinisano ukupno 73 jedinjenja, koja se mogu svrstati u tri osnovne grupe jedinjenja, monoterpeni ugljovodonici, sa 17 jedinjenja, oksigenovani monoterpeni ugljovodonici, sa 12 jedinjenja, i seskviterpeni ugljovodonici, sa 31 jedinjenjem. Takođe, utvrđeno je i prisustvo 11 jedinjenja koja ne pripadaju ni jednoj od ovih grupa (Tabela 3.2). Etarska ulja populacije **P10** imala su 53 determinisane komponente, kod populacije **P13** 47, kod populacije **P11** 41, kod populacije **P33** 34, kod populacije **P12** 50, kod populacije **P14** 41 i populacije **P15** 31 komponenta.

Monoterpeni ugljovodonici: Kod ispitivanih populacija ove vrste determinisano je bilo 17 monoterpenih ugljovodonika i njihova zastupljenost se kretala od 3,04% kod populacije **P33** do 37,08% kod populacije **P15**. U etarskim uljima populacije **P10** utvrđeno je prisustvo 15 monoterpenih ugljovodonika (17,25%) i jedino je γ -terpinen prisutan u značajnijoj koncentraciji od 11,91%. Kod populacije **P13** 13 jedinjenja iz ove grupe činilo je ukupno 14,02% etarskih ulja, a γ -terpinen je jedino jedinjenje sa značajnijom koncentracijom od 10,67%. Kod populacije **P11** determinisano je 16 komponenti iz ove grupe koje su činile 6,95% etarskih ulja, pri čemu ni jedna komponenta nije imala značajniji procenat. Etarska ulja populacije **P33** sadržala su 11 monoterpenih ugljovodonika, koja su učestvovala sa 3,04%. U etarskim uljima populacije **P12** utvrđeno je prisustvo 14 jedinjenja iz ove grupe koja su činila 27,22%, pri čemu je γ -terpinen bio zastupljen sa 19,61%. Kod populacije **P14** od 11 monoterpenih ugljovodonika, koji su činili ukupno 18,55%, γ -terpinen je bio najzastupljeniji sa 13,25%. U etarskim uljima populacije **P15** 13 monoterpenih ugljovodonika činilo je 37,08% i γ -terpinen je bio druga po zastupljenosti komponenta sa 31,26%.

Oksigenovani monoterpeni ugljovodonici: U etarskim uljima ispitivanih populacija *Th. glabrescens* utvrđeno je prisustvo ukupno 12 oksigenovanih monoterpenih jedinjenja čija se zastupljenost kretala od 1,38%, kod populacije **P13** (6 jedinjenja) do 7,06% kod populacije **P12** (8 jedinjenja). Ni jedno jedinjenje iz ove grupe nije imalo značajne procese, Kod populacije **P10** 8 jedinjenja iz ove grupe činilo je ukupno 3,33%, kod populacije **P11** 4 jedinjenja iz ove grupe činila su 6,66%, kod

populacije **P33** 4 jedinjenja činila su 2,54%, kod populacije **P14** 7 jedinjenja činilo je 4,93% i kod populacije **P15** 4 jedinjenja ukupno 1,54%.

Seskviterpenski ugljovodonici: Determinisano je ukupno 31 jedinjenje koje pripada ovoj grupi i njihova se zastupljenost kretala od 5,06%, kod populacije **P11** (11 jedinjenja) do 10,10% kod populacije **P13** (19 jedinjenja). U etarskim uljima ni jedne populacije pojedinačna jedinjenja iz ove grupe nisu imala značajniji procenat. U etarskim uljima populacije **P10** 18 seskvi terpenskih ugljovodonika činilo je 5,24%, kod populacije **P33** 10 jedinjenja činilo je 7,27%, kod populacije **P12** 19 jedinjenja činilo je 9,82%, kod populacije **P14** 13 jedinjenja činilo je 6,85% i kod populacije **P15** 7 jedinjenja činilo je 6,06%.

Ostala jedinjenja: Kod ispitivanih populacija *Th. glabrescens* utvrđeno je prisustvo 13 jedinjenja koja ne pripadaju ni jednoj od gore pomenutih grupa. Timol, koji je fenolno jedinjenje je glavna komponenta u etarskim uljima populacija **P10** (56,29%), **P13** (64,51%), **P11** (61,94%) i **P15** (44,53%). Cimen, koji je aromatični ugljovodonik, je glavna komponenta etarskih ulja kod populacije **P33** (75,76%) i kod populacije **P14** (42,56%). Populacija **P14** ima takođe i visoko učeše timola u etarskim uljima od 16,56%. Etarska ulja populacije **P12** sadrže 19,02% timola, 18,43% cimena i 13,11% timol metil etra.

3.1.1.3 Sastav etarskih ulja *Thymus marschallianus*

Kod tri ispitivane populacije vrste *Th. marschallianus* ustanovljeno je prisustvo ukupno 65 komponenata etarskih ulja. Prisutne su bile tri glavne grupe jedinjenja, monoterpenski ugljovodonici, sa 17 jedinjenja, oksigenovani monoterpenski ugljovodonici, sa 11 jedinjenja, i seskviterpenski ugljovodonici, sa 27 jedinjenja (Tabela 3.3). U etarskim uljima populacije **P16** bilo je determinisano 45 komponenti, kod populacije iz Gtrebenca 53 komponente, a kod populacije **P18** 44 komponente.

Monoterpenski ugljovodonici: U etarskim uljima ispitivanih populacija *Th. marschallianus* je utvrđeno prisustvo 17 monoterpenskih ugljovodonika. Njihova se zastupljenost kretala od 7,49% kod populacije **P17** do 20,04% kod populacije **P16**. U etarskim uljima populacije **P17** bilo je prisutno ukupno 11 monoterpenskih ugljovodonika, i jedino je silvestren imao značajniju koncentraciju od 3,75%. Kod

etarskih ulja populacije **P18** od 11 monoterpenskih ugljovodonika činili su zajedno 14,38% i samo je α -pinen bio prisutan u značajnom procentu (11,29%). Kod populacije **P16** bilo je prisutno 14 monoterpenskih ugljovodonika, pri čemu su (E)- β -Ocimen (9,75%) i mircen (4,75%) imali značajne koncentracije.

Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici: Kod populacija *Th. marschallianus*, obuhvaćenih ispitivanjem, utvrđeno je prisustvo 11 oksigenovanih monoterpenskih ugljovodonika čija se zastupljenost kretala od 3,58% kod populacije **P16** do 8,42% kod populacije **P17**. U etarskim uljima populacije **P17** od ukupno 9 jedinjenja iz ove grupe ni jedno nije imalo neku značajniju koncentraciju, što je bio slučaj i od ukupno 6 jedinjenja kod populacije **P16** tj. 7 kod populacije **P18**.

Seskviterpenski ugljovodonici: U etarskim uljima kod ispitivanih populacija *Th. marschallianus*, ova grupa jedinjenja je bila najzastupljenija. Prisustvo seskviterpenskih ugljovodonika se kretalo od 64,04%, kod populacije **P16**, do 79,98%, kod populacije **P18**. Kod populacije **P17** bio je 67,50%. Kod populacije **P16** konstatovano je prisustvo 18 komponenti iz ove grupe i germakren-D je imao koncentraciju od 34%, a biciklogermakren 12,30%. Kod populacije **P17** determinisano je 24 seskviterpenska ugljovodonika i germakren-D je bio zastupljen sa 20,40%, a značajnu koncentraciju je imao i (E)-kariofilen sa 14,57%. Kod populacije **P18**, determinisano je 20 jedinjenja iz ove grupe i germakren-D je bio glavna komponenta sa zastupljenošću od 66,66%.

Ostala jedinjenja: Kod tri ispitivane populacije *Th. marschallianus*, utvrđeno je prisustvo ukupno 10 jedinjenja koja nisu pripadala ni jednoj od prethodnih grupa. Ova jedinjenja su bila zastupljena u malom procentu kod sve tri populacija, od 1,82%, kod populacije **P18** do 8,52% kod populacije **P17** i 5,32% kod populacije **P16**.

3.1.1.4 Sastav etarskih ulja *Thymus pannonicus*

Kod šest ispitivanih populacija vrste *Th. pannonicus* ustanovljeno je prisustvo ukupno 78 komponenata etarskih ulja. Prisutne su bile tri glavne grupe jedinjenja, monoterpenski ugljovodonici, sa 15 jedinjenja, oksigenovani monoterpenski ugljovodonici, sa 18 jedinjenja, i seskviterpenski ugljovodonici, sa 32 jedinjenja (Tabela 3.4). Etarska ulja populacije **P21** sadržala su ukupno 40 komponenti, populacija iz

Vršca, **P19** i Ponorišta sadržala su ukupno 41 komponentu, a kod populacija **P20** i **P22** 49 komponenti.

Monoterpenški ugljovodonici: Kod populacija *Th. pannonicus* utvrđeno je prisustvo 15 različitih monoterpenških ugljovodonika i njihova procentualna zastupljenost u etarskim uljima se kretala od 0,49% kod populacije iz Vršca do 59,39% kod populacije **P19**. U uljima populacije **P23** determinisano je 9 jedinjenja iz ove grupe i sva su bila u koncentracijama ispod 1%. Kod populacije **P19** u etarskim uljima je bilo prisutno 14 monoterpenških jedinjenja i ona su predstavljala glavnu grupu jedinjenja sa 59,39%. Među njima najveću koncentraciju imao je α -pinen sa 19,90%, a slede ga (E)- β -ocimen (14,24%) i limonene (12,45%). 14 monoterpenških ugljovodonika sačinjavali su 32,45% etarskih ulja kod populacije **P19**, α -pinen je činio 13,88%, dok su miceren i (E)- β -ocimen činili 7,56% i 5,61%. Ostale komponente nisu prelazile 5%. U etarskim uljima **P22**, prisutno je bilo 13 monoterpenških ugljovodonika i ova grupa jedinjenja je činila 35,33% od ukupnog sastava, s time da je limonene predstavljao 24,82% a (E)- β -ocimen 6,56%, dok ostale komponente nisu prelazile ni 1%. Kod populacije **P21** u etarskim uljima nalazilo se 14 monoterpenških ugljovodonika, koji su zajedno činili 7,93%, pri čemu ni jedna komponenta nije prelazila 5%. Kod populacije **P34** prisutno je bilo 13 jedinjenja iz ove grupe, koja su zajedno činila 35,14% ukupnih etarskih ulja, od kojih je samo miceren (25,85%) imao značajnu koncentraciju.

Oksigenovani monoterpenški ugljovodonici: Kod ispitivanih populacija *Th. pannonicus* utvrđeno je prisustvo 18 oksigenovanih monoterpenških ugljovodonika i njihova koncentracija se kretala od 2,58% kod populacije **P20** do 88,14% kod populacije **P23**. Kod populacije **P23** nalazilo se 11 oksigenovanih monoterpenških ugljovodonika i ovo je bila glavna grupa jedinjenja u etarskim uljima ove populacije, pri čemu izuzetno visoku koncentraciju su imali neral i geranijal, sa 34,05% odnosno 51,74%. Ostala jedinjenja iz ove grupe nisu prelazila 1%. U etarskim uljima populacije **P19** prisutno je bilo 5 jedinjenja iz ove grupe i jedino 1, 8-cineol (8,21%) i kamfor (7,58%) su imali značajnije koncentracije. Kod populacije **P20** ovoj grupi jedinjenja je pripadalo 5 komponenti koje su zajedno činile 2,58% etarskih ulja, pri čemu ni jedna komponenta nije dostizala niti 1%. U etarskim uljima populacije **P22** konstatovano je prisustvo 9 jedinjenja iz ove grupe i jedino je 1, 8-cineol imao značajniju koncentraciju od 5,65%. Kod populacije **P21** ova grupa jedinjenja je bila predstavljena sa 7

komponenti i sa zastupljenošću od 75,61% predstavljala je glavnu grupu jedinjenja. Linalool je bio prisutan u koncentraciji od 66,06% i jedino je jos kamfor bio prisutan u značajnijoj koncentraciji od 6,01%. 5 oksigenovanih monoterpenskih ugljovodonika činili su 23,83% etarskih ulja kod populacije **P34**, pri čemu je jedino α -terpineol bio u značajnoj koncentraciji (20,01%).

Seskviterpenski ugljovodonici: U etarskim uljima etarskim uljima ispitivanih populacija *Th. pannonicus* utvrđeno je prisustvo 32 seskviterpenska ugljovodonika i njihovo učešće se kretalo od 1,85% kod populacije **P23** do 58,17% kod populacije **P20**. Ukupno 13 jedinjenja iz ove grupe nalazilo se u etarskim uljima populacije **P23** i ni jedno nije bilo zastupljeno u značajnom procentu. U etarskim uljima populacije **P19** ova grupa jedinjenja je bila predstavljena sa 17 komponenti koje su zajedno činile 13,01% ukupnih ulja, pri čemu ni jedna pojedinačna komponenta nije dostizala 5%. Kod populacije **P20** seskviterpenski ugljovodonici predstavljali su glavnu grupu jedinjenja i po broju komponenti, 22, i po zastupljenosti, 58,17%, s time da je germakren-D bio glavna komponenta etarskih ulja sa 36,91%. U etarskim uljima populacije **P22** nalazilo se ukupno 19 seskviterpenskih ugljovodonika koj su zajedno činili 53,35% i predstavljali glavnu grupu jedinjenja. Najzastupljeniji je bio (*E*)-kariofilen sa 40,30% i jedino je još α -humulen imao značajniju zastupljenost sa 6,15%. Kod populacije **P21**, nalazilo se ukupno 14 jedinjenja iz ove grupe i činila su 14,09% pri čemu je jedino β -biosabolen imao koncentraciju od 7,76%. Kod populacije **P34** determinisano je 19 jedinjenja iz ove grupe koja čine 35,63% etarskih ulja, pri čemu dva jedinjenja imaju približno jednake koncentracije, (*E*)-kariofilen (11,75%) i (*E*)- γ -bisabolen (11,93%), dok je germakren-D zastupljen sa 6,29%.

Ostala jedinjenja: U etarskim uljima kod šest ispitivanih populacija *Th. pannonicus* utvrđeno je bilo i prisustvo 13 komponenti koje ne pripadaju ni jednoj od prethodnih grupa jedinjenja i njihova ukupna zastupljenost se kretala od 0,36% kod populacije **P34** do 2,37% kod populacije **P23**. Ni jedna pojedinačna komponenta nije imala značajniji procenat.

3.1.1.5 Sastav etarskih ulja *Thymus balcanus*

U ispitivanje je bilo uključeno četiri populacije *Th. balcanus* u čijim je etarskim uljima bilo determinisano ukupno 60 komponenti (Tabela 3.5). Poulacija **P25** je imala 46 determinisanih komponenti, populacija **P26** 49 komponenti, populacija **P24** 48, a populacija **P27** 33 komponente.

Monoterpenski ugljovodonic: Sadržaj ove grupe jedinjenja se kretao od 7,93%, kod populacije Babinog zuba (12 komponenti), do 30,27%, kod populacije **P27** (12 komponenti). Kod populacije **P24** 13 monoterpenskih ugljovodonika u etarskim uljima činilo je 27, 37%, a u etarskim uljima populacije **P26** 14 komponenti je činilo 11,84%. Pojedinačno je samo mircen bio značajno zastupljen i to 18,08% u etarskim uljima populacije **P24**, 14,24% u etarskim uljima populacije **P27**, 7,51% u etarskim uljima populacije **P26** i 4,26% u etarskim uljima populacije **P25**.

Oksigenovani monoterpenski ugljovodonic: Kod ispitivanih populacija *Th. balcanus* sadržaj ove grupe jedinjenja se kretao od 43,46%, kod populacije **P24** gde je determinisano 12 ovih komponenti, do 60,22%, kod populacije **P27** gde je determinisano 8 jedinjenja iz ove grupe. U etarskim uljima populacije **P25** utvrđeno je prisustvo 10 oksigenovanih monoterpenskih ugljo vodonika koji su ukupno činili 54,50%, a kod populacije **P26** 12 jedinjenja iz ove grupe činilo je 53,30% etarskih ulja. Kod populacije **P25** značajnu kocentraciju, od jedinjenja koja pripadaju ovoj grupi, su imali geranial (19,06%), neral (12,70%) i neril acetat (12,44%). U preostale tri populacije jedinjenja koja su bila sa značajnom koncentracijom su linalol i linalil acetat. Kod populacije **P26** linalil acetat je imao koncentraciju od 33,89% i bio je najzastupljenija komponenta etarsih ulja, dok je linalol imao koncentraciju od 17,05%. Kod populacije **P24** linalil acetat je sa 22,94% takođe bio najzastupljenija komponenta etarskih ulja, dok je linalol imao koncentraciju od 11,74%. Kod populacije **P27** linalol je, sa 34,42%, bio najzastupljenija komponenta, a linalil acetat je imao koncentraciju od 14,56%.

Seskviterpenski ugljovodonic: Sadržaj seskviterpenskih ugljovodonika u etarskim uljim ispitivanih populacija *Th. balcanus* se kretao od 3,57%, kod populacije **P27** (9 jedinjenja), do 27,04%, kod populacije **P26** (17 jedinjenja). Kod populacije **P24** 17 jedinjenja iz ove grupe činilo je 21,01% etarskih ulja, dok je 18 jedinjenja iz ove

grup činilo 20,67% etarskih ulja populacije **P25**. Od pojedinačnih komponenti, jedino je biciklogermakren imao koncentraciju od 11,88% u etarskim uljima populacije **P26**.

Ostala jedinjenja: Sadržaj ostalih jedinjenja u etarskim uljuima ispitivanih populacija je bio veoma nizak. Najveći je bio kod populacije **P25**, 11,73%, dok je kod populacije **P24** bio 2,73%, kod populacije **P26** 0,88% i kod populacije **P27** 0,83%.

3.1.1.6 Sastav etarskih ulja *Thymus moesiacus*

U ispitivanja je bila uključena samo jedna populacija vrste *Th. moesiacus*, **P31**, u čijem su etarskom ulju determinisane 44 komponente tj. 98,04% (Tabela 3.5).

Monoterpenski ugljovodonici: Ova grupa jedinjenja imala je 14 komponenti i činila je ukupno 13,91%. Ni jedno jedinjenje iz ove grupe nije pojedinačno učestvovalo u značajnoj koncentraciji u sastavu etarskih ulja.

Oksigenovani monoterpenski ugljovodonici: U etarskim uljima ispitivane populacije *Th. moesiacus* determinisano je 11 jedinjenja iz ove grupe i ona su činila 81,97%. Glavna komponenta etarskih ulja ove populacije je bio α -terpinil acetat sa 66,59%.

Seskviterpenski ugljovodonici: Ukupno 12 jedinjenja iz ove grupe činilo je svega 1,74% etarskih ulja ispitivane populacije.

Ostala jedinjenja: Ukupno 7 jedinjenja nije pripadalo ni jednoj od galvnih grupa i ona su zajedno činila 0,43% etarskih ulja ove populacije.

3.1.1.7 Sastav etarskih ulja *Thymus praecox*

U ova ispitivanja je bila uključena samo jedna populacija vrste *Th. praecox*, **P32**. Kod ove populacije determinisano je ukupno 47 komponenti koje su činile 88,98% etarskih ulja (Tabela 3.5).

Monoterpenski ugljovodonici: Ova grupa jedinjenja imala je 13 komponenti i činila je ukupno 12,33%. Ni jedno jedinjenje iz ove grupe nije pojedinačno učestvovalo u značajnoj koncentraciji u sastavu etarskih ulja.

Oksigenovani monoterpenški ugljovodonici: Ukupno 7 jedinjenja iz ove grupe činilo je 8,67% etarskih ulja. Ni jedno jedinjenje pojedinačno nije imalo značajnu zastupljenost.

Seskviterpenški ugljovodonici: Ova grupa jedinjenja je bila najzastupljenija u etarskim uljima ispitivane populacije vrste *Th. praecox*. Determinisano je bilo ukupno 19 seskviterpenških ugljovodonika koji su činili 62,96% etarskih ulja. Najznačajnije komponente su bile (*E*)-kariofilen sa 20,48%, γ -kadinen sa 17,84% i germakren-D sa 7,72%.

Ostala jedinjenja: Kod ispitivane populacije *Th. praecox* utvrđeno je prisustvo 8 jedinjenja koja ne pripadaju ni jednoj od navedenih grupa i čine ukupno 5,02% etarskih ulja i ni jedna pojedinačna komponenta nije zastupljena u značajnoj koncentraciji.

Tabela 3.1 Sastav etarskog ulja *Th. pulegioides*.

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P09
Tricyclene	927	MH	-	0.02	0.02	-	-	-	-
α -Thujene	930	MH	0.01	0.83	0.01	0.73	0.75	-	1.15
α -Pinene	939	MH	0.02	0.73	0.08	0.40	0.40	0.01	0.60
Camphene	954	MH	0.03	0.76	0.15	0.04	0.05	0.01	0.25
Sabinene	975	MH	-	0.02	-	0.02	0.02	-	-
β -Pinene	979	MH	-	0.11	0.01	0.09	0.09	-	0.14
Myrcene	991	MH	0.45	1.14	0.50	0.09	0.49	0.42	0.01
α -Phellandrene	1003	MH	0.03	0.19	-	0.04	0.09	0.04	-
α -Terpinene	1017	MH	0.02	1.45	0.02	0.51	0.73	0.02	0.10
Limonene	1029	MH	0.08	0.17	0.09	-	-	0.06	0.12
β -Phellandrene	1030	MH	-	0.08	-	-	-	-	-
Sylvestrene	1031	MH	-	-	-	-	0.14	-	-
(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1037	MH	0.11	0.04	0.12	0.01	0.03	0.10	-
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1050	MH	0.17	0.03	0.17	-	0.01	0.16	-
γ -Terpinene	1060	MH	0.02	21.39	0.01	1.51	3.71	0.03	0.27
Terpinolene	1089	MH	0.02	0.04	0.03	0.02	0.04	0.02	-
<i>cis</i> -Dehydroxy-linalool oxide	1008	OMHD	-	-	-	-	-	-	-
(<i>Z</i>)-Sabinene hydrate	1067	OMHD	-	-	-	-	-	-	0.11
<i>trans</i> -Furanoid-linalool oxide	1073	OMHD	-	-	-	-	-	-	-
Linalool	1097	OMHD	0.12	0.05	-	-	-	0.11	0.21
α -Pinene oxide	1099	OMHD	-	0.01	0.10	0.03	0.11	0.07	0.05
Camphor	1146	OMHD	-	-	0.01	-	-	-	-

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P09
β -Pinene oxide	1159	OMHD	0.02	-	-	-	-	-	-
Borneol	1169	OMHD	0.06	1.57	0.37	0.03	0.04	0.01	0.61
3-Thujanol	1169	OMHD	-	-	0.01	0.09	0.04	-	-
<i>trans</i> -Dihydro carvone	1209	OMHD	-	-	-	-	0.01	-	-
Nerol	1230	OMHD	-	-	-	-	-	-	-
Neral	1238	OMHD	-	-	-	-	-	-	-
Thymoquinone	1252	OMHD	-	-	-	0.11	3.09	-	5.49
Geraniol	1253	OMHD	87.12	-	87.92	-	-	86.97	-
Geranial	1267	OMHD	-	-	-	-	-	-	-
Bornyl acetate	1289	OMHD	-	0.02	0.02	-	-	-	0.08
Methyl geranate	1325	OMHD	-	-	0.18	-	-	-	-
Geranyl acetate	1381	OMHD	-	-	-	-	-	0.31	-
Caryophyllene oxide	1583	R	0.02	0.02	-	0.44	0.08	-	-
<i>p</i> -Cymene	1025	R	-	4.89	-	42.59	17.36	0.01	48.59
<i>m</i> -Cymenene	1085	R	-	-	-	-	-	-	0.04
<i>p</i> -Cymenene	1091	R	-	-	-	-	0.03	-	-
3-Octanone	984	R	0.05	0.12	0.06	0.01	0.10	0.10	6.14
Thymol	1290	R	0.05	52.95	-	0.05	62.82	0.07	22.12
Carvacrol	1299	R	-	0.14	-	39.95	0.61	-	0.04
Thymohydroquinone	1555	R	-	-	-	2.72	0.46	-	-
Thymol methyl ether	1235	R	-	2.75	-	0.91	0.91	-	4.05
Carvacrol methyl ether	1245	R	-	1.14	-	-	0.93	0.03	2.68
3-Octanol	991	R	0.35	0.04	0.11	-	0.03	1.10	0.63
Oct-1-en-3-ol	979	R	0.39	1.19	0.26	0.20	1.14	0.05	0.95
Bergamol	1057	R	-	-	-	-	-	-	-

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P09
α -Cubebene	1351	SH	0.01	-	-	-	-	0.03	-
α -Copaene	1377	SH	0.02	0.01	-	-	-	0.01	-
β -Bourbonene	1388	SH	-	-	0.03	-	-	-	0.09
α -Bourbonene	1390	SH	0.14	0.02	-	0.02	0.01	0.15	-
β -Elemene	1391	SH	0.01	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1419	SH	2.71	0.86	1.87	6.00	0.66	0.19	0.19
β -Copaene	1432	SH	0.03	0.01	-	0.01	-	0.02	-
<i>trans</i> - α Bergamotene	1435	SH	0.02	0.02	0.03	-	0.01	0.03	-
Aromadendrene	1441	SH	-	-	-	-	-	0.02	-
<i>trans</i> - β -Farnesene	1443	SH	-	-	-	-	0.16	0.01	-
<i>trans</i> -Muuroala-3,5 diene	1454	SH	0.01	-	0.01	-	-	-	-
α -Humulene	1455	SH	0.27	0.04	-	0.14	0.04	-	-
Alloaromadendrene	1460	SH	0.01	-	0.08	-	-	0.05	-
γ -Muurolene	1480	SH	0.04	0.06	-	-	-	-	-
α -Amorphene	1485	SH	-	0.01	-	0.01	-	-	-
Germacrene-D	1485	SH	1.69	0.02	0.08	0.02	-	0.55	-
γ -Amorphene	1496	SH	-	-	-	-	-	0.02	-
Bicyclogermacrene	1500	SH	0.01	-	0.10	-	0.01	0.46	-
α -Muurolene	1500	SH	0.02	0.01	-	-	0.01	-	-
β -Bisabolene	1506	SH	3.40	6.47	4.24	0.08	3.70	7.28	3.41
δ -Amorphene	1512	SH	-	-	-	-	-	0.02	-
γ -Cadinene	1514	SH	0.02	-	-	-	-	-	-
β -Sesquiphellandrene	1523	SH	0.05	-	0.06	-	0.04	0.07	-
<i>trans</i> -Cadina-1,4 diene	1535	SH	0.01	-	-	-	-	-	-
α -Cadinene	1539	SH	0.02	-	-	-	-	-	-

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P09
β -Atlantol	1608	SH	-	-	-	-	0.01	0.02	-
Procenat determinacije			97.62	99.43	96.75	96.84	98.97	98.63	98.13

KI – Kovačev indeks; MH – monoterpeni ugljovodoni; OMHD – oksigenovani monoterpeni ugljovodoni; R – ostala jedinjenja; SH – seskviterpeni ugljovodoni;

Tabela 3.2. Sastav etarskog ulja *Th. glabrescens*.

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P33
Tricyclene	927	MH	0.02	0.04	0.06	-	-	-	-
α -Thujene	930	MH	0.98	0.73	1.28	0.56	1.35	0.98	0.76
α -Pinene	939	MH	0.64	0.78	1.46	0.34	1.00	0.39	0.39
Camphene	954	MH	0.49	0.82	2.13	0.08	1.01	0.07	0.09
Sabinene	975	MH	0.03	0.06	0.13	0.02	0.05	0.04	0.07
β -Pinene	979	MH	0.18	0.17	0.30	0.08	0.18	0.14	0.14
Myrcene	991	MH	1.26	0.58	0.80	1.00	0.45	1.21	0.05
α -Phellandrene	1003	MH	0.16	0.16	0.25	0.11	0.10	0.26	0.16
α -Terpinene	1017	MH	1.27	0.38	0.83	0.87	1.00	2.23	0.18
Limonene	1029	MH	0.13	0.21	0.28	0.11	0.13	0.23	0.17
β -Phellandrene	1030	MH	0.08	0.23	-	0.10	-	0.16	-
Sylvestrene	1031	MH	-	0.66	-	-	-	-	-
(Z)- β -Ocimene	1037	MH	-	0.04	-	0.03	-	-	-

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P33
Ocimene	1043	MH	-	0.02	-	-	-	-	-
(E)- β -Ocimene	1050	MH	0.03	-	0.02	-	-	0.04	-
γ -Terpinene	1060	MH	11.91	2.00	19.61	10.67	13.25	31.26	0.92
Terpinolene	1089	MH	0.04	0.08	0.06	0.06	0.03	0.06	0.13
1,8-Cineole	1031	OMH D	1.13	-	1.05	0.15	0.26	1.27	0.40
(Z)-Sabinene hydrate	1067	OMH D	-	-	-	0.30	-	-	-
Dehydro-linalool	1091	OMH D	0.34	-	-	-	-	-	-
Linalool	1097	OMH D	-	-	0.27	0.03	0.26	-	-
α -Pinene oxide	1099	OMH D	0.03	-	0.07	0.04	0.08	0.08	0.18
Camphor	1146	OMH D	0.01	-	0.01	-	-	-	-
β -Pinene oxide	1159	OMH D	0.02	0.12	-	-	-	-	-
Borneol	1169	OMH D	0.66	1.51	3.36	0.12	2.33	-	0.12
3-Thujanol	1169	OMH D	-	0.20	-	-	-	-	-
α -Terpineol	1189	OMH D	0.04	-	0.08	-	0.04	0.07	-
Thymoquinone	1252	OMH D	1.09	4.84	2.20	0.75	1.91	0.12	1.84
Bornyl acetate	1289	OMH D	-	-	0.02	-	0.05	-	-
Elemol	1550	R	-	-	-	-	-	-	-
Spathulenol	1578	R	0.14	-	0.28	-	-	-	-

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P33
Caryophyllene oxide	1583	R	0.05	0.03	0.06	0.05	0.08	-	0.14
<i>p</i> -Cymene	1025	R	9.76	11.40	18.43	5.38	42.56	3.98	75.76
<i>m</i> -Cymenene	1085	R	0.03	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymenene	1091	R	-	-	-	-	-	-	0.12
3-Octanone	984	R	0.36	0.09	0.46	0.19	0.14	2.09	0.37
Thymol	1290	R	56.29	61.94	19.02	64.51	16.56	44.53	1.03
Carvacrol	1299	R	0.04	0.02	-	0.04	0.01	-	-
Thymohydroquinone	1555	R	0.05	0.09	0.06	-	0.43	-	-
Thymol methyl ether	1235	R	1.21	2.06	13.11	1.23	4.93	0.63	3.89
Carvacrol methyl ether	1245	R	2.49	2.46	1.65	1.82	1.52	1.04	1.10
3-Octanol	991	R	0.07	0.03	-	0.03	0.03	0.87	0.17
Oct-1-en-3-ol	979	R	1.75	0.10	0.62	0.71	0.31	0.30	1.22
α -Cubebene	1351	SH	-	-	0.02	-	0.01	-	-
α -Copaene	1377	SH	0.03	-	0.03	-	-	-	-
α -Bourbonene	1390	SH	0.05	0.21	0.17	0.13	0.08	-	0.15
β -Elemene	1391	SH	0.02	-	-	0.01	-	-	-
7- <i>epi</i> -Sesquithujene	1391	SH	-	-	-	0.06	-	-	-
α -Funebrene	1403	SH	-	-	0.03	-	-	-	-
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1419	SH	0.91	0.58	0.60	2.07	1.07	0.49	0.69
β -Copaene	1432	SH	0.03	0.06	0.07	0.05	0.04	-	0.05
<i>trans</i> - α Bergamotene	1435	SH	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.05
Aromadendrene	1441	SH	0.19	0.07	0.03	-	-	0.09	0.04
<i>trans</i> - β -Farnesene	1443	SH	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Muurolo-3,5 diene	1454	SH	-	0.03	0.02	0.01	-	-	-

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P33
α -Humulene	1455	SH	-	-	-	0.09	0.04	-	-
Alloaromadendrene	1460	SH	0.06	-	0.08	0.02	-	-	0.08
Dehydro-aromadendrene	1463	SH	-	0.08	-	-	-	0.07	-
γ -Muurolene	1480	SH	0.16	0.09	0.10	0.32	0.11	0.20	0.05
α -Amorphene	1485	SH	-	-	-	0.04	-	-	-
Germacrene-D	1485	SH	0.03	-	0.69	0.01	0.14	0.24	0.07
γ -Amorphene	1496	SH	-	-	0.08	0.08	0.03	-	-
Viridiflorene	1497	SH	0.29	-	-	-	-	-	-
Bicyclogermacrene	1500	SH	-	0.01	0.18	-	-	-	-
α -Muurolene	1500	SH	0.04	-	-	0.02	0.03	-	-
(<i>E,E</i>)- α -Farnesene	1506	SH	-	-	-	6.66	-	-	-
β -Bisabolene	1506	SH	3.27	3.89	7.60	-	5.08	4.94	6.06
δ -Amorphene	1512	SH	-	-	-	0.37	-	-	-
γ -Cadinene	1514	SH	0.04	-	-	-	0.03	-	-
β -Sesquiphellandrene	1523	SH	-	-	0.05	0.07	-	-	0.04
δ -Cadinene	1523	SH	0.04	-	-	-	0.15	-	-
<i>trans</i> -Cadina-1,4 diene	1535	SH	0.02	-	0.01	0.04	-	-	-
α -Cadinene	1539	SH	0.01	-	0.02	0.03	-	-	-
β -Atlantol	1608	SH	0.02	0.01	0.02	-	-	-	-
Procentat determinacije			98.06	96.90	97.78	99.47	96.89	98.12	96.65

KI – Kovačev indeks; MH – monoterpenski ugljovodonici; OMHD – oksigenovani monoterpenski ugljovodonici; R – ostala jedinjenja; SH – seskviterpenski ugljovodonici;

Tabela 3.3 Sastav etarskog ulja *Th. marschallianus*.

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P16	P17	P18
Tricyclene	927	MH	0.07	-	-
α -Thujene	930	MH	0.12	0.14	0.02
α -Pinene	939	MH	0.90	0.71	11.29
Camphene	954	MH	1.81	0.13	0.29
Sabinene	975	MH	0.13	0.24	0.11
β -Pinene	979	MH	0.25	0.26	0.23
Myrcene	991	MH	4.75	0.25	0.51
α -Phellandrene	1003	MH	0.15	0.13	0.13
α -Terpinene	1017	MH	0.06	0.09	-
Limonene	1029	MH	0.81	-	-
β -Phellandrene	1030	MH	-	-	-
Sylvestrene	1031	MH	-	3.75	0.95
(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1037	MH	0.91	0.31	0.06
Ocimene	1043	MH	-	-	-
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1050	MH	9.75	1.48	0.75
γ -Terpinene	1060	MH	0.24	-	0.05
Terpinolene	1089	MH	0.09	-	-
1,8-Cineole	1031	OMHD	0.37	2.58	1.19
(<i>Z</i>)-Sabinene hydrate	1067	OMHD	0.34	0.39	0.11
Linalool	1097	OMHD	1.50	4.21	0.20
α -Pinene oxide	1099	OMHD	0.12	0.51	0.11
Camphor	1146	OMHD	1.15	-	0.36

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P16	P17	P18
Citronellal	1153	OMHD	-	0.05	-
δ -Terpineol	1166	OMHD	-	-	0.05
α -Terpineol	1189	OMHD	0.10	0.20	0.16
<i>cis</i> -Dihydro carvone	1203	OMHD	-	0.15	-
<i>trans</i> -Dihydro carvone	1209	OMHD	-	0.06	-
Thymoquinone	1252	OMHD	-	0.29	-
Elemol	1550	R	-	0.29	-
Spathulenol	1578	R	3.54	-	-
Caryophyllene oxide	1583	R	0.17	5.45	0.10
<i>p</i> -Cymene	1025	R	0.22	0.17	0.06
3-Octanone	984	R	0.39	0.44	0.25
Thymol	1290	R	0.24	0.88	0.20
Carvacrol	1299	R	-	0.06	-
Thymol methyl ether	1235	R	-	0.16	-
3-Octanol	991	R	0.19	0.25	0.03
Oct-1-en-3-ol	979	R	0.58	0.82	1.17
α -Cubebene	1351	SH	0.26	0.42	0.11
α -Ylangene	1375	SH	0.11	0.14	0.08
α -Copaene	1377	SH	0.35	1.10	0.33
β -Bourbonene	1388	SH	2.59	9.17	2.31
α -Bourbonene	1390	SH	-	0.76	1.02
β -Elemene	1391	SH	1.13	0.42	-
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1419	SH	4.03	14.57	2.53
β -Copaene	1432	SH	0.80	1.46	-

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P16	P17	P18
<i>trans</i> - α Bergamotene	1435	SH	-	0.14	0.52
Aromadendrene	1441	SH	1.13	0.88	0.04
<i>trans</i> -Muuro-la-3,5 diene	1454	SH	-	0.40	0.51
α -Humulene	1455	SH	-	1.11	0.14
Alloaromadendrene	1460	SH	0.84	1.68	-
<i>cis</i> -Muuro-la-4(14),5- diene	1467	SH	-	0.81	0.85
γ -Muuro-lene	1480	SH	0.81	1.17	-
Germacrene-D	1485	SH	34.00	20.40	66.66
γ -Amorphene	1496	SH	-	1.20	0.33
Viridiflorene	1497	SH	1.02	-	-
Bicyclogermacrene	1500	SH	12.30	0.49	0.18
α -Muuro-lene	1500	SH	-	1.04	0.16
(<i>E,E</i>)- α -Farnesene	1506	SH	1.99	1.50	2.35
γ -Cadinene	1514	SH	0.93	2.78	0.55
β - Sesquiphellandrene	1523	SH	-	-	-
δ -Cadinene	1523	SH	1.33	4.60	0.98
<i>trans</i> -Calamenene	1529	SH	-	0.42	-
<i>trans</i> -Cadi-na-1,4 diene	1535	SH	0.18	0.86	0.08
α -Cadinene	1539	SH	0.26	-	0.25
Procenat determinacije			92.98	91.93	98.37

KI – Kovačev indeks; MH – monoterpenški ugljovodonici; OMHD – oksigenovani monoterpenški ugljovodonici; R – ostala jedinjenja; SH – seskviterpenški ugljovodonici;

Tabela 3.4. Sastav etarskog ulja *Th. pannonicus*.

Jedinjenje	Tip jedinjenja	KI Literature	P19	P20	P21	P22	P23	P34
Tricyclene	MH	927	0.17	0.05	0.11	-	-	0.03
α -Thujene	MH	930	0.18	0.06	0.09	0.05	-	0.09
α -Pinene	MH	939	19.90	13.88	1.68	0.81	0.05	1.75
Camphene	MH	954	4.03	1.11	3.28	0.06	0.07	0.77
Sabinene	MH	975	0.58	0.16	0.21	0.37	0.03	1.09
β -Pinene	MH	979	1.16	0.50	0.39	0.40	0.01	0.81
Myrcene	MH	991	4.81	7.56	0.38	0.62	0.15	25.85
α -Phellandrene	MH	1003	0.38	0.17	0.04	0.08	0.08	-
α -Terpinene	MH	1017	0.16	0.05	0.04	0.03	-	0.03
Limonene	MH	1029	12.45	1.98	0.26	24.82	0.02	0.73
(<i>Z</i>)- β -Ocimene	MH	1037	0.93	1.14	0.44	1.38	-	0.98
Ocimene	MH	1043	-	-	0.92	-	-	-
(<i>E</i>)- β -Ocimene	MH	1050	14.24	5.61	-	6.56	-	2.89
γ -Terpinene	MH	1060	0.16	0.15	0.05	0.14	0.03	0.07
Terpinolene	MH	1089	0.23	0.02	0.04	0.02	0.04	0.05
1,8-Cineole	OMHD	1031	8.21	0.75	2.73	5.65	0.14	1.29
(<i>Z</i>)-Sabinene hydrate	OMHD	1067	-	0.27	-	0.26	0.22	-
Linalool	OMHD	1097	-	0.77	66.06	0.03	0.04	0.22
α -Pinene oxide	OMHD	1099	0.42	0.16	-	0.15	0.31	2.27
Camphor	OMHD	1146	7.58	0.59	6.01	0.15	0.11	-
Citronellal	OMHD	1153	-	-	-	-	0.05	-

Jedinjenje	Tip jedinjenja	KI Literature	P19	P20	P21	P22	P23	P34
β -Pinene oxide	OMHD	1159	-	-	-	-	0.95	-
Borneol	OMHD	1169	-	-	0.20	-	-	0.03
3-Thujanol	OMHD	1169	0.94	-	-	-	-	-
α -Terpineol	OMHD	1189	0.13	-	0.25	-	0.06	20.01
<i>cis</i> -Dihydro carvone	OMHD	1203	-	-	-	0.12	-	-
<i>trans</i> -Dihydro carvone	OMHD	1209	-	-	-	0.18	-	-
Neral	OMHD	1238	-	-	-	-	34.05	-
Thymoquinone	OMHD	1252	-	0.05	-	-	-	-
Geraniol	OMHD	1253	-	-	-	0.62	-	-
Geranial	OMHD	1267	-	-	0.02	-	51.74	-
Bornyl acetate	OMHD	1289	-	-	0.32	-	-	-
Neryl acetate	OMHD	1362	-	-	-	0.07	0.46	-
Spathulenol	OMHD	1578	-	-	-	-	0.14	-
Caryophyllene oxide	OMHD	1583	-	0.19	0.03	1.00	-	-
<i>p</i> -Cymene	R	1025	-	0.14	-	0.07	0.09	-
<i>p</i> -Cymenene	R	1091	-	-	-	-	0.06	-
3-Octanone	R	984	0.15	0.29	0.16	0.12	-	0.07
Thymol	R	1290	0.21	0.24	0.08	0.12	0.05	-
Carvacrol	R	1299	-	-	-	-	0.03	0.08
Thymol methyl ether	R	1235	0.19	0.03	-	0.10	-	-
Carvacrol methyl ether	R	1245	-	-	0.05	0.03	-	-
3-Octanol	R	991	0.17	0.35	-	0.08	-	0.03
Oct-1-en-3-ol	R	979	0.81	1.11	0.25	0.83	1.43	0.17

Jedinjenje	Tip jedinjenja	KI Literature	P19	P20	P21	P22	P23	P34
Bergamol	R	1057	-	-	-	-	0.02	-
6-methyl-5-hepten-2-one	R	986	-	-	-	-	0.55	-
α -Cubebene	SH	1351	0.13	0.13	-	0.04	-	0.03
α -Ylangene	SH	1375	-	0.06	-	-	-	-
α -Copaene	SH	1377	0.22	0.39	-	0.11	-	0.07
β -Bourbonene	SH	1388	-	-	-	-	0.22	-
α -Bourbonene	SH	1390	0.51	2.46	-	0.68	-	0.28
β -Elemene	SH	1391	0.12	0.72	-	0.23	0.02	0.16
(<i>E</i>)-Caryophyllene	SH	1419	1.33	4.16	1.92	40.30	0.08	11.75
β -Cedrene	SH	1421	-	-	0.05	-	-	-
β -Copaene	SH	1432	0.21	0.59	-	0.11	0.03	0.07
<i>trans</i> - α Bergamotene	SH	1435	-	-	0.05	-	-	0.05
Aromadendrene	SH	1441	-	0.10	-	-	-	-
<i>trans</i> - β -Farnesene	SH	1443	-	-	-	-	0.21	-
<i>trans</i> -Muurolo-3,5 diene	SH	1454	0.09	0.41	0.32	0.07	0.02	0.04
α -Humulene	SH	1455	-	-	0.49	6.15	-	3.32
(<i>E</i>)- β -Farnesene	SH	1457	2.73	6.96	-	-	-	-
Alloaromadendrene	SH	1460	-	-	0.05	-	0.03	0.02
<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-diene	SH	1467	-	0.89	0.48	0.08	-	-
γ -Muurolole	SH	1480	0.45	0.54	0.02	0.10	0.03	-
Germacrene-D	SH	1485	4.60	36.91	0.23	3.94	0.54	6.29
γ -Amorphene	SH	1496	0.28	0.27	-	0.20	-	0.15
Bicyclogermacrene	SH	1500	0.18	0.21	0.25	0.05	-	0.39

Jedinjenje	Tip jedinjenja	KI Literature	P19	P20	P21	P22	P23	P34
α -Muurolene	SH	1500	0.19	0.24	-	0.08	0.08	0.06
(<i>E,E</i>)- α -Farnesene	SH	1506	0.47	0.18	-	0.50	0.23	0.48
β -Bisabolene	SH	1506	0.57	0.27	7.76	-	0.33	0.20
δ -Amorphene	SH	1512	-	-	-	-	0.04	-
γ -Cadinene	SH	1514	-	0.75	2.24	0.21	-	0.23
β -Sesquiphellandrene	SH	1523	-	-	0.14	-	-	0.12
δ -Cadinene	SH	1523	-	1.48	-	0.39	-	-
<i>trans</i> -Calamenene	SH	1529	0.51	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-gamma-Bisabolene	SH	1531	-	-	-	-	-	11.93
<i>trans</i> -Cadina-1,4 diene	SH	1535	-	0.10	-	0.04	-	-
α -Cadinene	SH	1539	0.42	0.35	0.07	0.07	-	-
Procenat determinacije			91.22	95.55	98.20	98.24	92.85	94.96

KI – Kovačev indeks; MH – monoterpenški ugljovodonici; OMHD – oksigenovani monoterpenški ugljovodonici; R – ostala jedinjenja; SH – seskviterpenški ugljovodonici;

Tabela 3.5 Sastav etarskog ulja populacija vrsta iz podsekcije *Pseudomarginati*.

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P24	P25	P26	P27	P31	P32
Tricyclene	927	MH	-	-	0.06	-	0.06	-
α -Thujene	930	MH	0.09	0.07	0.07	-	0.15	0.36
α -Pinene	939	MH	0.77	0.95	1.41	0.14	1.27	1.62
Camphene	954	MH	0.98	0.95	1.22	0.07	2.59	1.28
Sabinene	975	MH	0.23	0.16	0.06	0.05	1.58	0.41
β -Pinene	979	MH	0.31	0.26	0.23	0.06	0.22	0.48
Myrcene	991	MH	18.08	4.26	7.51	14.24	4.06	3.02
α -Phellandrene	1003	MH	0.25	0.09	0.07	0.24	0.05	0.17
α -Terpinene	1017	MH	0.18	-	0.05	0.22	0.15	0.35
Limonene	1029	MH	0.92	0.72	0.34	3.15	2.95	0.66
(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1037	MH	1.79	0.05	0.31	3.79	-	0.15
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1050	MH	3.14	0.32	0.40	7.43	0.01	0.89
γ -Terpinene	1060	MH	0.37	0.05	0.04	0.21	0.50	2.86
Terpinolene	1089	MH	0.29	0.04	0.08	0.67	0.33	0.08
1,8-Cineole	1031	OMHD	1.47	1.62	0.07	0.43	0.05	3.43
(<i>Z</i>)-Sabinene hydrate	1067	OMHD	0.51	0.29	0.19	0.19	1.19	1.23
Linalool	1097	OMHD	11.74	-	17.05	34.42	-	0.70
α -Pinene oxide	1099	OMHD	0.28	0.26	0.08	0.80	0.03	0.61
Camphor	1146	OMHD	1.67	0.14	1.47	-	0.01	0.06
β -Pinene oxide	1159	OMHD	-	0.70	-	-	-	-
Borneol	1169	OMHD	0.19	-	0.07	0.10	0.55	1.54
3-Thujanol	1169	OMHD	-	-	-	-	0.15	-

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P24	P25	P26	P27	P31	P32
α -Terpineol	1189	OMHD	-	-	-	-	5.81	-
<i>trans</i> -Dihydro carvone	1209	OMHD	-	-	-	-	0.02	-
Linalyl formate	1216	OMHD	-	-	0.02	-	-	-
Neral	1238	OMHD	0.07	12.70	0.02	-	-	-
Carvone	1243	OMHD	-	-	-	-	0.07	-
Thymoquinone	1252	OMHD	-	-	-	-	-	1.10
Geraniol	1253	OMHD	-	2.57	-	-	-	-
Linalyl acetate	1257	OMHD	22.94	-	33.89	14.56	-	-
Geranial	1267	OMHD	-	19.06	-	-	-	-
Isobornyl acetate	1286	OMHD	0.08	-	0.06	-	-	-
Bornyl acetate	1289	OMHD	0.11	-	0.06	-	7.50	-
alpha-Terpinyl acetate	1349	OMHD	-	-	-	-	66.59	-
Neryl acetate	1362	OMHD	1.38	12.44	-	3.08	-	-
Geranyl acetate	1381	OMHD	3.01	4.72	0.31	6.64	-	-
Elemol	1550	R	-	5.96	-	-	-	-
Caryophyllene oxide	1583	R	0.18	0.16	0.07	-	0.07	1.19
<i>p</i> -Cymene	1025	R	0.15	-	0.03	-	0.27	1.73
<i>p</i> -Cymenene	1091	R	-	-	-	-	0.03	-
3-Octanone	984	R	0.18	0.62	0.07	0.06	0.01	0.06
Thymol	1290	R	0.07	0.26	0.14	0.10	0.04	0.38
Thymol methyl ether	1235	R	-	3.35	-	-	-	1.03
Carvacrol methyl ether	1245	R	-	-	-	-	-	0.26

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P24	P25	P26	P27	P31	P32
3-Octanol	991	R	0.19	-	0.09	0.32	-	0.10
Oct-1-en-3-ol	979	R	1.97	1.39	0.49	0.35	-	0.27
α -Cubebene	1351	SH	0.25	0.07	0.16	0.40	-	-
α -Ylangene	1375	SH	0.12	-	0.07	-	-	-
α -Copaene	1377	SH	0.10	0.16	0.20	0.14	-	0.21
α -Bourbonene	1390	SH	0.16	-	0.05	0.28	0.03	0.66
β -Elemene	1391	SH	0.22	0.21	0.28	-	-	0.44
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1419	SH	9.85	6.66	4.93	-	1.05	20.48
β -Copaene	1432	SH	-	0.06	-	-	0.01	0.16
<i>trans</i> - α -Bergamotene	1435	SH	-	-	-	-	0.03	-
Aromadendrene	1441	SH	0.06	0.18	0.09	0.87	0.01	0.09
<i>trans</i> -Muuro-la-3.5 diene	1454	SH	0.06	0.24	0.11	-	-	1.35
α -Humulene	1455	SH	-	0.44	-	-	0.04	7.92
(<i>E</i>)- β -Farnesene	1457	SH	6.00	-	2.26	0.10	-	-
Alloaromadendrene	1460	SH	0.53	0.82	1.70	0.27	-	-
α -Amorphene	1485	SH	0.16	0.10	0.37	0.81	-	0.36
Germacrene-D	1485	SH	0.94	0.87	1.88	-	0.07	7.72
γ -Amorphene	1496	SH	-	0.22	-	-	-	0.27
<i>cis</i> -Cadina-1.4-diene	1496	SH	-	-	-	0.13	-	-
Bicyclogermacrene	1500	SH	1.13	3.38	11.88	0.56	0.19	2.34
α -Muuro-lene	1500	SH	-	-	-	-	-	0.27
(<i>E,E</i>)- α -Farnesene	1506	SH	-	3.35	-	-	-	0.74
β -Bisabolene	1506	SH	-	0.07	-	-	0.31	-

Jedinjenje	KI Literature	Tip jedinjenja	P24	P25	P26	P27	P31	P32
δ -Amorphene	1512	SH	0.11	-	0.35	-	-	-
γ -Cadinene	1514	SH	0.40	2.90	0.80	-	-	17.84
β -Sesquiphellandrene	1523	SH	-	-	-	-	-	-
δ -Cadinene	1523	SH	0.88	0.82	1.81	-	-	-
<i>trans</i> -Calamenene	1529	SH	-	-	-	-	-	1.03
<i>trans</i> -Cadina-1.4 diene	1535	SH	0.06	-	0.11	-	-	0.10
α -Cadinene	1539	SH	-	0.11	-	-	-	0.60
β -Atlantol	1608	SH	-	-	-	-	0.01	0.39
Procentat determinacije			94.57		93.06	94.90	98.04	88.98

KI – Kovačev indeks; MH – monoterpenski ugljovodonici; OMHD – oksigenovani monoterpenski ugljovodonici; R – ostala jedinjenja; SH – seskviterpenski ugljovodonici;

3.1.1.8 Statistička obrada sastava etarskih ulja

Statistička obrada sastava etarskih ulja podsekcije *Alternantes*

Pearsonov koeficijent korelacije za pet sastojaka etarskog ulja koji prelaze 10%, dat je u tabeli 3.6. Iz tabele se vidi da ni u jednom slučaju ne postoji statistički značajna korelacija ($P < 0,5$) između posmatranih sastojaka.

Tabela 3.6 Korelacije između pet najzastupljenijih komponenti etarskog ulja podsekcije *Alternantes*

	p-Cimen	γ - pinen	geraniol	Timol	Karvakrol
p-Cimen	1,00	ns	ns	ns	ns
γ -pinen	-0,19	1,00	ns	ns	ns
geraniol	-0,72	-0,46	1,00	ns	ns
Timol	0,05	0,65	-0,67	1,00	ns
Karvakrol	0,55	-0,13	-0,36	-0,30	1,00

ns - nema značaj, * ($0.05 < p < 0.01$), ** ($p < 0.01$)

Analiza glavnih komponenti (PCA) pokazala je da su dve glavne komponente imale utvrđenu sopstvenu vrednost (*eigenvalues*) veću od 1,0 i da su zajedno objašnjavale 84,23% ukupne varijanse (Tabela 3.7). Na grafiku 3.1 prikazan je biplot na temelju prve i druge ose. Na grafiku se vidi da je PC1 razdvajala populacije bogate geraniolom od ostalih i da je PC2 razdvajala one koje su imale visoku koncentraciju timola i γ -terpinena od onih bogatih karvakrolom i p-cimenom.

Grafik 3.1 Biplot dobijen Analizom glavnih komponenti na osnovu pet najzastupljenija jedinjenja etarskog ulja analizirane kod podsekcije *Alternantes*. Prikaz odnosa komponenti i populacija dat je u odvojenim biplotovima, oznake populacija odgovaraju tabeli 2.1.

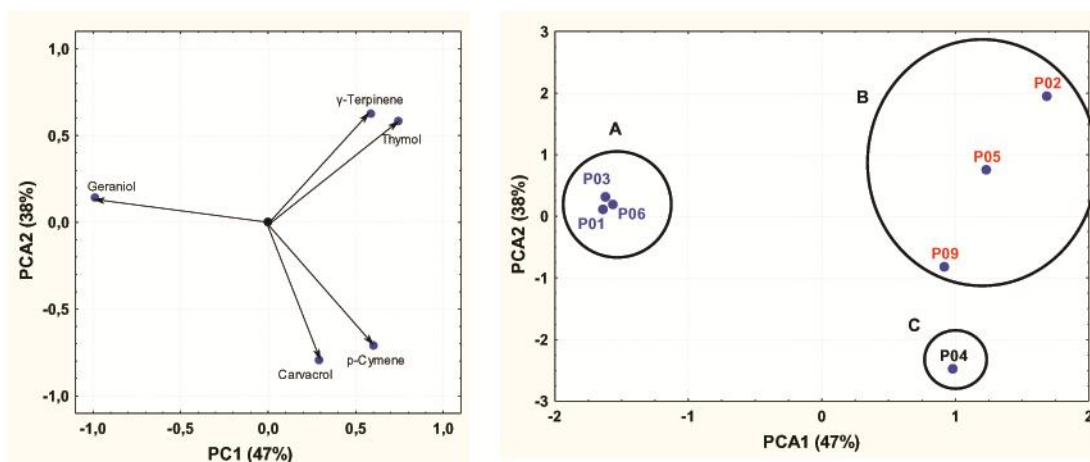


Tabela 3.7 Sopstvene vrednosti korelacione matrice i statistički podaci za komponente etarskog ulja podsekcije *Alternantes*

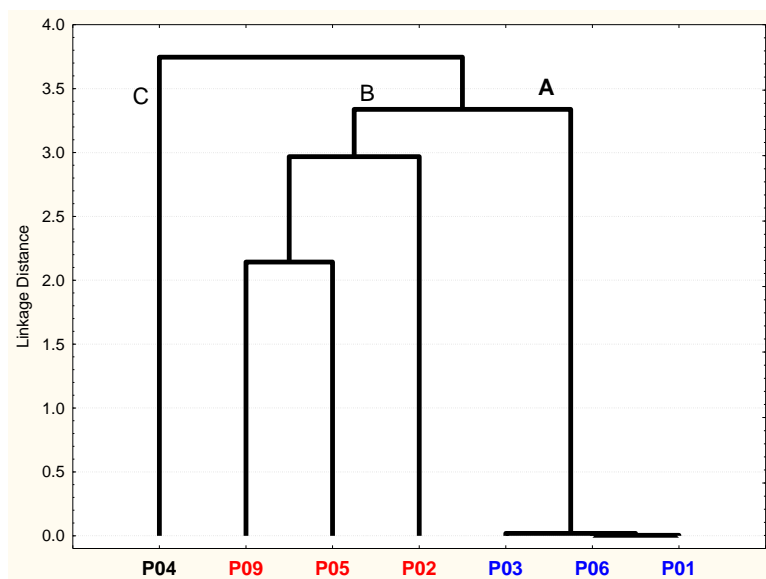
	Sopstvena vrednost	% Totalna varijansa	Cumulative %
1	2.326429	46.52858	46.5286
2	1.885059	37.70117	84.2297

Na osnovu pet procentualno najzastupljenijih sastojaka etarskih ulja izračunata je Euklidska udaljenost između populacija (Tabela 3.8). Prosečna Euklidska udaljenost je bila 2,89, dok je raspon bio od 0,001, između populacija **P01** i **P06**, do 4,51 između populacija **P02** i **P04**. Slični rezultati su dobijeni i primenom klaster analize, grupisanje populacija u klastere je prikazano na UPGMA dendrogramu (Slika 3.1).

Tabela 3.8 Matrica Euklidskih distanci između populacija podsekcije *Alternantes* na osnovu 15 najzastupljenijih sastojaka etarskog ulja.

	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P09
P01	0,00	3,83	0,02	3,83	3,10	0,00	3,07
P02	3,83	0,00	3,84	4,51	2,36	3,83	3,58
P03	0,02	3,84	0,00	3,84	3,11	0,02	3,09
P04	3,83	4,51	3,84	0,00	3,68	3,83	2,79
P05	3,10	2,36	3,11	3,68	0,00	3,10	2,14
P06	0,00	3,83	0,02	3,83	3,10	0,00	3,07
P09	3,07	3,58	3,09	2,79	2,14	3,07	0,00

Slika 3.1 Dendrogram UPGMA na osnovu Euklidskih udaljenosti između populacija podsekcije *Alternantes*.



Statistička obrada sastava etarskih ulja podsekcije *Isolepides*

Pearsonov koeficijent korelacije za petnaest sastojaka etarskog ulja koji prelaze 10%, dat je u tabeli 3.9. Visoka korelacija postoji u osam slučajeva pri pragu značajnosti $P < 0,05$, odnosno u šest slučajeva pri pragu značajnosti $P < 0,01$. Geranial je bio značajno ($r=1,00$; $P < 0,01$) pozitivno korelisan sa neralom, α -terpineol je bio značajno ($r=1,00$; $P < 0,01$) pozitivno korelisan sa E- γ -bisabolenom. α -terpineol je bio značajno ($r=0,94$; $P < 0,01$) pozitivno korelisan sa mircenom, E- γ -bisabolen je bio značajno ($r=0,94$; $P < 0,01$) pozitivno korelisan sa mircenom, (E)-kariofilen je bio

značajno ($r=0,80$; $P<0,01$) pozitivno korelisan sa limonenom i (E)- β -ocimen je bio značajno ($r=0,64$; $P<0,01$) pozitivno korelisan sa α -pinenom. γ -terpinen je bio značajno ($r=0,57$; $P<0,05$) pozitivno korelisan sa timolom, a limonen je bio značajno ($r=0,59$; $P<0,05$) pozitivno korelisan sa (E)- β -ocimenom. Linalool, *p*-cimen, timol metil etar i germakren-D nisu bili u značajnoj korelaciji ($P>0,5$) ni sa jednim glavnim sastojkom etarskog ulja.

Tabela 3.9 Korelacije između pet najzastupljenijih komponenti etarskog ulja podsekcije *Isolepides*

	α -Pinene	Myrcene	p-Cymene	Limonene	(E)- β -Ocimene	γ -Terpinene	Linalool	
α -Pinene	1.00	ns	ns	ns	***	ns	ns	
Myrcene	0.15	1.00	ns	ns	ns	ns	ns	
p-Cymene	-0.25	-0.23	1.00	ns	ns	ns	ns	
Limonene	0.25	-0.03	-0.20	1.00	*	ns	ns	
(E)- β -Ocimene	0.64	0.26	-0.32	0.59	1.00	ns	ns	
G-Terpinene	-0.29	-0.22	0.13	-0.23	-0.38	1.00	ns	
Linalool	-0.09	-0.12	-0.15	-0.11	-0.16	-0.18	1.00	
α -Terpineol	-0.08	0.94	-0.14	-0.08	0.02	-0.16	-0.06	
Thymol methyl ether	-0.21	-0.21	0.48	-0.18	-0.31	0.47	-0.15	
Neral	-0.15	-0.12	-0.13	-0.11	-0.16	-0.16	-0.07	
Geranial	-0.15	-0.12	-0.13	-0.11	-0.16	-0.16	-0.07	
Thymol	-0.34	-0.24	0.02	-0.26	-0.42	0.57	-0.20	
(E)-Caryophyllene	-0.13	0.13	-0.24	0.80	0.27	-0.29	-0.08	
Germacrene-D	0.47	0.06	-0.30	-0.11	0.22	-0.35	-0.13	
(E)- γ -Bisabolene	-0.08	0.94	-0.14	-0.08	0.02	-0.16	-0.07	
	α -Terpineol	Thymol methyl ether	Neral	Geranial	Thymol	(E)-Caryophyllene	Germacrene-D	(E)- γ -Bisabolene
α -Pinene	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Myrcene	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***
p-Cymene	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Limonene	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns
(E)- β -Ocimene	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
γ -Terpinene	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
Linalool	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
α -Terpineol	1.00	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***
Thymol methyl ether	-0.14	1.00	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Neral	-0.07	-0.14	1.00	***	ns	ns	ns	ns

	α -Terpineol	Thymol methyl ether	Neral	Geranial	Thymol	(E)-Caryophyllene	Germacrene-D	(E)- γ -Bisabolene
Geranial	-0.07	-0.14	1.00	1.00	ns	ns	ns	ns
Thymol	-0.18	0.14	-0.18	-0.18	1.00	ns	ns	ns
(E)-Caryophyllene	0.16	-0.24	-0.14	-0.14	-0.30	1.00	ns	ns
Germacrene-D	-0.06	-0.29	-0.14	-0.14	-0.39	0.02	1.00	ns
(E)- γ -Bisabolene	1.00	-0.14	-0.07	-0.07	-0.18	0.17	-0.06	1.00

Tabela 3.9 Nastavak; ns - nema znacaj, * (0.05<p<0.01), ** (p<0.01)

PCA analiza glavnih komponenti pokazala je da šest komponenti ima sopstvene vrednosti (*eigenvalues*) veće od 1,00 i da su zajedno objašnjavale 85,97% ukupne varijanse (Tabela 3.10). Na grafiku 3.2 prikazani su biploti na osnovu prve i druge ose, treće i četvrte i pete i šeste ose. PC1 razdvaja populacije bogate timolom, γ -terpinenom, timol metil etrom i *p*-cimenom od ostalih populacija, dok PC2 odvaja one bogate E- γ -bisabolenom, α -terpineolom i mircenom od onih bogatih sa (E)-kariofilenom, germakrenom-D, α -pinenom, (E)- β -ocimenom i limonennom. PC3 razdvaja populacije sa citralom (neral i geranial), dok PC4 odvaja populacije sa (E)-kariofilenom. Populacije bogate linaloolom odvaja PC5, a PC6 razdvaja populacije sa visokim sadržajem *p*-cimena i timol metil etra od onih koje sadrže visoke koncentracije γ -terpinena i timola. PCA nije pokazala da se populacija **P19** izdvaja ni po jednoj komponenti.

Tabela 3.10 Sopstvene vrednosti korelacione matrice i statistički podaci za komponente etarskog ulja podsekcije *Isolepides*

	Sopstvena vrednost	% Totalne varijanse	Kumulativni %
1	3,771647	25,14431	25,1443
2	2,707895	18,05263	43,1969
3	2,270200	15,13466	58,3316
4	1,669963	11,13309	69,4647
5	1,271889	8,47926	77,9440
6	1,203106	8,02071	85,9647

Na osnovu petnaest najzastupljenijih komponenti etarskih ulja izračunata je Euklidska udaljenost između populacija (Tabela 3.11). Prosečna Euklidska udaljenost među populacijama *Th. glabrescens* je bila 3,11, dok je raspon bio od 0,43, između populacija **P10** i **P14**, do 5,18 između populacija **P15** i **P33**. Prosečna Euklidska udaljenost među populacijama *Th. marschallianus* je bila 3,90, dok je raspon bio od 2,41, između populacija P16 i P17, do 3,29 između populacija **P16** i **P18**. Prosečna Euklidska udaljenost među populacijama *Th. pannonicus* je bila 6,51, dok je raspon bio od 3,26, između populacija **P19** i **P20**, do 9,05 između populacija **P23** i **P34**.

Grafik 3.2. Biplot dobijen Analizom glavnih komponenti na osnovu pet najzastupljenija jedinjenja etarskog ulja analizirane kod podsekcije *Isolepides*. Prikaz odnosa komponenti i populacija dat je u odvojenim biplotovima, oznake populacija odgovaraju tabeli 2.1.

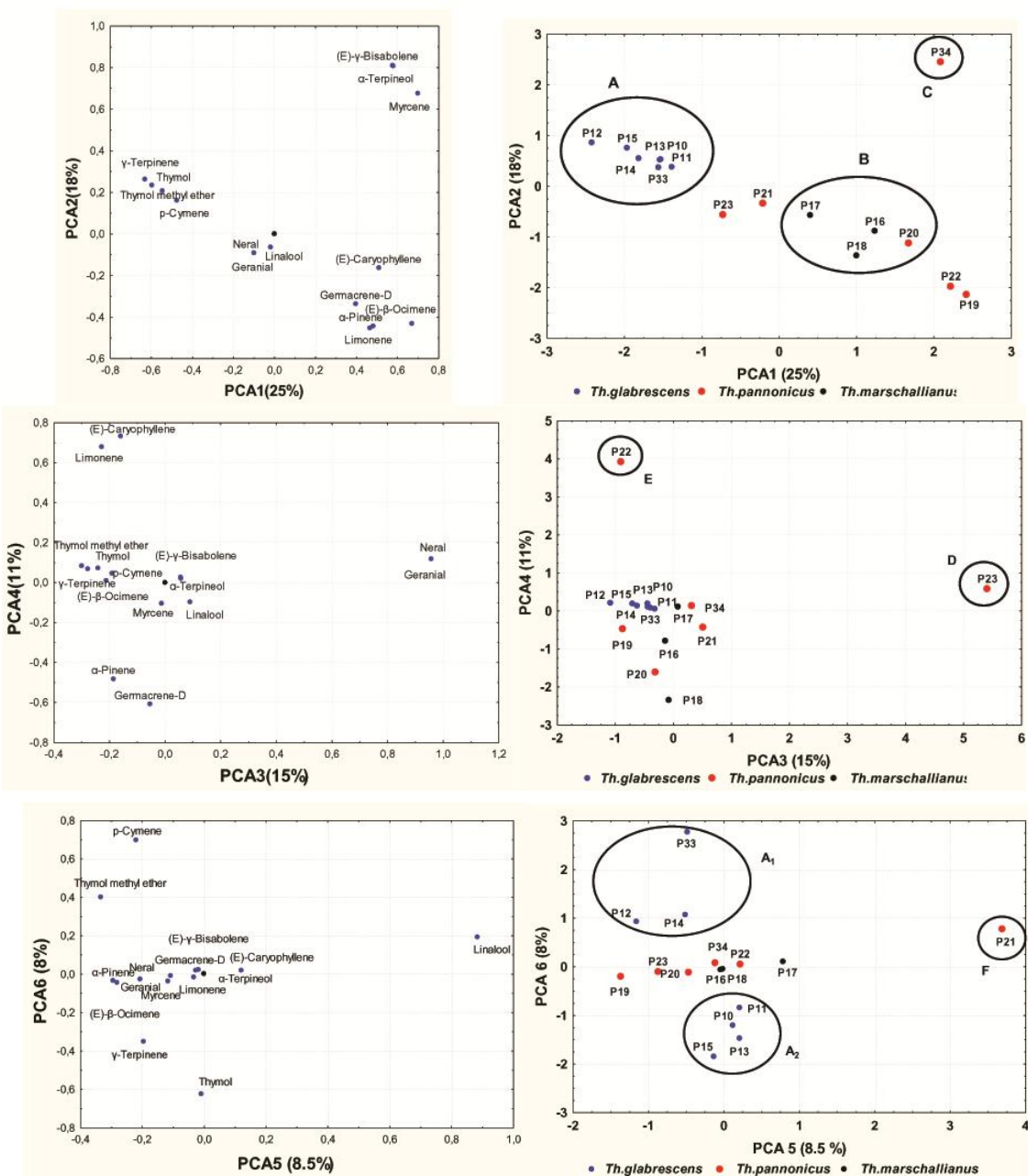
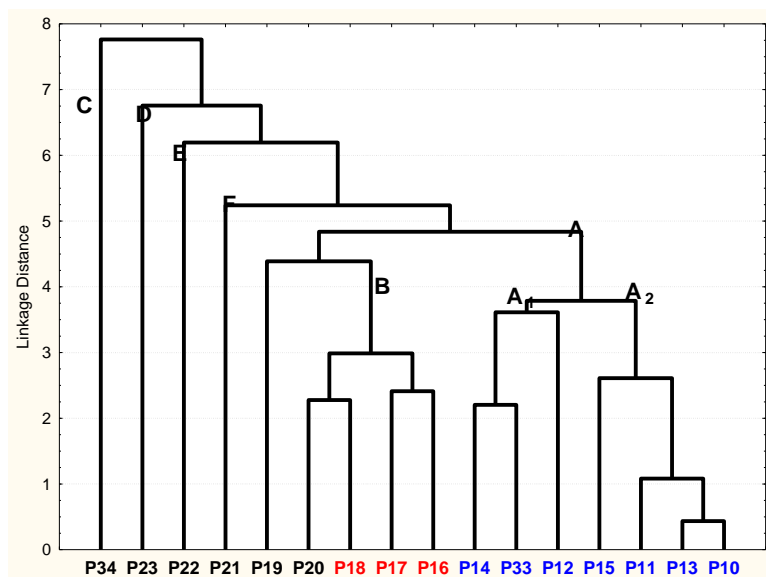


Tabela 3.11 Matrica Euklidskih distanci između populacija podsekcije *Isolepides* na osnovu 15 najzastupljenijih sastojaka etarskog ulja.

	P10	P11	P12	P13	P33	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P34
P10	0,00	1,13	3,94	0,43	4,14	2,51	2,17	3,95	3,16	4,72	5,67	4,29	4,83	6,17	6,25	7,45
P11	1,13	0,00	4,17	1,03	4,00	2,79	3,29	3,95	3,14	4,69	5,65	4,29	4,80	6,17	6,24	7,50
P12	3,94	4,17	0,00	4,13	4,45	2,78	4,09	5,42	4,86	5,95	6,69	5,62	6,08	7,19	7,28	8,35
P13	0,43	1,03	4,13	0,00	4,45	2,87	2,38	4,09	3,29	4,85	5,81	4,45	4,94	6,20	6,34	7,53
P33	4,14	4,00	4,45	4,45	0,00	2,20	5,18	4,86	4,22	5,49	6,36	5,18	5,57	6,78	6,84	8,05
P14	2,51	2,79	2,78	2,87	2,20	0,00	3,19	4,19	3,42	4,88	5,80	4,49	4,99	6,30	6,39	7,63
P15	2,17	3,29	4,09	2,38	5,18	3,19	0,00	4,80	4,21	5,47	6,31	5,11	5,55	6,77	6,83	7,94
P16	3,95	3,95	5,42	4,09	4,86	4,19	4,80	0,00	2,41	3,29	4,09	2,43	4,92	5,40	6,39	6,93
P17	3,16	3,14	4,86	3,29	4,22	3,42	4,21	2,41	0,00	3,23	5,06	3,00	4,12	4,74	5,94	6,96
P18	4,72	4,69	5,95	4,85	5,49	4,88	5,47	3,29	3,23	0,00	5,13	2,28	5,54	6,58	6,89	7,80
P19	5,67	5,65	6,69	5,81	6,36	5,80	6,31	4,09	5,06	5,13	0,00	3,26	6,36	5,66	7,63	7,94
P20	4,29	4,29	5,62	4,45	5,18	4,49	5,11	2,43	3,00	2,28	3,26	0,00	5,17	5,78	6,65	6,92
P21	4,83	4,80	6,08	4,94	5,57	4,99	5,55	4,92	4,12	5,54	6,36	5,17	0,00	6,81	6,95	8,06
P22	6,17	6,17	7,19	6,20	6,78	6,30	6,77	5,40	4,74	6,58	5,66	5,78	6,81	0,00	7,99	8,32
P23	6,25	6,24	7,28	6,34	6,84	6,39	6,83	6,39	5,94	6,89	7,63	6,65	6,95	7,99	0,00	9,05
P34	7,45	7,50	8,35	7,53	8,05	7,63	7,94	6,93	6,96	7,80	7,94	6,92	8,06	8,32	9,05	0,00

Grupisanje populacija u klastere je prikazano na UPGMA dendrogramu (Slika 3.2). Grupisanje populacija u klastere u saglasnosti je sa rezultatima PCA.



Slika 3.2 Dendrogram UPGMA na osnovu Euklidskih udaljenosti između populacija podsekcije *Isolepides*

Statistička obrada sastava etarskih ulja podsekcije *Pseudomarginati*

Pearsonov koeficijent korelacije za deset komponenti etarskog ulja koje prelaze 10%, dat je u tabeli 3.12. Visoka korelacija postoji u četiri slučaja pri pragu značajnosti $P < 0,05$, odnosno u tri slučaja pri pragu značajnosti $P < 0,01$. Geranila je bio značajno ($r = 1,00$; $P < 0,01$) pozitivno korelisan sa neralom, neril acetat je bio značajno ($r = 0,97$; $P < 0,01$) pozitivno korelisan sa neralom i geranialom. (E)-kariofilen je bio značajno ($r = 0,90$; $P < 0,05$) pozitivno korelisan sa γ -kadinenom. Mircen, linalool, linalil acetat, α -terpinil acetat i biciklogermakren nisu bili u značajnoj korelaciji ($P < 0,5$) ni sa jednom glavnom komponentom etarskih ulja.

Tabela 3.12 Korelacije između pet najzastupljenijih komponenti etarskog ulja podsekcije *Pseudomarginati*

	Myrcene	Linalool	Neral	Linalyl acetate	Geranial	α -Terpinyl acetate	Neryl acetate	(E)-Caryophyllene	Bicyclogermacrene	G-Cadinene
Myrcene	1.00	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Linalool	0.68	1.00	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Neral	-0.33	-0.38	1.00	ns	***	ns	***	ns	ns	ns
Linalyl acetate	0.60	0.60	-0.40	1.00	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Geranial	-0.34	-0.38	1.00	-0.40	1.00	ns	***	ns	ns	ns
α -Terpinyl acetate	-0.35	-0.38	-0.20	-0.40	-0.20	1.00	ns	ns	ns	ns
Neryl acetate	-0.15	-0.17	0.97	-0.36	0.97	-0.28	1.00	ns	ns	ns
(E)-Caryophyllene	-0.24	-0.48	-0.03	-0.22	-0.03	-0.40	-0.14	1.00	ns	*
Bicyclogermacrene	-0.19	0.10	0.02	0.65	0.02	-0.34	-0.09	0.00	1.00	ns
G-Cadinene	-0.49	-0.42	-0.05	-0.44	-0.05	-0.25	-0.15	0.90	-0.06	1.00

ns - nema značaj, * (0.05<p<0.01), ** (p<0.01)

PCA analiza glavnih komponenti pokazala je da četiri komponente imaju svojstvene vrednosti (*eigenvalues*) veće od 1,00 i da su zajedno objašnjavale 95,72% ukupne varijanse (Tabela 3.13). Na grafiku 3.3 prikazan je biplot na osnovu prve i druge ose i treće i četvrte ose. PC1 je odvajala populacije sa linalil acetatom i linaloolom, PC2 populacije sa citralom (neral i geranial). PC3 je odvajala populacije sa α -terpinil acetatom, PC4 populacije sa biciklogermakrenom.

Grafik 3.3. Biplot dobijen Analizom glavnih komponenti na osnovu deset najzastupljenija jedinjenja etarskog ulja analizirane kod podsekcije *Pseudomarginati*. Prikaz odnosa komponenti i populacija dat je u odvojenim biplotovima, oznake populacija odgovaraju tabeli 2.1.

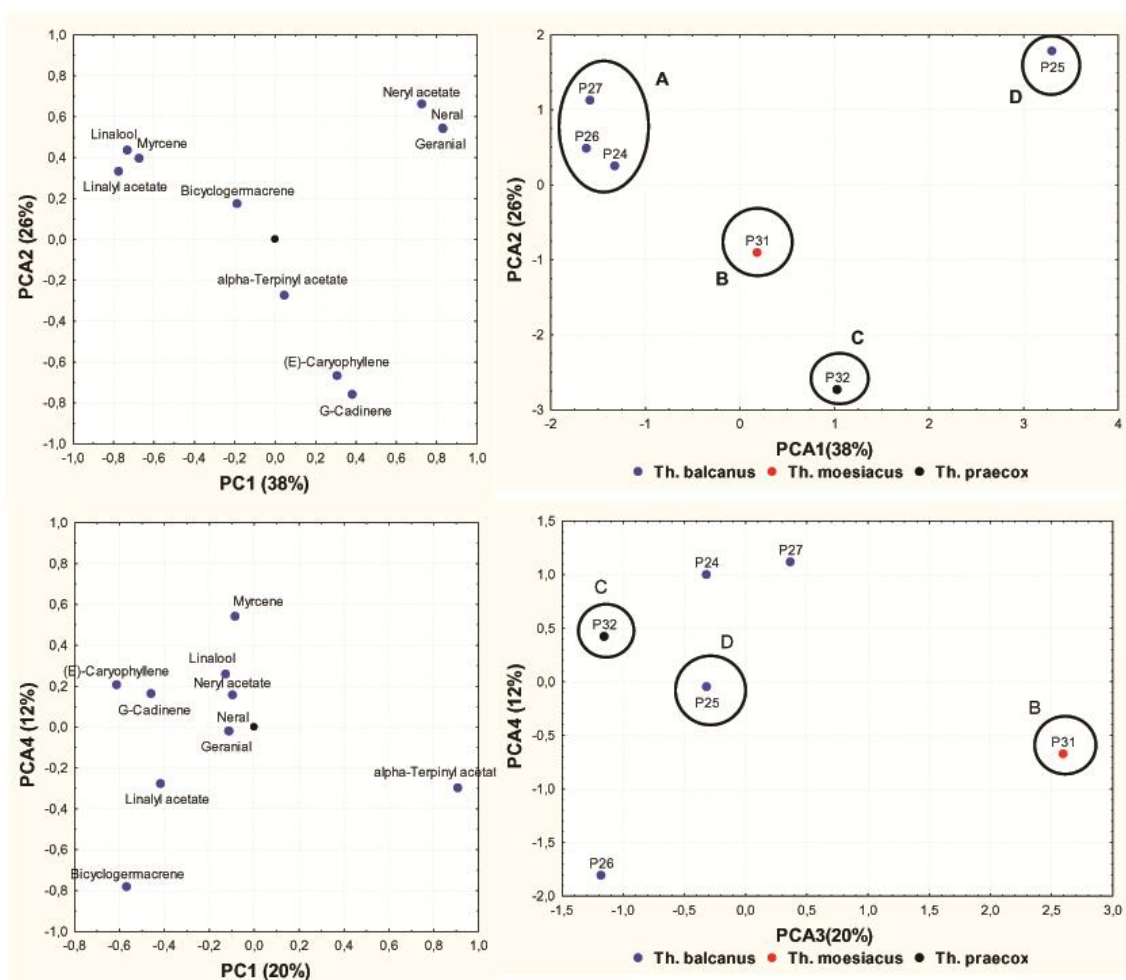


Tabela 3.13 Sopstvene vrednosti korelacione matrice i statistički podaci za komponente etarskog ulja podsekcije *Pseudomarginati*

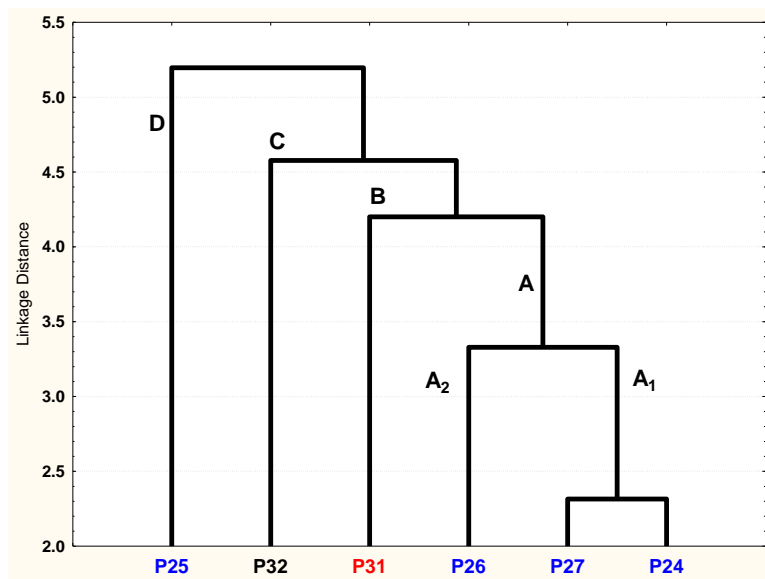
	Sopstvena vrednost	% Totalne varijanse	Kumulativni %
1	3.774681	37.74681	37.7468
2	2.605924	26.05924	63.8061
3	1.960076	19.60076	83.4068
4	1.231002	12.31002	95.7168

Na osnovu deset najzastupljenijih komponenti etarskih ulja izračunata je Euklidska udaljenost između populacija (Tabela 3.14). Prosečna Euklidska udaljenost za populacije vrste je *Th. balcanus* je bila 4,12, dok je raspon bio od 2,32, između **P24** i **P27**, do 5,46, među populacijama **P25** i **P26**. Kod vrsta *Th. moesiacus* i *Th. praecox* uzorkovana je samo jedna populacija, tako da se Euklidske udaljenosti ne mogu računati.

Tabela 3.14 Matrica Euklidskih distanci između populacija podsekcije *Isolepides* na osnovu 15 najzastupljenijih sastojaka etarskog ulja.

	P24	P25	P26	P27	P31	P32
P24	0,00	5,09	3,18	2,32	3,98	4,17
P25	5,09	0,00	5,46	5,20	5,08	5,16
P26	3,18	5,46	0,00	3,48	4,56	4,74
P27	2,32	5,20	3,48	0,00	4,06	4,99
P31	3,98	5,08	4,56	4,06	0,00	4,41
P32	4,17	5,16	4,74	4,99	4,41	0,00

Grupisanje populacija u klastere je prikazano na UPGMA dendrogramu (Slika 3.3), i pokazalo je da grupisanje populacija u klastere odgovara onom u PCA.



Slika 3.3. Dendrogram UPGMA na osnovu Euklidskih udaljenosti između populacija podsekcije *Pseudomarginati*

3.1.2 Površinski flavonoidi

Identifikovani površinski flavonoidi, njihova LC-MS retenciona vremena, UV spektar i maseni APCI spektar su poređeni sa onima kod vrsta roda *Thymus* iz Makedonije (Marin i sar., 2003) i dati u Tabeli 3.15. U tabeli 3.15 flavoni su grupisani u šest grupa, prema modelu substitucija u A prstenu. Ovi modeli substitucija često su od značaja za taksonomska ispitivanja (Tomás-Barberán i Gill, 1992; Grayer i sar., 2001).

Distribucija površinskih flavona i flavanona u ispitivanim populacijama vrsta roda *Thymus* je data u Tabeli 3.16. Ova tabela jedata u skladu sa tabelom koju je dao Hernández i sar. (1987), koji je proučavao vrste roda *Thymus* sa Pirinejskog poluostrva, i prikazuje najzastupljenije, drugo po zastupljenosti, kao i ostala prisutna jedinjenja. Apsolutna količina najzastupljenijeg flavona je prikazana u posebnoj koloni. Tri ispitavne populacije vrste *Th. balcanus* su proizvele površinske flavonoide samo u tragovima, dok se kod svih ostalih uzoraka produkcija ovih jedinjenja kretala između niske i srednje. Unekim uzorcima je takođe utvrđeno i prisustvo flavanona, koje je u pojedinim slučajevima bilo veoma visoko. Prisustvo eriodiktiola je utvrđeno u jednoj populaciji vrste *Th. marschallianus*. Osim ovog flavanona utvrđeno je i prisustvo još tri

metoksilovana flavanona, dihidroksi-tetrametoksiflavanon ($R_t=15,2$ min; $MH^+=347$), 5-hidroksi-6, 7, 4'-trimetoksi flavanon ($R_t=17,2$ min; $Mh^+=331$) i 5- hidroksi -6, 7, 8, 4'-tetrametoksi flavanoe ($R_t=1742$ min; $MH=361$). Svi ovi flavanoni su bili prisutni kod vrsta iz podsekcije *Isolepides*, sa izuzetkom *Th. praecox* kod koga je ustanovljeno veoma visoko prisustvo 5- hidroksi -6, 7, 8, 4'-tetrametoksi flavanoe.

Tabela 3.15 LC-MS retenciona vremena, HPLC UV absorpcioni maksimumi i podaci APCI-masenog spektra za površinske flavonoide kod vrsta roda *Thymus*.

Komp.	Tip supstitucije u A prstenu i naziv flavona	R_t (min) (LC-MS)	UV λ_{max} (nm)	MH^+ (m/z)
5,7-diOH and 5,6,7-triOH flavoni				
1	5,7,3',4'-tetraOH flavone (luteolin)	13.6	255, 347	287
2	5,7,4'-triOH flavone (apigenin)	14.9	268, 340	271
5-OH-7-OMe flavoni				
3	5,4'-OH-7-OMe (genkwanin)	17.4	268, 336	285
5,6-diOH-7-OMe flavoni				
4	5,6,4'-triOH-7,3'-diOMe or 5,6,3'-triOH-7,4'-diOMe	13.7	284, 336	331
5	5,6,-diOH-7,3',4'-triOMe	15.0	284, 344	345
6	5,6-diOH-7,4'-diOMe (ladanein)	16.1	288, 332	315
5,6-diOH-7,8-diOMe flavoni				
7	5,6,4'-triOH-7,8-diOMe (thymusin)	14.6	296, 336	331
8	5,6,4'-triOH-7,8,3'-triOMe (thymonin)	14.6	288, 348	361
9	5,6-diOH-7,8,3'4'-tetraOMe	15.9	288, 344	375
10	5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin)	17.0	296, 332	345
5-OH-6,7-diOMe flavoni				
11	5,4'-diOH-6,7-diOMe (cirsimaritin)	15.9	275, 336	315
12	5-OH-6,7,4'-triOMe (salvigenin)	17.8	276, 332	329
5-OH-6,7,8-triOMe flavoni				
13	5,4'-diOH-6,7,8-triOMe (xanthomicrol)	16.8	280, 332	345
14	5-OH-6,7,8,3',4'-pentaOMe (5-desmethylnobiletin)	17.8	282, 336	389
15	5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B)	18.7	284, 332	359

Tabela 3.16 Distribucija površinskih flavona i flavanona kod analiziranih vrsta roda *Thymus* iz Srbije.

Takson	Conc ^a	Površinski flavoni														Površinski flavanoni ^b	
		Lute	Apig	Genk	5,6-diOH-7-OMe			5,6-diOH-7,8-diOMe				5-OH-6,7-diOMe		5-OH-6,7,8-triOMe			
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
Subsect. <i>Alternantes</i>																	
<i>Th. pulegioides</i> P01	l	+++				++				++							
<i>Th. pulegioides</i> P02	m				+	+++	+			++				+			
<i>Th. pulegioides</i> P03	m	++	+			+++	+			++				+			
<i>Th. pulegioides</i> P04	l	++				+++				++	+						
<i>Th. pulegioides</i> P03	m	++	+			+++	+			++				+			
<i>Th. pulegioides</i> P05	l			+	+	+++	+			++							
<i>Th. pulegioides</i> P06	l	+				++	+		++	+++							
<i>Th. pulegioides</i> P09	m				+	+++	+			++				+			
Subsect. <i>Isolepides</i>																	
<i>Th. glabrescens</i> P10	m			+	+	+++	++		+	++	+						
<i>Th. glabrescens</i> P11	l			+	+	+++	+		+	++	++						

Takson	Conc ^a	Površinski flavoni														Površinski flavanoni ^b	
		Lute	Apig	Genk	5,6-diOH-7-OMe			5,6-diOH-7,8-diOMe				5-OH-6,7-diOMe		5-OH-6,7,8-triOMe			
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
<i>Th. glabrescens</i> P12	l			+		++	++			+	+++						
<i>Th. glabrescens</i> P13	m				+	+++	++			++	+						
<i>Th. glabrescens</i> P14	l					+++	++			+	+						
<i>Th. glabrescens</i> P15	l	+				+++	++		+	++	+						
<i>Th. glabrescens</i> P33	l	+				+++	++			++	+						
<i>Th. marschallianus</i> P16	l										+		++			+++	
<i>Th. marschallianus</i> P17	l												+++	+		++	
<i>Th. marschallianus</i> P18	l											+	+++	+		++	E, M
<i>Th. pannonicus</i> P19	l		+								+		+++			++	M
<i>Th. pannonicus</i> P20	l		+										+++			++	M
<i>Th. pannonicus</i> P21	l										+				+		M
<i>Th. pannonicus</i>	l		+											+		+	M

Takson	Conc ^a	Površinski flavoni															Površinski flavanoni ^b
		Lute	Apig	Genk	5,6-diOH-7-OMe			5,6-diOH-7,8-diOMe				5-OH-6,7-diOMe		5-OH-6,7,8-triOMe			
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
P22																	
<i>Th. pannonicus</i> P23	m			+	++	++		+++			+						
<i>Th. pannonicus</i> P34	l										++						+++
Subsect. <i>Pseudomarginati</i>																	
<i>Th. balcanus</i> P24	tr									++	+++						
<i>Th. balcanus</i> P25	tr									++	+++						
<i>Th. balcanus</i> P26	l			+						++	+++						
<i>Th. balcanus</i> P27	tr									+++	+++						
<i>Th. moesiacus</i> P31	l	++		+						+	+						
<i>Th. praecox</i> P32	l												++			+	M

+++ Flavoni sa najvećom UV absorpcijom na 335 nm u HPLC očitavanju ekstrakta; ++ Flavoni sa drugom po veličini UV absorpcijom na 335 nm u HPLC očitavanju ekstrakta; +minorni flavon u ekstraktu; Videti tabelu 3.10 za imena površinskih flavona 1–15. ^aConc, koncentracija flavonoida; h, visoka (UV absorpcija najvišeg HPLC pika u ekstraktu je >1.0 Absorpcione Jedinice AU); m, srednja (UV absorpcija najvišeg pika u ekstraktu je 0.1–1.0 AU); l, niska (UV absorpcija najvišeg pika u ekstraktu je 0.01–0.1 AU); tr, u tragovima (UV absorpcija najvišeg pika u ekstraktu je <0.01 AU). ^bFlavanoni: E, eriodictyol; M, metoksilovani flavanoni (nekoliko različitih jedinjenja, MH⁺m/z 331, 347 i 361).

3.2 AFLP markeri

Osam kombinacija prajmera dalo je ukupno 2591 polimorfni marker u setu od 83 ispitaivana uzorka *Thymus*-a. Najveći i najmanji udeo polimorfnih traka kao i Šenonov informacioni indeks je utvrđen kod *Th. pulegioides*, odnosno *Th. praecox* (Tabela 3.17). Particija Šenonovog indeksa je pokazala da je totalni diverzitet (H_t) bio 0,488, dok je prosečni diverzitet unutar vrsta (H_{sp}) bio 0,355. Proporcija diverziteta unutar vrsta (72.61%) je bila znatno viša nego proporcija diverziteta među vrstama (27.39%).

Table 3.17 Molekularni diverzitet dobijen od 2591 AFLP markera kod kod sedam vrsta roda *Thymus*

Vrsta (Podsekcija*)	n	%P	N_{pr}	H_j (stdev)
<i>Th. pulegioides</i> (A)	25	73.41	80	0.406 (0.332)
<i>Th. glabrescens</i> (I)	16	64.61	32	0.392 (0.346)
<i>Th. marschallianus</i> (I)	8	51.18	2	0.366 (0.380)
<i>Th. pannonicus</i> (I)	11	58.78	10	0.392 (0.366)
<i>Th. balcanus</i> (P)	14	64.76	26	0.403 (0.350)
<i>Th. moesiacus</i> (P)	6	40.06	7	0.314 (0.395)
<i>Th. praecox</i> (P)	3	22.69	7	0.208 (0.385)
Average	11.86	53.64	23.43	0.355 (0.072)
Total	83	100	164	0.488 (0.248)

n – veličina uzorka; %P – proporcija polimorfnih traka; N_{pr} – broj osobenih traka; H_j (stdev) - Shannonov informacioni indeks i njegova standardna devijacija

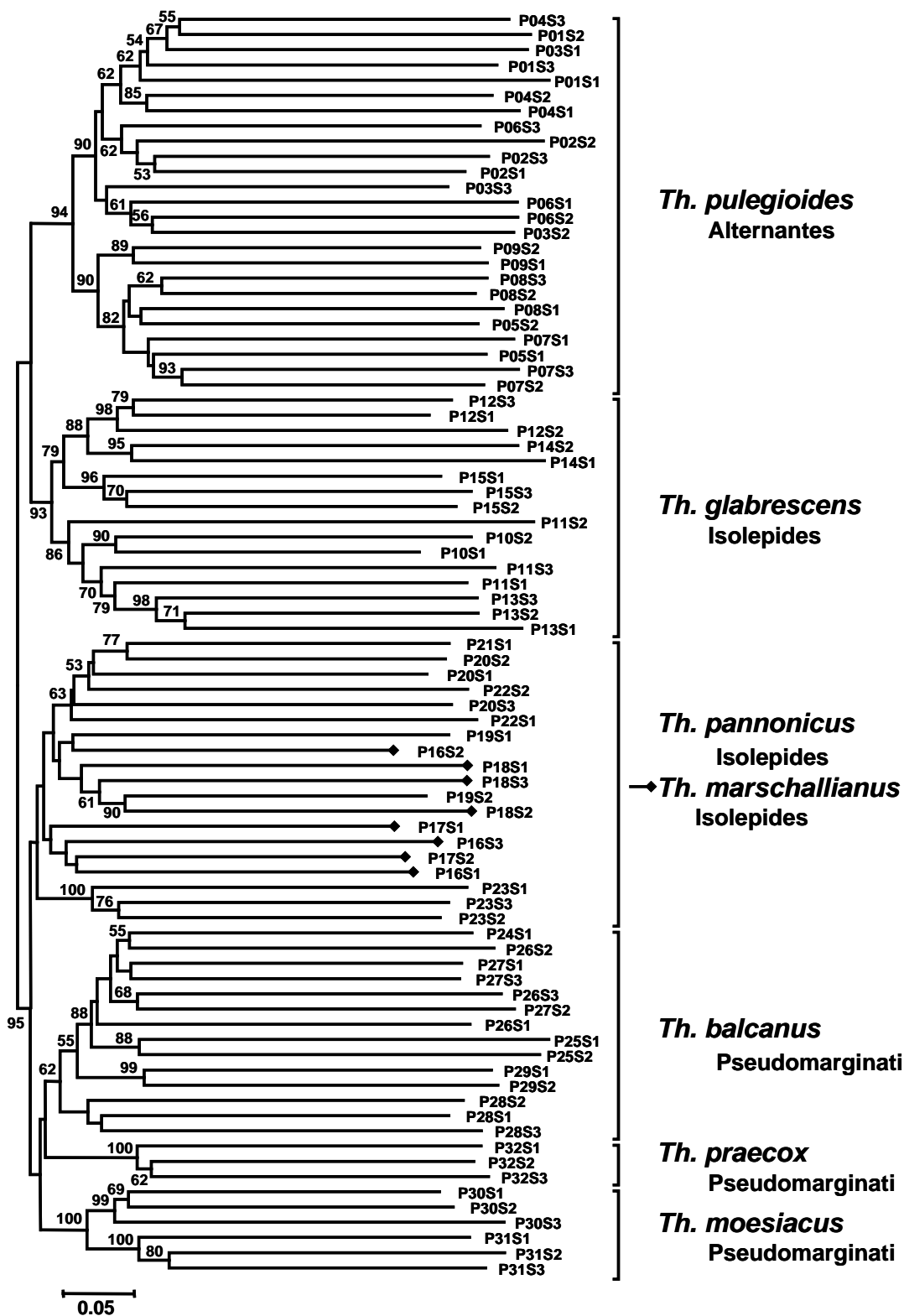
*Podsekcija: (A) *Alternantes*, (I) *Isolepides*, (P) *Pseudomarginati*

Nei i Lijeve distance zasnovane na AFLP podacima su se kretale od 0,43 do 0,76, sa prosečnom vrednošću od 0,62.

Tabela 3.18 Jednosmerna analiza molekularne varijanse (AMOVA) za prticiju AFLP varijacije između sedam vrsta roda *Thymus*, među populacijama unutar vrste i unutar populacija

Izvor varijacije	df	Komponenta varijacije	Procenat varijacije	ϕ -statistics	P(ϕ)
Among species	6	0.033	10.45	$\phi_{CT} = 0.104$	< 0.0001
Among populations within species	25	0.032	10.18	$\phi_{SC} = 0.114$	< 0.0001
Within populations	51	0.253	79.38	$\phi_{ST} = 0.206$	< 0.0001

P(ϕ) - ϕ -statistics probability level after 10,000 permutations



Slika. 3.4 Neighbor-joining stablo zasnovano na Nei i Lijevom distancionom matriksu izvedenom iz AFLP podataka za sedam vrsta roda *Thymus*. Bootstrap podrška vrednosti (BS; u procentima)

Dvosmerna Analiza molekularne varijanse (AMOVA) je pokazala da najviše genetičkog diverziteta proizilazi iz razlike među jedinkama unutar populacija (79.38%) (Tabela 3.18). Preostala varijabilnost bila je skoro podjednako distribuirana između vrsta (10.18%) i između populacija unutar vrsta (10.45%). Ipak, oba izvora varijabilnosti su imala veoma visoku značajnost ($P < 0.0001$).

Serijski jednosmernih AMOVA za svaku vrstu pokazala je da se komponenta varijabilnosti unutar vrste kretala od 85,5% kod *Th. glabrescens* do 92,3% kod *Th. marschallianus*, ukazujući da sve analizirane vrste imaju sličnu distribuciju međupopulacijske i unutarpopulacijske varijabilnosti (Tabela 3.19). U svim slučajevima ϕ_{ST} -vrednosti su imale visoku značajnost, potvrđujući postojanje populacione strukture.

Tabela 3.19 Jednosmerna analiza molekularne varijanse (AMOVA) za particiju AFLP varijacije između i unutar svake populacione komponente za svaku vrstu roda *Thymus*

Vrsta (Podsekcija*)	Procenat varijacije		ϕ -statistics	P(ϕ)
	Među populacijama	Unutar populacija		
<i>Th. pulegioides</i> (A)	11.15	88.85	0.112	<0.0001
<i>Th. glabrescens</i> (I)	14.46	85.54	0.145	<0.0001
<i>Th. marschallianus</i> (I)	7.68	92.32	0.077	<0.0001
<i>Th. pannonicus</i> (I)	9.11	90.89	0.091	0.002
<i>Th. balcanus</i> (P)	9.95	90.05	0.100	<0.0001
<i>Th. moesiacus</i> (P)	11.83	88.17	0.118	<0.0001

*Podsekcije: (A) Alternantes, (I) Isolepides, (P) Pseudomarginati

Uzajamne AMOVA analize (Tabela 3.20) su dalje pokazale da je diferencijacija među vrstama bila značajna u svim slučajevima ($P < 0.05$), osim između *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus* ($P = 0.07$).

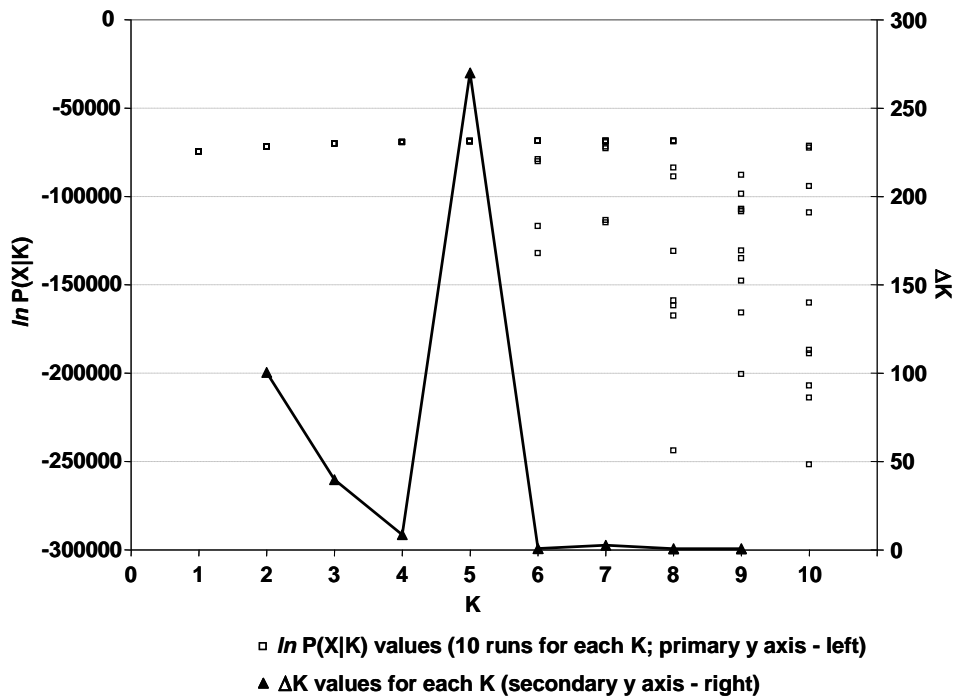
Neighbour-joining analiza (Slika 3.4) je pokazala tri dobro podržane klade: *Th. pulegioides* kladu (Bootstrap podrška [BS] od 94 %), *Th. glabrescens* klada (BS 93%), i klada koja je sadržavala preostale vrste (BS 95 %). Ova poslednja klada je sadržala dve nepodržane grupe, jednu koja je obuhvatala dve vrste iz podsekcije *Isolepides* (*Th. marschallianus*, *Th. pannonicus*) i drugu u kojoj su bile tri vrste iz podsekcije *Pseudomarginati* (*Th. balcanus*, *Th. moesiacus*, *Th. praecox*). Pojedinačne jedinice koje pripadaju *Th. pannonicus* i *Th. marschallianus* nisu se razdvojile u skladu sa pripadnošću vrstama. S drug strane, vrste iz podsekcije *Pseudomarginati* su bile jasno razdvojene i dobro podržane, *Th. praecox* i *Th. moesiacus* sa BS 100 % i *Th. balcanus* sa BS 62 %.

Tabela 3.20 Interspecijska ϕ_{ST} vrednost (ispod dijagonale) i srednja vrednost Nei i Lijeve distance (iznad dijagonale) među sedam vrsta roda *Thymus*. Srednja vrednost intraspecijske Nei i Lijeve distance data je u dijagonali (u kurzivu)

No.	Vrsta (Podsekcija)	Species						
		1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Th. pulegioides</i> (A)	<i>0.568</i>	0.659	0.635	0.647	0.651	0.661	0.646
2	<i>Th. glabrescens</i> (I)	0.130 ^{***}	<i>0.578</i>	0.616	0.627	0.660	0.657	0.667
3	<i>Th. marschallianus</i> (I)	0.128 ^{***}	0.094 ^{***}	<i>0.534</i>	0.551	0.604	0.592	0.603
4	<i>Th. pannonicus</i> (I)	0.132 ^{***}	0.097 ^{***}	0.013 ^{ns}	<i>0.553</i>	0.613	0.603	0.611
5	<i>Th. balcanus</i> (P)	0.122 ^{***}	0.126 ^{***}	0.080 ^{***}	0.079 ^{***}	<i>0.575</i>	0.612	0.624
6	<i>Th. moesiacus</i> (P)	0.168 ^{***}	0.157 ^{***}	0.109 ^{***}	0.108 ^{***}	0.100 ^{***}	<i>0.521</i>	0.629
7	<i>Th. praecox</i> (P)	0.163 ^{***}	0.180 ^{**}	0.148 ^{**}	0.137 ^{**}	0.130 ^{**}	0.199 [*]	<i>0.478</i>

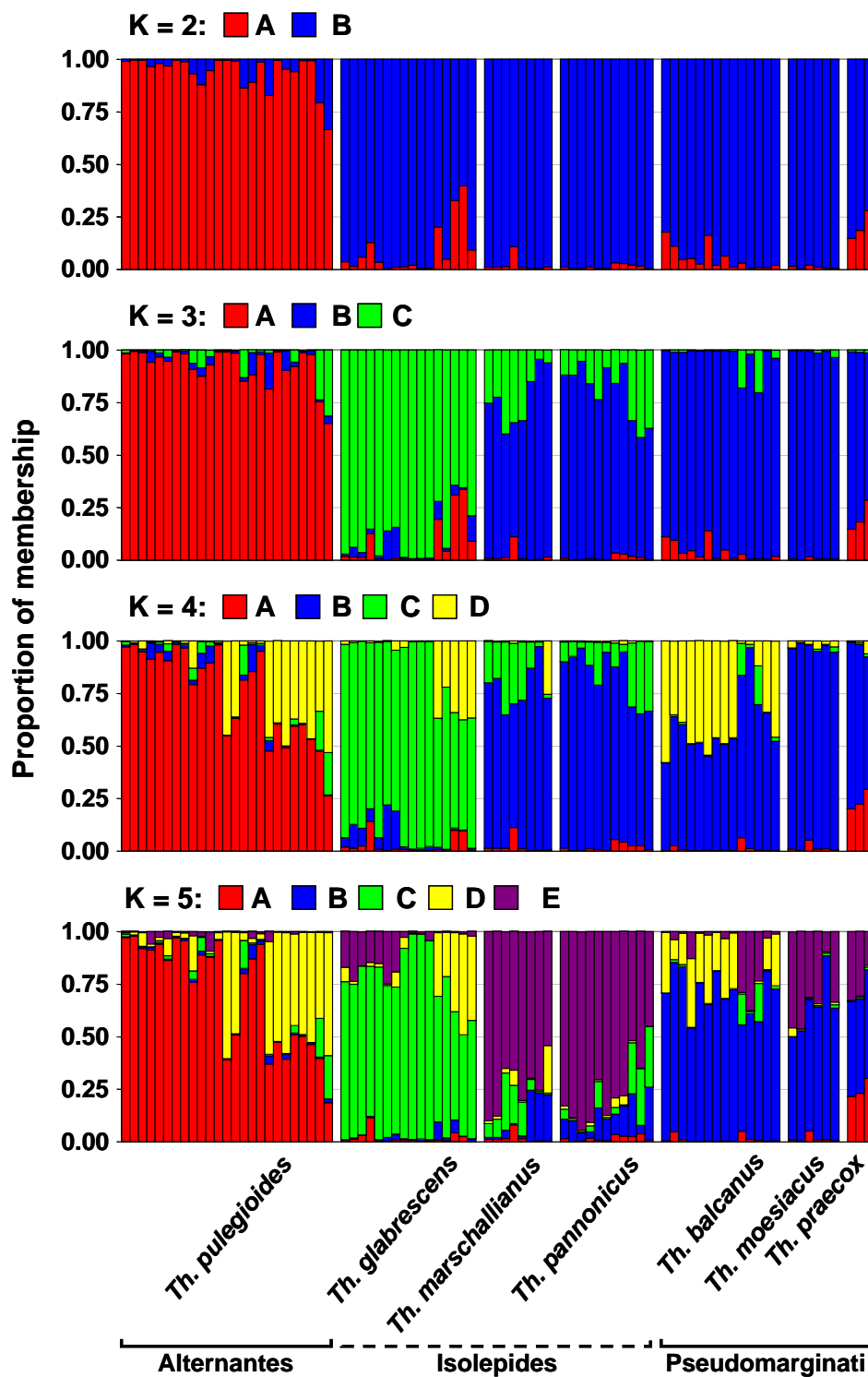
^{***} Signifikantnos pri $P < 0.001$; ^{**} Signifikantnos pri $P < 0.01$; Signifikantnos pri $P < 0.05$; ns - Nesignifikantna vrednost

Procena prosečnog očekivanja podataka, u zavisnosti od datog broja klastera, $\ln[\text{Pr}(X|K)]$, se povećavala sa porastom K do K=5, dok je standardna devijacija među različitim prolazima za svako K bila relativno niska (Slika 3.5). Ukoliko je K bilo veće od 5, srednje vrednosti za $\ln[\text{Pr}(X|K)]$ su bile niže, dok su varijanse značajnije rasle, pokazujući da su hipoteze o postojanju više od 5 klastera daleko od optimalnih. Kao i u slučaju $\ln[\text{Pr}(X|K)]$, najveće vrednosti ΔK su zapažene za K=5.



Slika 3.5 Izbor najverovatnijeg broja klastera (K) na osnovu multilokusnih AFLP podataka uz upotrebu model-zasnovanog klastering metoda po Pritchard i sar. (2000): ln P(X|K) vrednosti za svaki od deset nezavisnih ranova za svako K i ΔK vrednost za svako K zasnovano na stopi drugog reda promene funkcije sličnosti sa obzirom na K kako je opisano kod Evanno et al. (2005)

Proporcije pripadnosti svake individue u svakom klasteru su bile izračunate za K=2 do K=5 zasnovane na prolazu sa najvišim ln[Pr(X|K)] (Slika 3.5). Kada je K=2 sve individue vrste *Th. pulegioides* su bile izdvojene u zaseban klaster (Klaster A) za razliku od individua svih ostalih vrsta (Klaster B). Za K=3, novoformirani klaster (Klaster C) obuhvatio je jedinke koje pripadaju vrsti *Th. glabrescens*. Za K=4 je identifikovan dodatni klaster u koji su se delimično izdvojile jedinke vrsta *Th. pulegioides*, *Th. balcanus* i *Th. glabrescens* (Klaster D). Na kraju, za K=5, većina jedinki koje pripadaju *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus* bila je uključena u novoformirani Klaster E.



Slika 3.6. Genetička struktura sedam vrsta roda *Thymus*. Proporcije učešća za K = 2 do 5 klastera su date prema proceni programa Structure. Svaka pojedinačna biljka je predstavljena jednom vertikalnom linijom podjeljenom bojama. Svaka boja predstavlja po jedan klaster, a dužina pojedine boje predstavlja procenjenu proporciju savake individue u određenom klasteru. Bele linije odvajaju vrste koje su označene ispod slike.

4. Diskusija

4.1 Sastav etarskih ulja

Postojanje hemotipova kod samoniklih populacija roda *Thymus* je dobro poznato, pa tako, na primer, u populacijama *Th. vulgaris* sa juga Francuske ustanovljeno je postojanje šest hemotipova od kojih svaki nosi naziv po dominantnom monoterpeunu u etarskom ulju (Passet, 1971; Vernet i sar., 1986).

Kod ispitivanih populacija vrste *Th. pulegioides* se može konstatovati prisustvo dva jasno definisana hemotipa. Kod populacija **P01**, **P03** i **P06** geraniol je u etarskom ulju zastupljen u izuzetno visokom procentu, dok bi se populacije **P02**, **P04**, **P05** i **P09** mogle okarakterisati kao fenolni hemotipovi.

U etarskom ulju populacije **P01** geraniol je zastupljen sa 87,12%, u etarskom ulju populacije **P03** sa 87,92% i u etarskom ulju **P06** sa 86,97%. Ni jedna druga komponenta nije bila prisutna u nekom značajnijem procentu. Geraniol kao glavna komponenta etarskih ulja već je opisan kod nekih populacija *Th. pulegioides* (Mockuté i Bernotiené, 1998, 1999, 2001; Mastelic i sar., 1992; Karuza-Stojakovic i sar., 1989). Populacije **P01**, **P03** i **P06** PCA1 osa odvaja u posebnu grupu, upravo na osnovu visoke koncentracije geraniola (Graf. 3.1). Slične rezultate da je i primena klaster analize, gde ove tri formiraju klaster A (Slika 3.1). U etarskim uljima **P02**, **P04**, **P05** i **P09** je visoka koncentracija jedinjenja koja pripadaju istom metaboličkom putu, tj. *p*-cimen i γ -terpinen su prekursori u sintezi timola i karvakrola, tako da se ova jedinjenja uvek javljaju zajedno. Ukupan sadržaj ovih komponenti se kretao od 71,02% kod **P09** do 84,50% kod **P05**. U etarskom ulju populacije **P02** timol je glavna komponenta sa 52,95%, dok je koncentracija *p*-cimena 4,89% i γ -terpinena 21,39%. Kod populacije **P04** karvakrol je u etarskom ulju zastupljen sa 39,95%, dok je *p*-cimen glavna komponenta sa 42,59%, a γ -terpinen učestvuje 1,51%. Ovo je jedina populacija sa visokom koncentracijom karvakrola. Kod populacije **P05** glavna komponenta etarskog ulja je timol sa 62,82%, dok su *p*-cimen i γ -terpinen zastupljeni sa 17,36%, odnosno sa 3,31%. U etarskom ulju populacije **P09** najzastupljenija komponenta je *p*-cimen sa

48,59%, dok je timol zastupljen sa 22,12%, a γ -terpinen sa 0,27%. Na osnovu sadržaja sastojaka etarskog ulja, PCA2 osa razdvaja ove populacije na dve grupe, one sa timolom i γ -terpinenom i one sa karvakrolom i *p*-cimenom (Grafik 3.1). Slični rezultati dobijeni su i primenom klaster analize. **P02**, **P05** i **P09** grupišu se u klaster B, dok se **P04** nalazi u klasteru C (slika 3.1). Timol i karvakrol su najvažnije komponente etarskih ulja kod vrsta roda *Thymus* i javljaju se kod velikog broja taksona, najčešće u koncentracijama između 20 i 50% (Thompson, 2002). Ovo je slučaj i sa mnogim ispitivanim populacijama vrste *Th. pulegioides* koje su pripadale fenolnom hemotipu. Kod ispitivanih populacija iz Litvanije konstatovano je prisustvo i timolnog i karvakrolnog hemotipa (Ložienė i sar., 2003). Kod populacija sa Britanskih ostrva, takođe su opisani i timolni i karvakrolni hemotip (Stahl-Biskup, 1986), kao i kod populacija iz Hrvatske (Kuštrak i sar., 1990).

Sve ispitivane populacije vrste *Th. glabrescens* mogu se po sastavu etarskih ulja okarakterisati kao fenolni hemotip. Sve ispitivane populacije u etarskim uljima imale su visoke koncentracije *p*-cimena, γ -terpinena i timola. Ukupan sadržaj ove tri komponente se kreće od 57,06%, kod **P12**, do 80,60%, kod **P13**. Kod populacije **P10** timol predstavlja 56,29% etarskog ulja, dok su *p*-cimen i γ -terpinen zastupljeni sa 9,76%, odnosno 11,91%. Kod **P11** timol je takođe glavna komponenta sa 61,94%, a *p*-cimen i γ -terpinen su zastupljeni sa 11,40%, odnosno 2%. U etarskim uljima **P12**, γ -terpinen je najzastupljenija komponenta sa 19,61%, dok je timol drugi sa 19,02%, *p*-cimen je zastupljen sa 18,43%. Kod ove populacije značajno je zastupljen i timol metil etar sa 13,11%. Kod populacije **P13** timol je najzastupljenija komponenta etarskog ulja sa 64,51%, a slede γ -terpinen sa 10,67% i *p*-cimen sa 5,38%. Glavna komponenta etarskog ulja populacije **P14** je *p*-cimen sa 42,56%, dok su timol i γ -terpinen zastupljeni sa 16,56%, odnosno 13,25%. Kod populacije **P15** u etarskom ulju najzastupljenija komponenta je timol sa 44,53%, prati ga γ -terpinen sa 31,26%, dok je *p*-cimen zastupljen sa 3,98%. Kod populacije **P33** glavna komponenta etarskog ulja je *p*-cimen sa 75,76%, dok timol i γ -terpinen imaju male koncentracije od 1,03%, odnosno 0,92%. PCA1 osa na osnovu visokog sadržaja timola, γ -terpinena, *p*-cimena i timol metil etra grupiše sve populacije vrste *Th. glabrescens*, dok PCA6 daje razdvajanje populacije ove vrste na one koje imaju više koncentracije *p*-cimena i timol metil etra i one koje imaju više koncentracije timola i γ -terpinena (Grafik 3.2). Slično grupisanje populacija ove

vrste dobijeno je i klaster analizom, gde se populacije *Th. glabrescens* izdvajaju u klaster A, u okviru kojeg se razlikuju podklasteri A₁, sa populacijama **P12**, **P14** i **P33**, i podklaster A₂, sa populacijama **P10**, **P11**, **P13** i **P15** (Slika 3.2). Timol je daleko najznačajniji sastojak etarskih ulja kod roda *Thymus* (Thompson, 2002) i javlja se kod mnogih vrsta kao glavna komponenta (Kulevanova i sar., 1996c; Dajic Stevanovic i sar., 2008). Kod nekih populacija vrste *Th. zygis* timol se javljao u koncentraciji od 30,7%, dok je *p*-cimen bio zastupljen sa 23,3% (Richard i sar., 1985). Kod nekih populacija vrste *Th. longicaulis* timol je činio 40,1% etarskog ulja, a *p*-cimen 26,3% (Kuštrak i sar., 1990). Kod *Th. tosevii* ssp. *substriatus* timol je predstavljao 24,5%, odnosno 45,6% etarskog ulja (Kulevanova i sar., 1997). Kod svih ispitivanih populacija vrste *Th. marschallianus* germakren-D je glavna komponenta, tako da se može konstatovati da je, što se tiče sastava etarskog ulja, ovo jedna homogena grupa. Kod populacije **P16** germakren-D je zastupljen sa 34,00%, kod populacije **P17** sa 20,40% i kod populacije **P18** sa 66,66%. Na grafiku 3.2 se vidi da se na osnovu PCA1 ose grupišu sve populacije *Th. marschallianus*, kao i jedna populacija *Th. pannonicus* (**P20**), koja sadrži visoku koncentraciju germakrena-D. U UPGMA dendogramu ove populacije formiraju klaster B (Slika 3.2). Thompson (2002) navodi da je ovo jedinjenje često prisutno u etarskim uljima kod roda *Thymus*, ali da retko prelazi 10%, ovaj hemotip je opisan kod populacija *Th. bracteosus* sa zapadnog Balkana (Bucar i sar., 2005; Slavkowska i sar., 2006). Kod populacije **P16** biciklogermakren je zastupljen sa 12,30%, a (E)- β -ocimen sa 9,75%, kod populacije **P17** jedino još (E)-kariofilen ima značajnu zastupljenost sa 14,57%, a kod populacije **P18** α -pinen je zastupljen sa 11,29%.

Ispitivane populacija vrste *Th. pannonicus* su raznovrsne, što se tiče sastava etarskog ulja. U literaturi su do sada navedena tri hemotipa ove vrste, α -terpinil acetat (Karuza-Stojakovic i sar., 1989), timol/*p*-cimen (Pluhár i sar., 2007) i geranial/neral (Maksimović i sar., 2008a).

Kod populacije **P19** α -pinen, koji se navodi kao komponenta zastupljena sa više od 10% u etarskim uljima samo deset ispitivanih taksona ovog roda, je najzastupljenija komponenta sa 19,90% (Thompson, 2002), ova komponenta je glavni sastojak etarskih ulja još samo kod nekih populacija *Th. baeticus* sa Iberijskog poluostrva (Morales, 1986) Takođe, još dva monoterpena ugljovodonika su prisutna u koncentracijama preko 10%, limonen (12,45%) i (E)- β -ocimen (14,23%), dok su kamfen i mircen

zastupljeni sa 4,03% odnosno 4,81% i uz još devet komponenti čine da je ova grupa jedinjenja najzastupljenija. Na PCA biplotu ova populacija se nije izdvojila ni pojednoj osi, a takođe u u UPGMA dendogramu ne pripada niti jednom klasteru (Slika 3.2). U etarskom ulju ove populacije je relativno visoka koncentracija dva oksigenovana monoterpenka ugljovodonična derivata, 1,8-cineola i kamfora. Ove dve komponente se često javljaju zajedno u etarskim uljima različitih vrsta roda *Thymus* (Morales, 1986).

U etarskom ulju populacije **P20** monoterpenki ugljovodonični predstavljaju značajnu grupu jedinjenja s obzirom da je α -pinen zastupljen sa 13,88%, mircen i (E)- β -ocimen takođe imaju zastupljenost od preko 5%. U ulju ove populacije oksigenovani monoterpenki ugljovodonični nisu prisutni u značajnom procentu dok s druge strane, iako se seskviterpenki ugljovodonični ne smatraju značajnom komponentom etarskih ulja kod roda *Thymus* (Thompson, 2002), germakren-D je najzastupljenija komponenta sa 36,91%. PCA pokazuje da je po sastavu etarskog ulja ova populacija bliska populacijama vrste *Th. marschallianus*, tako da i na UPGMA dendogramu ulazi u klaster B (Slika 3.2).

Kod populacije **P21** u etarskom ulju linalool je glavna komponenta sa 66,06%, a veću koncentraciju ima još i β -bisabolen sa 7,76%. Kod ove populacije su takođe prisutni i 1,8-cineol i kamfor sa 2,73%, odnosno 6,01%. Na osnovu visokog sadržaja linaloola ova populacija se izdvaja na PCA6 osi (Grafik 3.2), dok je na UPGMA dendogramu u klasteru F (Slika 3.2). Linalool je bio značajna komponenta i kod nekih drugih populacija vrsta roda *Thymus*. Kod *Th. pulegioides* iz Austrije linalool je bio zastupljen između 33,4 i 92,3% (Mártonfi i sar., 1994), kod nekih populacija *Th. mastichina* takođe je bio glavna komponenta, i koncentracija mu se kretala između 74% (Adzet i sar., 1977a, b) i 82,9% (García Vallejo i sar., 1984). Kod tri ispitivana varijeteta *Th. jankae* (var. *jankae*, var. *pantotrichus* i var. *patentipilus*) linalool je bio glavna komponenta i njegova koncentracija u etarskim uljima se kretala od 28,1 do 31,2% (Kulevanova i sar., 1998a).

Kod populacije **P22** (E)-kariofilen predstavlja glavnu komponentu etarskog ulja sa zastupljenošću od 40,30%. Značajno je prisustvo još dva monoterpenka ugljovodonika, limonena sa 24,82% i (E)- β -ocimena sa 6,56%. PCA odvajala ovu populaciju od ostalih populacija iz podsekcije Isolepides na osnovu PCA4 ose, odnosno zbog visoke koncentracije (E)-kariofilena i limonena (Grafik 3.2). U klaster analizi ova

populacija formir klaster E. Iako seskviterpenski ugljovodonici nisu značajna komponenta etarskih ulja kod roda *Thymus*, (*E*)-kariofilen je svakako najrasprostranjeniji (Thompson, 2002). Kod određenog broja taksona (*E*)-kariofilen je prelazio koncentraciju od 10%, kod nekih populacija *Th. praecox* ssp. *arcticus* iz Britanije predstavljao je 31,5%, kod *Th. pulegioides* iz Litvanije od 11,4 do 15,9% (Mockuté i Bernotienė, 1998, 1999, 2001), iz Hrvatske 11,5% (Kuštrak i sar., 1990), iz Mađarske od 14,8 do 29,6% (Mártonfi i sar., 1994), kod *Th. alpestris* iz Slovačke 10,5% (Mártonfi, 1992), ali ni u jednom slučaju nije predstavljao glavnu komponentu.

Kod populacije **P23** dominantna komponenta etarskog ulja je citral (geranial i neral) koji čini 85,80% ukupnog etarskog ulja. Ovaj nalaz je saglasan sa prethodnim istraživanjima ove vrste sa istog područja gde je citral činio 71,03% etarskog ulja (Maksimović i sar., 2008a). PCA3 osa odvaja ovu populaciju od ostalih (Grafik 3.2), a na UPGMA dendogramu **P23** formira klaster D (Slika 3.2). U etarskom ulju ove populacije ni jedna druga komponenta nije imala značajan procenat zastupljenosti.

Kod populacije **P34** dominantna komponenta etarskog ulja je mircen sa 25,85%, a značajno su zastupljeni još i α -terpineol (20,01%) i (*E*)-kariofilen (11,75%). Na osnovu PCA2 ose ova populacija se izdvaja od ostalih (Grafik 3.2). I na UPGMA dendogramu ova populacija formira klaster C (Slika 3.2). Koncentracija mircena od preko 10% je do sada opisana kod svega 11 taksona roda *Thymus* (Thompson, 2002), s time da je bio glavna komponenta kod nekih populacija vrste *Th. granatensis* (Cabo i sar., 1986a, b), *Th. hyemalis* (Cabo i sar., 1987) i *Th. mastigophorus* (Velasco Negueruela i Pérez-Alonso, 1986).

Kod svih ispitivanih populacija vrste *Th. balcanus* javljaju se dva hemotipa. Kod **P25** u etarskim uljima su dominantne komponente geranial i neral, što ovu populaciju svrstava u citralni hemotip. U etarskom ulju ove populacije značajnu koncentraciju ima još i neril acetat sa 12,45%. PCA1 osa odvaja ovu populaciju upravo zbog visoke koncentracije nerala, geraniala i neril acetata (Grafik 3.3), dok u UPGMA dendogramu formira klaster D (Slika 3.3). Kod populacija **P24**, **P26** i **P27** najznačajnije su komponente linalil acetat, linalool i mircen. PCA1 osa odvaja ove populacije od ostalih na osnovu koncentracije ovih komponenti (Grafik 3.3), a na UPGMA dendogramu formiraju klaster A (Slika 3.3). U etarskom ulju populacije **P24** najzastupljenija komponenta je linalil acetat sa 22,94%, dok je linalool zastupljen sa 11,74%, a mircen

sa 18,08%. Kod populacije **P26** najzastupljenija komponenta etarskog ulja je, takođe, linalil acetat sa 33,89%, a slede linalol sa 17,05% i mircen sa 7,51%. Kod ove populacije značajna komponenta etarskog ulja je i biciklogermakren sa 11,88%. U etarskom ulju populacije **P27** najzastupljenija komponenta je linalool sa 34,42%, a slede linalil acetat sa 14,56% i mircen sa 14,24%. Ovakav hemotip koji se karakteriše značajnim učešćem linaloola i linalil acetata je opisan kod nekih populacija taksona sa Iberijskog poluostrva, *Th. leptophyllu* ssp. *leptophyllu* (Blázquez i sar., 1989), *Th. zygis* (García Martín i GarcíaVallejo, 1983) i *Th. camphoratus* (Salgueiro i sar., 1997a).

Kod ispitivane populacije vrste *Th. moesiacus* **P31**, najzastupljenija komponenta etarskog ulja je α -terpinil acetat, pri čemu ni jedna druga komponenta ne prelazi koncentraciju od 10%. PCA3 osa jasno odvaja ovu populaciju od ostalih iz podsekcije *Pseudomarginati* na osnovu koncentracije α -terpinil acetata (Grafik 3.3), dok na UPGMA dendogramu formira klaster B (Slika 3.3). Ovaj hemotip je odsta redak kod vrsta roda *Thymus* i javlja se kod nekih populacija *Th. herba-barona* (Corticchiato i sar., 1998), kao i kod *Th. longicaulis* (Grujić Jovanović i sar., 2009).

Kod ispitivane populacije vrste *Th. praecox* **P32** glavna komponenta etarskog ulja je (*E*)-kariofilen sa 20,48%, dok je γ -kadinen zastupljen sa 17,84%. koji se ne navodi kao komponenta koja prelazi 10% ni kod jedne isopitivane populacije. Ova populacija se odvaja na PCA2 osi na osnovu koncentracije ove dve komponente, dok na UPGMA dendogramu formira klaster C.

Postojanje hemotipova kod roda *Thymus* je poznato i dobro dokumentovano i samatra se da se na rasprostranjenje hemotipa imaju uticaj ekološki faktori (Thompson i sar., 2003). Poznavanje hemotipa određene populacije je od značaja s obzirom da etarska ulja biljaka mogu imati različite biološke aktivnosti. Biološka aktivnos etarskih ulja ispitivana je kod mnogih vrsta roda *Thymus* i pokazano je da imaju izrazita antibakterijska i antifungalna svojstva (Sakagami i sar., 2005; Kizil i Uyart, 2006; Saad i sar, 2010) koja su posledica prisustva fenolnih komponenti timola, karvakrola, γ -terpinena i *p*-cimena (Nedorostova i sar., 2008). Kod populacija *Th. glabrescens* je utvrđeno da antioksidativna svojstva zavise od koncentracije fenolnih komponenti etarskog ulja (Maksimović i sar., 2008b).

4.2 Površinski flavonoidi

U Tabeli 3.16 se zapaža da se na osnovu sastava površinskih flavonoida ispitivane populacije vrsta roda *Thymus* sa područja Srbije mogu podeliti u dve grupe.

Prvoj grupi bi pripadale vrste koje imaju niske i srednje količine površinskih flavonoida, kao i one kod kojih su se površinski flavonoidi nalazili samo u tragovima. Kod ove grupe su najzastupljeniji flavoni sa 5,6-diOH-7-OMe i 5,6-diOH-7,8-diOMe supstitucionom šemom u A prstenu. U drugu grupu bi se mogle svrstati populacije koje, uglavnom, imaju malu količinu površinskih flavonoida i kod kojih je su najzastupljeniji flavoni sa 5-OH-6,7-diOMe i 5-OH-6,7,8-triOMe supstitucionom šemom u A prstenu.

Većina ispitivanih populacija *Th. pulegioides* (podsekcija *Alternantes*), po prisustvu površinskih flavonoida pripada prvoj grupi vrsta. Kod populacija **P02**, **P03**, **P04**, **P05** i **P09** najzastupljeniji flavon je 5,6,-diOH-7,3',4'-triOMe, dok je drugi po zastupljenosti 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe. Kod populacije **P06**, ova dva jedinjenja su u obrnutom odnosu, a kod populacije **P01**, je luteolin bio najzastupljenija komponenta. Luteolin se javlja kao komponenta druga po zastupljenosti i kod **P03** i **P04**, dok je kod **P06** i timonin dobro zastupljen. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Marin i sar. (2003), koji su ispitivali vrste roda *Thymus* iz Makedonije. Kod *Th. pulegioides* iz Makedonije najzastupljeniji površinski flavon je takođe bio 5,6,-diOH-7,3',4'-triOMe, dok je drugi po zastupljenosti bio ladanein, koji je u većini uzoraka iz Srbije prisutan, ali ne u velikom procentu. Kod uzoraka *Th. pulegioides* sa Pirinejskog poluostrva glavni površinski flavonoid je bio 5,4'-diOH-6,7-diOMe (cirsimaritin), a 5,6,4'-triOH-7,8-diOMe (timusin) i 5,6,4'-triOH-7,8,3'-triOMe (timonin) su takođe bili važne komponente u ovim uzorcima (Hernández i sar., 1987). Ni jedan od ovih površinskih flavonoida se nije nasao ni u tragovima kod populacija iz Srbije, osim timonina, što je već pomenuto kod **P06**. Ovo dodatno ukazuje, kako su naveli Marin i sar. (2003), da u okviru ove vrste koja ima široko rasprostranjenje postoji izražena infraspecijska varijabilnost.

Iz podsekcije *Isolepides* su ispitivane populacije vrsta *Th. glabrescens*, *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus*. U okviru ove podsekcije ispitivane vrste pripadaju obema grupama.

Kod ispitivanih populacija *Th. glabrescens* glavni površinski flavon je 5,6,-diOH-7,3',4'-triOMe, a još su značajno zastupljeni i 5,6-diOH-7,4'-diOMe (ladenein) i 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe. Izuzetak je samo **P12** kod koje je glavni površinski flavonoid 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin), koji je kod ostalih populacija prisutan ali ne u velikoj količini. Kod uzorka *Th. glabrescens* iz Makedonije glavni površinski flavonoid je bio 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe, a značajni su bili i 5,6,-diOH-7,3',4'-triOMe i 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin) (Marin i sar., 2003).

Kod populacija vrste *Th. marschallianus* **P17** i **P18** dominantan površinski flavonoid je 5-OH-6,7,4'-triOMe (salvigenin), a drugi po zastupljenosti je 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B). Kod populacije **P16** dominantan je 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B), drugi je 5-OH-6,7,4'-triOMe (salvigenin). Kod **P18** je također utvrđeno prisustvo i flavanona eriodiktiola i metoksilovanih flavanona.

Za ispitivane populacije *Th. pannonicus* utvrđena je niska količina, osim kod **P23** gde je bila srednja, kao i velika varijabilnosti u sastavu površinskih flavonoida. Kod **P19** i **P20** dominantan je flavon je 5-OH-6,7,4'-triOMe (salvigenin), dok je drugi po značaju 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B). Populacija **P34** ima 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B) kao dominantan flavon, dok je 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin) drugi po značaju. Kod populacije **P23** 5,6,4'-triOH-7,8-diOMe (thymusin) je dominantan, a drugi po količini su 5,6,4'-triOH-7,3'-diOMe i 5,6,-diOH-7,3',4'-triOMe. Kod **P22** su prisutni 5,4'-diOH-6,7,8-triOMe (xanthomicrol) i 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B), a kod **P21** 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin) i 5-OH-6,7,8,3',4'-pentaOMe (5-desmethylnobiletin), u malim količinama. Kod populacija *Th. pannonicus* prisutni su i metoksilovani flavanoni, osim kod **P23** i **P34**.

Podela podsekcije *Isolepides* na dve grupe prema flavonoidnim profilima ukazuje da se *Th. glabrescens* izdvaja od druge dve vrste iz ove podsekcije, ali i da je ova vrsta sličnija po profilu površinskih flavonoida vrsti *Th. pulegioides*., od kojih se razlikuje po nešto većim količinama ladaneina. Vrste *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus* jasno pripadaju drugoj grupi po flavonoidnom profilu. Iz ove grupe se izdvaja **P23** koja je jedina od ispitivanih populacija kod koje je glavni flavon timusin, što je značajan flavon kod vrsta roda *Thymus* sa Iberijskog poluostrva (Horwath i sar., 2008; Hernández i sar., 1987; Corticchiato i sar., 1995).

Kod ispitivanih vrsta iz podsekcije *Pseudomarginati* količina površinskih flavonoida je mala ili samo u tragovima. Kod sve četiri populacije *Th. balcanus*, **P24**, **P25**, **P26** i **P27**, najzastupljeniji je 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin), a značajan je još i 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe. Marin i sar. (2003) su u svom radu uključili bili tri varijeteta vrste *Th. balcanus* iz Makedonije. Kod *Th. balcanus* var. *balcanus* glavni površinski flavonoid je bio 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin), a kod *Th. balcanus* var. *vandasii* i *Th. balcanus* var. *micevskii* glavni površinski flavonoid je bio 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B), koji kod uzoraka iz Srbije nije pronađen ni u tragovima. Kod uzoraka iz Makedonije je značajno bio zastupljen i 5-OH-6,7,8,3',4'-pentaOMe (5-desmethylnobiletin) koji kod uzoraka iz Srbije nije konstatovan ni u tragovima. Kod populacije vrste *Th. moesiacus*, **P31**, utvrđeno je prisustvo male količine površinskih flavonoida i po prisustvu 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin) i 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe pripadaju istom flavonoidnom profilu kao i *Th. balcanus*, mada je luteolin iamo najveću prisutnost. Kod *Th. moesiacus* var. *moesiacus* iz Makedonije najznačajniji je bio 5,6-diOH-7,3',4'-triOMe (Marin i sar., 2003) što ga, po sastavu površinski flavonoida čini sličnijim *Th. pulegioides* i *Th. glabrescens* iz Srbije. Kod *Th. praecox* je determinisana mala količina flavonoida i kao dominantan se javlja 5-OH-6,7,4'-triOMe (salvigenin), a utvrđeno je još i prisustvo 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B), kao i prisustvo metoksilovanih flavanona, što nije slučaj ni kod jedne druge vrste iz ove podsekcije. Ovakav flavonoidni profil približava ovu populaciju ispitivanim populacijama vrsta *Th. marschallianus* i nekim populacijama *Th. pannonicus*. Ovakva razlika između flavonoidnih profila *Th. balcanus* i *Th. moesiacus*, s jedne strane i *Th. praecox*, s druge, ukazuje da njihovo grupisanje u *Th. praecox* agregat treba preispitati. I kod populacija iz Makedonije došlo je do razdvajanja vrsta iz ovog agregata i do grupisanja u različite flavonoidne profile (Marin i sar., 2003). Gardenin B je bio važan flavon i kod nekih ispitivanih populacija *Th. striatus* iz Crne Gore (Marin i sar., 2005), vrsti koja pripada sekciji *Hyphodromi*, dok je kod *Th. praecox* sa Pirinejskog poluostrva glavni površinski flavonoid 8-methoxycirsilineol, uz značajne količine cirsiliola i 5-desmethylnobiletin i 5-desmethylnobiletin (Hernández i sar., 1987). Analiza populacija vrsta *Thymus hyemalis* i *Thymus baeticus* kao i velikog broja njihovih putativnih hibrida iz jugoistočne Španije pokazala je zavisnost površinskih flavonoida i lokaliteta (Horwath i sar., 2008). Veza između flavonoidnog profila, lokaliteta i

klimatskih uslova takođe je utvrđena i kod *Parahebe catarractae* (Grayer-Barkmeijer, 1978), roda *Phlomis* (Tomás i sar., 1986) i kod *Mimulus aurantiacus* (Hare, 2002).

4.3 AFLP analiza

U ranijim ispitivanjima vrsta roda *Thymus*, analiza ITS markera (Internal Transcribed Spacer) se pokazala neprikladnom za rešavanje filogenetskih odnosa između vrsta ovoga roda sakupljenih na području Srbije (Dajić Stevanović i Šošarić, 2006), mada je ITS uspešno korišćen pri analizi nekih bliskih rodova iz familije Lamiaceae (Jamzad et al., 2003). Na višim taksonomskim nivoima upotreba AFLP markera za rešavanje filogenetskih odnosa se ponekad smatra kontroverznom zbog mogućeg visokog nivoa homoplazija (Meudt and Clarke, 2007), ali s druge strane, na nižim taksonomskim nivoima AFLP analiza se pokazala izuzetno korisnom za donošenje procena o filogenijama koje nisu dovoljno rešene upotrebom DNK sekvenci kada varijacija između sekvenci nije izražena (Beardsley et al., 2003; Després et al., 2003; Safer et al., 2011). Ovom prilikom, pri ispitivanju taksona roda *Thymus* iz Srbije, upotreba AFLP markera se čini prikladnom za utvrđivanje komplikovanih odnosa koji uključuju i česte slučajeve hibridizacije između različitih vrsta. Poređenjem granica taksona roda *Thymus* kako su date u Flori SR Srbije (Diklić, 1974) i Flora Europaea (Jalas, 1972) vidljivo je veliko neslaganje, kako u morfološkim karakteristikama pojedinih vrsta, tako i u rasprostranjenju određeni vrsta u Evropi.

Th. pulegioides pripada podsekciji *Alternantes* i u Flora Europaea i u Flori SR Srbije ovaj takson ima iste okvire. Takođe, prema oba izvora široko je rasprostranjen u Evropi. Sve ispitivane jedinice vrste *Th. pulegioides* formiraju posebanu kladu koja ima visoku bootstrap podršku i ujedno cela ova grupa je najviše divergirala od ostalih vrsta koje su uključene u ovu analizu, sa najvišom srednjom ϕ_{ST} vrednošću. Za $K=2$ sve jedinice se grupišu u Klaster A, čime su izdvojene od ostalih jedinki. Genetička izdvojenost vrste *Th. pulegioides* je podržana i morfološkim karakteristikama, pošto je za ovu vrstu karakteristično gonotrihno stablo po čemu se lako razlikuje od ostalih vrsta uključenih u ovo ispitivanje.

Prema dobijenim rezultatima podsekcija *Isolepides* je polifiletska, mada su morfološke razlike među obuhvaćenim vrstama veoma male. Prema Flora Europaea

vrsta *Th. glabrescens* ima rasprostranjenje u centralnoj i jugo-istočnoj Evropi i Turskoj. Klada koja obuhvata jedinke ove vrste ima visoku bootstrap podršku. Za K=3 sve jedinke vrste *Th. glabrescens* su grupisane u Klaster B.

Th. marschallianus se u Flora Europaea tretira kao sinonim za *Th. pannonicus*, koji je opisan kao vrsta sa rasprostranjenjem u centralnoj i jugo-istočnoj Evropi. Klada koju formiraju jedinke koje pripadaju *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus* nema bootstrap podršku veću od 50% i jedinke ove dve vrste su međusobno izmešane. AMOVA pokazuje da je ϕ_{ST} vrednost između ove dve vrste veoma niska, što ukazuje da ove dve vrste međusobno nisu diferencirane. Za K=5 jedinke obe vrste su pretežno svrstane u Klaster E.

Morfološke razlike između *Th. glabrescens* i *Th. marschallianus* veoma male i njihovo grupisanje u različite klade je neočekivano. Međutim, i ranije je utvrđeno da su unutar ove grupe taksonomski odnosi veoma nejasni (Marin i sar., 2003). *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus* se morfološki jasno razlikuju po indumentumu na listovima, dok su kod *Th. pannonicus* listovi prekriveni višecelijskim nežlezdanim dlakama; listovi kod *Th. marschallianus* su goli. Slična situacija je uočena i kod irskih populacija *Quercus petraea* i *Q. robur*, koje su se znatno bolje razlikovale na osnovu morfoloških karaktera nego analizom molekularnih markera (AFLP) (Kelleher i sar., 2005). Bez obzira na ovu jasnu morfološku razliku ove dve vrste roda *Thymus*, su genetički nedovoljno različite, što podržava pristup iz Flora Europaea da se tretiraju kao jedna vrsta.

Unutar podsekcije *Pseudomarginati* i Jalas, (1972) (Flora Europaea) i Diklić (1974) i (Flora SR Srbije) navode da je prisutana velika morfološka varijabilnost, kako između vrsta, tako i unutar samih vrsta. Jedinke sve tri vrste iz ove podsekcije, koje su uključene u ovo ispitivanje, formiraju monofiletsku kladu, koja ipak nije podržana visokom bootstrap vrednošću, dok su, s druge strane, na nivou vrste, *Th. balcanus*, *Th. praecox* i *Th. moesiacus* dobro podržani. Za K=5 jedinke ove tri vrste su pretežno grupisane u Klaster B.

Prema Jalas-u (1972) *Th. balcanus* je opisan kao *Thymus praecox* Opiz subsp. *polytrichus* (A. Kern. ex Borbás) Jalas, vrsta sa alelotrihnim stablom i rasprostranjenjem u južnoj Evropi i južnom delu centralne Evrope. Prema istom izvoru *Th. praecox*, kako je opisan u Flori SR Srbije, je *Thymus praecox* Opiz subsp. *skorpilii* (Velen.) Jalas,

vrsta sa holotrihnim stablom i rasprostranjenjem u severnim i centralnim delovima Balkanskog poluostrva. Jedinke vrsta *Th. balcanus* i *Th. praecox* su se odvojeno grupisale. Takođe, ϕ_{ST} vrednost između ove dve vrste je visoka, što ukazuje na postojanje genetičke diferencijacije između ove dve vrste. *Th. moesiacus* je u Flora Europaea opisan kao *Th. longicaulis* C. Presl, vrsta sa alelotrihnim stablom i rasprostranjenjem u centralnoj i jugo-istočnoj Evropi.

Pri proučavanjima blisko srodnih, međusobno ukrštajućih vrsta, utvrđeno je da je najveći deo genetička varijabilnost, dobijena analizom AFLP markera, unutar samih vrsta, a ne između vrsta. U slučaju četiri vrste iz roda *Quercus* preko 90% varijabilnosti je utvrđeno unutar samih vrsta (Dodd i Kashani, 2003). Između populacija svih analiziranih vrsta je primećena visoka varijabilnost (Tabela 3.19), dok je komponenta varijabilnosti između vrsta bila relativno niska, što ukazuje da diferencijacija između vrsta nije izražena (Tabela 3.18). Razlog za ovo može biti ili brza evolucija AFLP markera ili retikulatna evolucija. Ova druga hipoteza je verovatnija, naročito ukoliko se ima u vidu da reproduktivna izolacija između vrsta sekcije *Serpyllum* gotovo da ne postoji (Morales, 2002). Vrste uključene u ovo ispitivanje odaju utisak izraženog retikulatnog sistema, koji se javlja često kod blisko srodnih vrsta (Sang i sar., 1995), a naročito u slučajevima kada se dve ili više vrsta javljaju simpatrički. U mnogim slučajevima kada je došlo do retikulatne evolucije utvrđeni su različiti nivoi ploidije unutar vrste ili roda (Guo et al., 2005, 2008; Ishikawa et al., 2009). Aneuploidija je odigrala važnu ulogu tokom evolucije roda *Thymus*, i ovaj fenomen je odgovoran za različite brojeve hromozoma čak i unutar iste vrste (Morales, 1997). Utvrđeni su različiti brojevi hromozoma kod svih vrsta koje su uključene u ovo ispitivanje, kod *Th. pulegioides* $2n=28, 30$, kod *Th. glabrescens* $2n=28, 32, 52, 56$ i 58 , kod *Th. pannonicus* $2n=28$ i 35 i kod *Th. praecox* $2n=24, 28, 50, 54, 56$ i 58 (Morales, 1997). Rezultati pokazuju da se podsekcije *Alternantes* i *Pseudomarginati* mogu smatrati dobrim podsekcijama. S druge strane, u podsekciji *Isolepides*, *Th. glabrescens* se jasno izdvaja od druge dve vrste iz ove podsekcije, iako su morfološki karakteri veoma slični onima kod *Th. marschallianus*. Između vrsta *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus*, koje su takođe iz podsekcije *Isolepides*, genetička diferencijacija nije izražena, mada se morfološki značajno razlikuju. Slično je primećeno u zonama hibridizacije dve vrste roda *Cardamine* (Brassicaceae), gde je skorašnja studija pokazala da morfološki karakteri,

posmatrani nezavisno, mogu da navedu na pogrešan zaključak o posmatranim genotipovima (Lihova et al., 2007). Slični rezultati su dobijeni i ispitivanjem mikrosatelitnih regiona kod hibrida *Quercus coccifera* L. i *Quercus ilex* L. (Ortego and Bonal, 2009), kao pri ispitivanju skorih hibridizacija u okviru Čileanskih vrsta roda *Puya* (Bromeliaceae) pomoću AFLP markera (Shulte et al., 2010). Ovi rezultati govore u prilog hipotezi o stalnom protoku gena između bliskih vrsta u sekciji *Serpyllum* roda *Thymus*. U slučajevima kada se dve, ili više vrsta javljaju simpatrički, ekološki faktori, kao na primer senovito i vlažnije stanište u odnosu na suvlje, otvoreno stanište, mogu da utiču na selekciju različitih morfoloških i fizioloških tipova (na primer: dlakavost jedinki i/ili postojanje različitih hemotipova), i na taj način ih stabilizuju, uprkos pretpostavljenom stalnom protoku gena (Schmidt-Lebuhn, 2007). Iz svega iznetog, može se smatrati neprikladnim da se sve ispitivane populacije svrstaju u svega dve ili tri vrste, jer bi se na taj način zanemarila ekološka i regionalna diferencijacija. Takođe, lošije bi se razumela morfološka, genetička i ekološka varijabilnost. Stoga je najuputnije da se na vrste roda *Thymus* primeni filogenetski koncept vrste, prema kojem vrste predstavljaju deo filogenije između dve tačke grananja. Drugim rečima, vrste bi bile najmanji agregat populacija, kod seksualne reprodukcije, ili linija, kod aseksualne reprodukcije, koje su, na osnovu stanja određenih karaktera razlikuju od drugih grupa date filogenije (semaforonti). Filogenetska definicija vrste je zasnovana na karakteristikama i orijentisana na obrasce (Nixon and Wheeler, 1990). Ovakva definicija dopušta genetičku razmenu sa drugim vrstama sve dok ova razmena ne sprečava nezavisni evolutivni razvoj ovih populacija (Luckow, 1995), što je izrazito istinit opis naročito za vrste podsekcije *Isolepides*.

4.4 Opšta diskusija

Ispitivane populacije vrsta roda *Thymus* pripadaju trima podsekcijama skcije *Serpyllum*, i njihovo grupisanje na osnovu fitohemijskih karaktera i molekularnih marker ne odgovara u potpunosti njihovom taksonomskom položaju.

Unutar *Th. pulegioides* (podsekcije *Alternantes*) jasno se uočavaju dva hemotipa, geraniolni (**P02**, **P05** i **P09**) i fenolni tip (**P01**, **P03**, **P06** i **P04**). Po sastavu površinskih flavonoida, takođe, se mogu uočiti dve grupe vrsta. **P02**, **P03**, **P04**, **P05** i

P09 najzastupljeniji flavon je 5,6,-diOH-7,3',4'-triOMe, dok je drugi po zastupljenosti 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe. Kod populacije **P06**, ova dva jedinjenja su u obrnutom odnosu, a kod populacije **P01**, je luteloin bio najzastupljenija komponenta. Analiza AFLP markera je, s druge strane, pokazala da sve populacije vrste *Th. pulegioides* formiraju jednu monofiletsku kladu sa visokom Bootstrap podrškom BS 94%.

U podsekciji *Isolepides*, populacije vrste *Th. glabrescens* su jednoobrazne i po sastavu etarskih ulja i po sastavu površinskih flavonoida. Naime, sve populacije se mogu okarakterisati kao fenolni hemotip, a najzastupljeniji površinski flavonoidi su 5,6,-diOH-7,3',4'-triOMe, 5,6-diOH-7,4'-diOMe (ladenein) i 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe. Kod populacije **P12** glavni površinski flavonoid je 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin), koji je kod ostalih populacija prisutan ali ne u velikoj količini. Po sastavu etarskih ulja i površinskih flavonoida populacije *Th. glabrescens* su mnogo sličnije populacijama **P01**, **P03**, **P06** i **P04** vrste *Th. pulegioides* nego populacijama drugih vrsta iz podsekcije *Isolepides*, ali u Neighbour joining dendogramu dobijenom na osnovu AFLP podataka populacije *Th. glabrescens* se grupišu se u monofiletsku kladu sa Bootstrap podrškom od 93%. Populacije druge dve vrste podsekcije *Isolepides*, *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus*, izuzetno su heterogene i po sastavu etarskih ulja i po sastavu površinskih flavonoida. Sve populacije *Th. marschallianus*, **P16**, **P17** i **P18**, imaju germakren-D kao glavnu komponentu etarskog ulja što je slučaj i sa populacijom **P20** vrste *Th. pannonicus*, Populacije *Th. marschallianus*, **P16**, **P17** i **P18**, i populacija *Th. pannonicus* **P20** pripadaju istoj grupi i po sastavu površinskih flavonoida, s obzirom da je najzastupljeniji 5-OH-6,7,4'-triOMe (salvigenin) i 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B). Isti odnos površinskih flavonoida ima i populacija *Th. pannonicus* **P19**, kod koje ni jedan sastojak etarskog ulja nije dominantan, već α -pinen, limonen i (E)- β -ocimen javljaju u sličnom procentu. Za etarsko ulje populacije *Th. pannonicus* **P21** karakteristično je prisustvo linaloola u visokom procentu, dok su od površinskih flavonoida prisutni samo 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrelin) i 5-OH-6,7,8,3',4'-pentaOMe. Populacija *Th. pannonicus* **P22** se odlikuje visokim procentom E-kariofilena, a potom, i limonena u etarskom ulju, dok je su od površinskih flavonoida prisutni 5,4'-diOH-6,7,8-triOMe (ksantomikrol) i 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B). Populacija *Th. pannonicus* **P23** karakteristična je po izuzetno visokoj koncentraciji nerala i geraniala u etarskom ulju. Ovo je jedina populacija ove vrste koja ima srednju

koncentraciju površinskih flavonoida i kod koje je 5,6,4'-triOH-7,8-diOMe (timusin) najznačajniji, a slede po značaju 5,6,4'-triOH-7,3'-diOMe i 5,6,-diOH-7,3',4'-triOMe. U etarskom ulju populacije *Th. pannonicus* **P34** dominantna jedinjenja su mikren i α -terpinel, dok je 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B) najznačajniji flavon, a 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin) drugi po značaju. Na Neighbour-joining stablu (Slika 3.4), klada koju formiraju jedinke koje pripadaju jedinke *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus* nema bootstrap podršku veću od 50% i jedinke ove dve vrste su međusobno izmešane. AMOVA pokazuje da je ϕ_{ST} vrednost između ove dve vrste veoma niska, što ukazuje da ove dve vrste međusobno nisu diferencirane.

Od ispitivanih populacija podsekcije *Pseudomarginati*, tri populacije vrste *Th. balcanus*, **P24**, **P27** i **P26**, imaju visok sadržaj mikrena, linaloola i linalil acetata u etarskom ulju, dok su kod **P25** u etarskom ulju najzastupljeniji neral, geranial i uz ova dva jedinjenja i neril acetat. S druge strane, kod sve četiri populacije *Th. balcanus* najznačajniji površinski flavonoid je 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin), a zatim 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe. Kod populacije *Th. moesiacus* **P31**, glavni sastojak etarskog ulja je α -terpinil aceta, dok je od površinskih flavonoida najznačajniji je luteolin, s time što po prisustvu 5,6-diOH-7,8,4'-triOMe (pebrellin) i 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe ova populacija je po flavonoidnom profilu slična populacijama *Th. balcanus*. U etarskom ulju populacije *Th. praecox* **P32** najveću koncentraciju imaju (*E*)-kariofilen i γ -kadinen. Količina površinskih flavonoida je niska i prisutni su 5-OH-6,7,4'-triOMe (salvigenin) i 5-OH-6,7,8,4'-tetraOMe (gardenin B). Jedinke sve tri vrste iz ove podsekcije, koje su uključene u ispitivanje AFLP markera, formiraju monofiletsku kladu, koja ipak nije podržana visokom bootstrap vrednošću, dok s druge strane, na nivou vrste, *Th. balcanus*, *Th. praecox* i *Th. moesiacus* dobro podržani.

Sastav etarskih ulja ispitivanih populacija je izuzetno raznovrstan tako da ne daje sliku o filogenetskim odnosim među ispitivanim populacijama. Statistička analiza sastava etarskih ulja za interperetaciju različitih odnosa među lekovitim i aromatičnim biljkama se pokazala u nekim slučajevima izuzetno prikladnom, kao na primer za karakterizaciju dve podvrste vrste *Cistus creticus* L. (Paolini i sar., 2009) ili populacija *Helichrysum italicum* (Roth) G. ssp. *italicum* (Morone-Fortunato i sar., 2010). S druge strane, kod ispitivanja gajenih sorti *Ocimum basilicum* L. poređenjem sastava etarskih ulja i AFLP markera, utvrđeno je da genetička sličnost ili različitost ne odražava

obavezno sličnost ili različitost karaktera kao što je sastav etarskog ulja (Labra i sar., 2004). Trindade i sar. (2008) su ispitujući genetički diverzitet, pomoću RAPD markera, kao i hemijski polimorfizam kod populacija *Thymus caespitius* sa ostrva Pico, São Jorge i Terceira, koja pripadaju Azorskom arhipelagu, dobili različito grupisanje populacija na osnovu ovih karaktera. Kod pet vrsta roda *Thymus* iz južne Italije, takođe je analiziran sastav etarskih ulja, međutim hemotipovi nisu korespondirali sa taksonomskom pripadnošću (De Lisi i sar., 2011), što je slučaj i sa vrstama iz Srbije.

5. Zaključci

1. Na osnovu ispitivanja sastava etarskih ulja, površinskih flavonoida i analize AFLP markera izabranih populacija vrsta iz sekcije *Serpyllum* roda *Thymus* može se zaključiti da među vrstama ove sekcije postoji visoki stepen genetičke kompatibilnosti, da ne postoji čvrsta reproduktivna barijera između vrsta, te postoji mogućnost hibridizacije ukoliko jedna ili više vrsta žive simpatrički. Ipak, na osnovu rezultata može se konstatovati da populaciona struktura postoji i da su, sa izuzetkom *Th. pannonicus* i *Th. marschallianus*, sve ispitivane vrste – dobre vrste.
2. Vrsta *Th. pulegioides*, koja je jedina ispitivana vrsta iz podsekcije *Alternantes*, pokazala se kao dobra vrsta po svim ispitivanim kriterijumima. U okviru populacija ove vrste utvrđeno je postojanje samo dva hemotipa, fenolnog i geraniolnog. Mada je postojanje hemotipova poznato kod vrsta iz roda *Thymus*, pa se često i u istoj populaciji nalaze dva, a nekada i više hemotipova, ova hemijska uniformnost se može smatrati odrazom genetičke koherentnosti. Takođe, sve ispitivane populacije ove vrste pripadaju istom flavonoidnom profilu. Kod svih populacija su utvrđene niske i srednje količine flavonoida, kao i 5,6-diOH-7-OMe i 5,6-diOH-7,8-diOMe supstitucione šeme u A prstenu. Molekularni markeri, tj. AFLP analiza, podržavaju zaključak da je *Th. pulegioides* dobra vrsta. Naime, sve ispitivane jedinice vrste *Th. pulegioides* formiraju posebanu kladu koja ima visoku bootstrap podršku i ujedno cela ova grupa je najviše divergirala od ostalih vrsta koje su uključene u ova istraživanja.
3. U okviru podsekcije *Isolepides*, vrsta *Th. glabrescens* se jasno izdvaja od druge dve vrste ove podsekcije. Sve populacije *Th. glabrescens* po sastavu etarskih ulja pripadaju fenolnom hemotipu, s obzirom da su kod svih populacija utvrđene visoke koncentracije *p*-cimena, γ -terpinena i timola. Po sadržaju površinskih flavonoida sve ispitivane populacije pripadaju istoj grupi, sa niskim i srednjim količinama flavonoida i 5,6-diOH-7-OMe i 5,6-diOH-7,8-diOMe supstitucionim šemama u A prstenu. AFLP markeri, takođe, navode na zaključak da je *Th.*

- glabrescens* dobra vrsta, pošto sve ispitivane jedinke ove vrste formiraju posebnu kladu sa visokom bootstrap podrškom.
4. Vrsta *Th. marschallianus*, iz podsekcije *Isolepides*, je po sastavu etarskih ulja ispitivanih populacija, veoma jednoobrazna, pošto sve ispitivane populacije imaju kao najzastupljeniju komponentu germakren-D. Po sadržaju površinskih flavonoida sve ispitivane populacije pripadaju istoj grupi, sa niskim količinama flavonoida i 5-OH-6,7-diOMe i 5-OH-6,7,8-triOMe supstitucionim šemama u A prstenu. AFLP markeri, međutim, ne izdvajaju ispitivane jedinke ove vrste u jednu kladu, već formiraju zajedničku kladu sa jedinkama vrste *Th. pannonicus*. U ovoj kladi jedinke ove dve vrste su izmešane i klada ima bootstrap podršku ispod 50%.
 5. Podsekciji *Isolepides* pripada i vrsta *Th. pannonicus*. Ova vrsta je po sastavu etarskih ulja najheterogenija od svih ispitivanih taksona ovog roda. Svaka od ispitivanih populacija ima svoj hemotip. Po sadržaju površinskih flavonoida populacije ove vrste se razlikuju kako po količinama, tako i po tipovima supstitucije u A prstenu. Kod dve populacije prisutna je 5-OH-6,7-diOMe i 5-OH-6,7,8-triOMe supstitucionna šema u A prstenu, kod jedne 5,6-diOH-7-OMe i 5,6-diOH-7,8-diOMe, kod jedne 5,6-diOH-7,8-diOMe i 5-OH-6,7,8-triOMe, a kod preostale dve populacije količine površinskih flavonoida su male. Analizom AFLP markera, jedinke ispitivanih populacija su pomešane u zajedničkoj kladi sa jedinkama *Th. marschallianus*.
 6. Rezultati ispitivanja, i fitohemijskih i molekularnih markera, navode na zaključak da je podsekcija *Isolepides* polifiletska. Prema našim rezultatima, *Th. glabrescens* je dobra vrsta, dok ne postoji dovoljna genetička diferencijacija između populacija *Th. pannonicus* i *Th. marschallianus*. U slučaju ove dve vrste, a imajući u vidu jasne morfološke razlike, prikladno bi bilo primeniti filogenetski koncept vrste.
 7. Iz podsekcije *Pseudomarginati* ispitivane su populacije vrsta *Th. balcanus*, *Th. moesiacus* i *Th. praecox*. Kod tri ispitivane populacije *Th. balcanus*, glavne komponente etarskih ulja su linalil acetat, linalool i mircen, dok su kod jedne geranial i neral. Kod ispitivane populacije *Th. moesiacus* najzastupljenija komponenta etarskog ulja bio je α -terpinil acetat, a kod *Th. praecox* glavna

komponenta etarskog ulja je (*E*)-kariofilen. Kod ispitivanih vrsta iz ove podsekcije količina površinskih flavonoida je mala ili samo u tragovima. Kod sve četiri populacije *Th. balcanus* i populacije *Th. moesiacus* najzastupljeniji je bio pebrellin, a značajan je još bio i 5,6-diOH-7,8,3',4'-tetraOMe. Ispitivana populacija *Th. praecox* pripada drugom flavonoidnom profilu, posto su prisutni salvigenin i gardenin B, kao i metoksilovani flavanoni. Molekularni markeri grupišu sve jedinice iz ove podsekcije u monofiletsku kladu, koja ima nisku bootstrap podršku. Na nivou vrste, *Th. balcanus*, *Th. praecox* i *Th. moesiacus* dobro podržani. Svi ovi rezultati navode na zaključak da je podsekcija *Pseudomarginati* monofiletska, a ispitivane vrste mogu se smatrati dobrim vrstama.

8. Rezultati i fitohemijskih i molekularnih ispitivanja pokazuju da su, sa izuzetkom *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus*, dobro genetički diferencirane vrste. U budućim ispitivanjima vrste *Th. pulegioides* treba uključiti populacije sa većeg prostora, s obzirom da ova vrsta ima veoma širok areal, kao i populacije drugih vrsta iz podsekcije *Alternantes*, kao na primer *Th. alpestris* i *Th. comosus*.
9. Kod podsekcije *Isolepides*, *Th. glabrescens* je dobro diferencirana vrsta I, da bi se to potvrdilo u daljim istraživanjima, treba uključiti veći broj populacija sa šireg prostora. Imajući u vidu da se *Th. marschallianus* i *Th. pannonicus* genetički nedovoljno razlikuju, za dobijanje jasnije slike odnosa ove dve vrste, u istraživanja treba uključiti veći broj populacija, naročito onih koje su geografski udaljenije. Takođe, trebalo bi primeniti još neke molekularne tehnike prikladne za ispitivanja populacione varijabilnosti, kao što su mikrosateliti.
10. Da bi se dobila jasnija slika o najverovatnije monofiletskom poreklu podsekcije *Pseudomarginati* kao i potvrda o odgovarajućem shvatanju okvira vrsta, u daljim ispitivanjima treba uključiti veći broj vrsta i populacija, uz primenu drugih molekularnih markera..
11. Na osnovu rezultata istraživanja, može se zaključiti da su hemotaksonomski i molekularni pristup i na ovom modelu pokazali značajnu kompatibilnost. To ukazuje na potrebu proučavanja ciljnih taksona sa hemotaksonomskog, molekularnog, kao i drugih aspekata u rešavanju filogenetskih odnosa i njihovog taksonomskog statusa. Kombinovanje pristupa je posebno važno u slučajevima

kada se radi o grupama čiji su predstavnici morfološki veoma varijabilni i nedovoljno diferencirani, kao što su taksoni iz sekcije *Serpyllum*, kao i iz drugih sekcija izuzetno kompleksnog roda *Thymus*. Jedino takav sveobuhvatan pristup može da pruži pouzdaniju sliku o evoluciji i filogenetskim odnosima unutar istraživane srodničke grupe biljaka.

Literatura

Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A., Sanchez Palomino, S.S., Carrasco, L. (1997). Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytother. Res.* 11: 198–202.

Adams, R. P. (2001). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation: Illinois.

Adzet, T., Granger, R., Passet, J., San Martin, R. (1977a). Le polymorphisme chimique dans le genre *Thymus*: sa signification taxonomique. *Biochem. Syst. Ecol.* 5: 269-72.

Adzet, T., Granger, R., Passet, J., San Martin, R. (1977b) Chimiotypes de *Thymus mastichina* L. *Plant. Méd. Phytothér.* 11: 275-280.

Ausloos, P., Clifton, C., Lias, S. G., Shamim, A., Stein, S. (1992). NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, v. 4.0; U.S. Department of Commerce: Gaithersburg, MD.

Barberán, F.A.T. (1986). The flavonoid compounds from the Labiatae. *Fitoterapia* 57: 67-95.

Barberán, F.A.T., Hernández, L., Tonás, F. (1986). Chemotaxonomic study of flavonoids in *Thymbra capitata*. *Phytochemistry* 25 (2): 561-562.

Barberán, F.A.T., Nunez, J.M., Tomas F. (1985). An HPLC study of flavones from some Spanish Sideritis species. *Phytochemistry* 24: 1285-1288.

Beardsley, P.M., Yen, A., Olmstead, R.G., (2003). AFLP phylogeny of *Mimulus* section *Erythranthe* and the evolution of Hummingbird pollination. *Evolution* 57: 1397–1410.

Bellino, A., Venturella, P., Marcenó, C. (1980). Naringenin and neopocirin from *Micromeria* species and *Calamintha nepeta*. *Fitoterapia* 51: 163-165.

- Bentham, G. (1834). Lab. Gen. Sp.: *Thymus*, London.
- Bentham, G. (1876). Labiatae. In G. Bentham, J. D. Hooker ed(s). Genera plantarum, vol. 2, London: Reeve & Co. Pp. 1160-1223.
- Blázquez, M.A., Zafra-Polo, M.C., Villar, A. (1989) The volatile oil of *Thymus leptophyllus* growing in Spain. *Planta Med.*, 55: 198.
- Boissier, E. (1839-1845). Voyage botanique dans le Midi de l'Espagne, Paris.
- Brauchler, C., Meimberg, H., Heubl, G. (2010). Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) - Taxonomy, biogeography and conflicts. *Mol. Phylogenet. and Evol.* 55: 501–523.
- Brauchler, C., Meimberg, H., Abele, T., Heubl, G. (2005). Polyphyly of the genus *Micromeria* (Lamiaceae) – evidence from cpDNA sequence data. *Taxon* 54: 639–650.
- Briquet, J. (1897). Labiatae. In A. Engler and K. Prantl (eds), Die Nutlrlichen Pflanzenfdmilien IV 36 (a), Leipzig.
- Brotero, F. A. (1804). Flora Lwitanica, Lisbon.
- Bryant, J.P., Provenza, F.D., Pastor, J., Reichardt, P.B., Clausen, T.P., Toit (du), J.T. (1991). Interactions between woody plants and browsing mammals mediated by secondary metabolites. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 431-446.
- Bucar, F., Males, Z., Plazibat, M. (2005). Essential oil of *Thymus bracteosus* Vis. ex Benth., an Endemic Species of Dinaric Karst. *J. Essent. oil Res.* 17 (4): 457-458.
- Bunsawat, J., Elliott, N.E., Hertweck, K.L., Sproles, E., Alice, L.A., (2004). Phylogenetics of *Mentha* (Lamiaceae): evidence from chloroplast DNA sequences. *Syst. Bot.* 29: 959–964.
- Burzanska-Hermann, Z. (1978). Isolation and identification of components of the flavonoid fraction of native *Mentha* herbs. *Acta Pol. Pharm.* 35 (6): 673-680.

- Cabo, J., Cabo, M.M., Crespo, M.E., Jiménez, J., Navarro, C. (1986a). *Thymus granatensis* Boiss.: II. Etude de son cycle evolutif. Plant. Méd. Phytothh. 20: 129-134.
- Cabo, J., Cabo, M.M., Crespo, M.E., JimCnez, J. and Navarro, C. (1986b). *Thymus granatensis* Boiss.: I. Etude qualitative et quantitative de son huile essentielle. Plant. Méd. Phytothh. 20: 18-24.
- Cabo, J., Crespo, M.E., Jiménez, J., Navarro, C., Risco, S. (1987). Seasonal variation of essential oil yield and composition of *Thymus hyemalis*. Planta Med. 53: 380-383.
- Çadirci, E., Süleyman, H., Gürbüz, P., Kuruüzüm Uz, A., Güvenalp, Z., Demirezer, L. O. (2012). Anti-inflammatory effects of different extracts from three *Salvia* species. Turk. J. Biol. 36: 59-64.
- Cantino, P.D., Harley, R.M., Wagstaff, S.J. (1992). Genera of Labiatae: Status and Classification. In R.M. Harley & T. Reynolds (editors.). Advances in Labiate Science: 511-522 (1992).
- Cantino, P.D., Sanders, R.W. (1986). Subfamilial classification of Labiatae. Syst. Bot. 11: 163-85.
- Carović-Stanko, K., Liber, Z., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M., Kolak, I., Satovic, Z. (2011). Molecular and chemical characterization of the most widespread *Ocimum* species. Plant. Syst. Evol. 294: 253–262.
- Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G., Morgan, D., Mishler, B.D., Duvall, M.R., Price, R.A., Hills, H.G., Qiu, Y.-L, Kron, K.A., Rettig, J.H., Conti, E., Palmer, J.D., Manhart, J.R., Sytsma, K.J., Michaels, H.J., Kress, W.J., Karol, K.G., Clark, W.D., Hedren, M., Gaut, B.S., Jansen, R.K., Kim, K.-J., Wimpee, C.F., Smith, J.F., Furnier, G.R., Strauss, S.H., Xiang, Q.-Y., Plunkett, G.M., Soltis, P.S., Swensen, S.M., Williams, S.E., Gadek, P.A., Quinn, C.J., Eguiarte, L.E., Les, D.H., Golenberg, E., Learn, G.H.J., Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Dayanandan, S., Albert, V.A., (1993). Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide

sequences from the plastid gene *rbcL*. Ann. Missouri Botanical Garden 80: 528–580.

Corticchiato, M., Bernardini, A., Costa, J., Bayet, C., Saunois, A., Voirin, B. (1995). Free flavonoid aglycones from *Thymus herba-barona* and its monoterpene chemotypes. Phytochemistry 40: 115-120.

Corticchiato, M., Tomi, F., Bernardini, A.F., Casanova, J. (1998). Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus herba-barona* Lois. Biochem. Syst. Ecol. 26: 915-932.

Čajkanović, V. (1985). Rečnik srpskih narodnih verovanja o biljkama. SANU, SKZ, Beograd, 1985.

Dajic Stevanovic, Z., Sostaric, I. (2006). Review of some useful methods in taxonomical interpretation of difficult taxa of medicinal and aromatic plants. Case: *Thymus* L. Proceedings of the 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South-East European Countries, 28-31 May, Iasi, Romania: 63-71.

Dajic Stevanovic, Z., Sostaric, I., Marin, P.D., Stojanovic, D., Ristic, M. (2008). Population variability in *Thymus glabrescens* Willd. from Serbia: morphology, anatomy and essential oil composition. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 60 (3): 475-483.

De Lisi, A., Tedone, L., Montesano, V., Sarli, G., Negro, D. (2011). Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. Food Chemistry 125: 1284–1286.

Després, L., Gielly, L., Redoutet, B., Taberlet, P. (2003). Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. Molecular Phylogenetics and Evolution 27: 185-196.

Didry, N., Dubreuil L., Pinkas, M. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria, Pharm. Acta Helv. 69: 25–28.

- Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M. (1993). Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*. 48: 301–304.
- Diklić, N., 1974. *Thymus* L. In: Josifović, M. (Ed.), *Flora R. Srbije*, SANU, Belgrade, pp. 475-509.
- Dixon, C. J., Schönswetter, P., Suda, J., Wiedermann, M. M., Schneeweiss, G. M. (2009). Reciprocal Pleistocene origin and postglacial range formation of an allopolyploid and its sympatric ancestors (*Androsace adfinis* group, Primulaceae). *Mol. Phyl. Evol.* 50: 74–83.
- Dodd, R. S., Kashani, N. (2003). Molecular differentiation and diversity among the California red oaks (Fagaceae; *Quercus* section *Lobatae*). *Theoretical and Applied Genetics* 107: 884 – 892 .
- Dorman, H.J., Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.
- Echeverrigaray, S., Agostini, G., Atti-Serfini, L., Paroul, N., Pauletti, G.F., Atti dos Santos, A.C. (2001). Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4220–4223.
- Edwards, C., Soltis, D.E., Soltis, P.S. (2006). Molecular phylogeny of *Conradina* and other shrub mints (Lamiaceae) from the southeastern USA: evidence for Hybridization in Pleistocene refugia? *Syst. Bot.* 31: 193–207.
- Edwards, C.E., Lefkowitz, D., Soltis, D.E., Soltis, P.S. (2008a). Phylogeny of *Conradina*, related southeastern scrub mints (Lamiaceae) based on GapC gene sequences. *Int. J. Plant Sci* 169 (4): 579–594.
- Edwards, C.E., Soltis, D.E., Soltis, P.S., (2008b). Using patterns of genetic structure based on microsatellite loci to distinguish between hybridization and incomplete lineage sorting in *Conradina*. *Mol. Ecol.* 17: 5157–5174.
- Elena-Rossell, J.A. (1976). *Projet d'une etude de tuxonomie exphimentale du genre Thymus*. Doctoral thesis, Montpellier.

- Erdtman, G. (1945). Pollen morphology and plant taxonomy. IV. Labiatae, Verbenaceae, and Avicenniaceae. *Svensk Bot. Tidskr.* 39:279-285.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Fadli, M., Saada, A., Sayadib, S., Chevalierc, J., Mezriouia, N. E., Pagès, J. M., Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 19: 464– 471.
- Fan, C., Qiu-Yun Xiang, J. (2003). Phylogenetic analyses of Cornales based on 26S rDNA and combined 26S rDNA-*matK-rbcL* sequence data. *American Journal of Botany* 90: 1357-1372.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fernandes, R., Heywood, V.H. (1972) In: *Flora Europaea* Vol. 3. Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., et al. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge.
- Ferreres, F., Barberán, F.A.T., Tomas, F. (1985). 5,6,4'-trihidroxy-7,8-dimethoxyflavone from *Thymus membranaceus*. *Phytochemistry* 24 (8): 1869-1871.
- Ferreres, F., Tomás-Lorente, F., Tomás-Barberán, F.A. (1989). Biochemical Identification of *Sideritis serrata* x *S. bourgaeana* hybrids by HPLC analyses of flavonoids. *Z. Naturforsch* 44c: 568-572.

García Martín, D. and García Vallejo, M.C. (1983). Chemotypes of *Thymus zygis* (Lofl.) L. of Guadarrama Sierra and other places in Castile (Spain). 9th International Essential Oil Congress, Singapore 1983: 134-140.

García Vallejo, M.C., Garcia Martín, D., Muñoz, F. (1984). Avance de un estudio sobre las esencias de *Thymus mastichina* L. español ("Mejorana de España"). An. Inst. Nac. Inv. Agr. (Madrid), Ser. Forestal, 8: 201-218.

Goldblatt, P., Savolainen, V., Porteous, O., Sostaric, I., Powell, M., Reeves, G., Manning, J.C., Barraclough, T.G., Chase, M.W. (2002). Radiation in the Cape flora and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. Molec. Phylogenet. Evol. 25. (2): 241-360.

Gonçalves, M.J., Cruzb, M.T., Cavaleiroa, C., Lopesb, M.C., Salgueiro, L. (2010). Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. Industrial Crops and Products 32: 70–75.

Gouyon, P.H., Vernet, P., Guillerm, J.L., Valdeyron, G. (1986). Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphism in *Thymus vulgaris* L. Heredity, 57: 59-66.

Granger, R., Passet, J. (1973). *Thymus vulgaris* spontane de France: races chimiques et chemotaxonomie. Phytochemistry 12. (7): 1683-1691

Granger, R., Passet, J., Teulade-Arbousset, G. (1963). Diversite des essences de *Thymus vulgaris* L. La France et ses Parfums, 6: 225-230.

Grayer-Barkmeijer, R.J., (1978). Flavonoids in *Parahebe* and *Veronica*: a chemotaxonomic study. Biochem. Syst. Ecol. 6, 131-137.

Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kite, G.C., Price, A.M., Kokubun, T. (2001). Distribution of 8-oxygenated leaf-surface flavones in the genus *Ocimum*. Phytochemistry 56: 559-567.

Greger, H. (1978). Comparative phytochemistry and systematics of *Anacyclus*. Biochem. Syst. Ecol. 6. (1): 11-17.

- Grujić Jovanović, S., Marin, P.D., Dzamić, A., Ristić, M. (2009). Essential oil composition of *Thymus longicaulis* from Serbia. *Chemistry of Natural Compounds* 45 (2): 265-266.
- Guerin, G.R. (2005). Nutlet morphology in *Hemigenia* R.Br. and *Microcorys* R.Br. (Lamiaceae). *Pl. Syst. Evol.* 254: 49–68.
- Gurni, A.A., Kubitzki, K. (1981). Flavonoid chemistry and systematics of the Dilleniaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 9: 109-114.
- Guo, Y.-P., Saukel, J., Mittermayr, R., Ehrendorfer, F. (2005). AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae). *New Phytologist* 166: 273–290.
- Guo, Y.-P., Saukel, J., Ehrendorfer, F. (2008). AFLP Trees versus scatterplots: evolution and phylogeography of the polyploidy complex *Achillea millefolium* agg. (Asteraceae). *Taxon* 57 (1): 153-169.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan P.D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontolo Electron* 4(1): 9.
- Harborne, J.B. (1967). *Comparative biochemistry of the flavonoids*. Academic Press, London and New York.
- Harborne, J.B. (1975). Biochemical systematic of flavonoids. In: Harborne, J.B., Marby, T.J., Mabry, H. (EdS), *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London. 1056-1095.
- Harborne, J.B. (1977). Variation in pigment patterns in *Pyrrhopappus* and related taxa of the Cichorieae. *Phytochemistry* 16: 927-928.
- Harborne, J.B. (1984). *Plant Chemosystematics*. Academic Press, London.
- Harborne, J.B., Boardley, M. (1985). The widespread occurrence zwitterions in nature of anthocyanins as zwitterions. *Z. Naturforsch. C.* 40: 305-308

- Harborne, J.B., Tomas-Barberan, F.A., Williams, C.A., Gil, M.I. (1986). A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry*. 25. 2811-16.
- Hare, J.D., (2002). Geographic and genetic variation in the leaf surface resin components of *Mimulus aurantiacus* from southern California. *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 281-296.
- Harley, R.M., Atkins, S., Budansteve, A.L., Cantino, .PD., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M. (2004). Labiatae. In: Kubitzki, K. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants VII*. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Hartvig, P. (1987). A taxonomical revision of *Thymus* sect. *Teucrioides* (*Lamiaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 155: 197-213.
- Hernández, L.M., Tomás-Barberán, F.A., Tomás-Lorente, F. (1987). A chemotaxonomic study of free flavone aglicons from some Iberian *Thymus* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 15 (1): 61-76.
- Hörhamer, L., Wsagner, H. (1962). In: Gore, T.S. (EdS), *Chemistry of Natural and Synthetic Colour Markers*. Academic Press, London: 315.
- Horváth, G., Kocsis, B., Botz, L., Németh, J., Szabó, L.Gy. (2002). Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioautography. *Acta Biol. Szeged.* 46: 145-146.
- Horwath, A.B., Grayer, R.J., Keith-Lucas, M.D., Simmonds, M.S.J., (2008). Chemical characterisation of wild populations of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology* 36, 117-133.
- Huff, D.R., (1997). RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. *Crop Sci.* 37, 557-594.
- Huguet del Villar, E. (1934). Quelques *Thymus* du Sud-est Ibérique. *Cavanillesia*, 6: 104-125.

- Husain, S.Z., Heywood, V.H., Markham, K.R. (1982). Distribution of flavonoids as chemotaxonomic markers in the genus *Origanum* L. and related genera in Labiatae. In: Margaris, N., Koedam, A., Vokou, D. ed(s). Aromatic plants: basic and applied aspects. Martinus Nijhoff, The Hague, Boston, London. 141-52.
- Ietswaart, J.H. (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). The Hague, Boston, London Leiden University Press.
- Ishikawa, N., Yokoyama, J., Tsukaya, H. (2009). Molecular evidence of reticulate evolution in the subgenus *Plantago* (Plantaginaceae). Am. J. Bot. 96 (9): 1627-1635.
- Jalas, J. (1982) *Thymus*. In K.H. Rechinger (ed.), Flora Iranica. Graz. 532-551.
- Jalas, J. (1971). Notes on *Thymus* L. (*Labiatae*) in Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. Bot. J. Linn. Soc. 64(2): 199-215.
- Jalas, J. (1972). *Thymus* L. In: Flora Europaea Vol. 3. Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., et al. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 172-182.
- Jalas, J. (1973). *Thymus* subsect. *Pseudomarginati* in the Himalayas and adjoining western mountain ranges, and in Caucasia. Ann. Bot. Fennici 10: 104-122.
- Jalas, J. (1982) *Thymus*. In P.H. Davis (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 7, Edinburgh, pp. 349-382.
- Jamzad, Z, Chase, W.M., Ingrouille, M., Simmonds, M.S.J., Jalili, A., (2003). Phylogenetic relationships in *Nepeta* L. (Lamiaceae) and related genera based on ITS sequence data. Taxon 52: 21-32.
- Jullien, F., Voirin, B., Bermillon, J., Favre-Bonvin, J. (1984). Highly oxygenated flavones from *Mentha piperita*. Phytochemistry 23: 2972.

- Karuza-Stojaković, L., Pavlović, S., Živanović, P., Todorović, B. (1989). Composition and yield of essential oils of various species of the genus *Thymus* L. Arh. Farm. 39: 105-111.
- Kaul, T.N., Middleton, E. Jr, Ogra, P.L. (1985). Antiviral effect of flavonoids on human viruses. J. Med. Virol.: 15, 71–79.
- Kaya, A., Dirmenci, T. (2008). Nutlet Surface Micromorphology of the Genus *Nepeta* L. (Lamiaceae) in Turkey. Turk. J. Bot 32: 103-112.
- Kelleher , C. T., Hodkinson, T. R., Douglas, G. C., Kelly, D. L. (2005). Species distinction in Irish populations of *Quercus petraea* and *Q. robur* : Morphological versus molecular analyses. Ann. Bot. 96 (7): 1237 – 1246 .
- Kizil, S., Uyart, F. (2006). Antimicrobial activities of some Thyme (*Thymus*, *Staureja*, *Origanum* and *Thymbra*) species against important plant pathogens. Asian J. Chem. 18: 1455–1461.
- Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilov, T. (1995). The composition of the essential oils from *Thymus macedonicus* (Degen et Urumov) Ronn. subsp. *macedonicus* and *Thymus tosevii* Velen. subsp. *tosevii* growing in Macedonia. Farmacija, 43: 13-14.
- Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilof, T. (1996a). Comparative essential oils study of *Thymus longidens* Velen. var. *lanicaulis* Ronn. and *Thymus longidens* var. *dassareticus* Ronn. Bolletino Chimico Farmaceutico, 135: 239-243.
- Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilov, T. (1996b). Composition of the essential oil from *Thymus moesiacus* from Macedonia. Planta Med., 62: 78-79.
- Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilov, T., Dorevski, K. (1996c). Essential oil composition of *Thymus tosevii* ssp. *tosevii* var. *longifrons*. Acta Pharm. (Zagreb), 46, 303-308.
- Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilov, T., Dorevski, K. and Ristov, T. (1997). Composition of essential oils of *Thymus tosevii* ssp. *tosevii* and *Thymus tosevii* ssp. *substriatus* from Macedonia. Pharmazie, 52: 382-386.

- Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilov, T., Matevski, V. (1998a). Composition of the essential oils of *Thymus jankae* Chel. var. *jankae*, *T. jankae* var. *pantotrichw* Ronn. and *T. jankae* var. *patentipilus* Lyka from Macedonia. J. Essent. Oil Res., 10, 191-194.
- Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilov, T., Matevski (1998b). Composition of the essential oil of *Thymus rohlena* Velen. from Macedonia. J. Essent. Oil Res., 10, 537-538.
- Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilov, T., Matevski (1998c). Composition of the essential oil of *Thymus albanus* ssp. *albanus* H. Braun from Macedonia. J. Essent. Oil Res., 10: 335-336.
- Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilov, T. (1999). Composition of the essential oil of *Thymus macedonicus* subsp. *macedonicus* (Degen et Urum.) Ronn. from Macedonia. Herba Pol., 45: 80-86.
- Kuštrak, D., Martinis, Z., Kuftinec, J., Blazevic, N. (1990). Composition of the essential oils of some *Thymus* and *Thymbra* species. Flavour Fragr. J., 5: 227-231.
- Kuzoff, R. K., Sweere, J. A., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Zimmer, E. A. (1998). The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plant. Molecular Biology Evolution 15: 251–263.
- Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M., Sala, F. (2004). Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. Plant Science 167: 725–731.
- Lewontin, R.C., (1972). The apportionment of human diversity. In: Dobzhansky, T., Hecht, M.K, Steere, W.C. (Eds), Evolutionary Biology 6. Appleton-Century-Crofts, New York, pp. 381–398.
- Lihova, J., Kučera, J., Perny, M., Marhold, K., (2007). Hybridization between two polyploid *Cardamine* (Brassicaceae) species in northwestern Spain: discordance between morphological and genetic variation patterns. Ann. Bot. 99 (6): 1083-1096.

- López, V., Akerreta, S., Casanova, E., García-Mina, J. M., Cavero, R. Y., Calvo, M. I. (2007). *In Vitro* Antioxidant and Anti-rhizopus Activities of Lamiaceae Herbal Extracts. *Plant Foods Hum. Nutr.* 62:151–155.
- Ložienė, K., Vaičiūnienė, J., Venskutonis, P.R. (2003). Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 249–259.
- Ložienė, K., Venskutonis, P.R., Šipailienė, A., Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry* 103: 546–559.
- Luckow, M. (1995). Species concepts: assumptions, methods, and applications. *Syst. Bot.* 20, 589–605.
- Maksimović, Z., Milenković, M., Vučićević, D., Ristić M. (2008a). Chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus pannonicus* All. (Lamiaceae) essential oil. *Cent. Eur. J. Biol.* 3: 149-154.
- Maksimović, Z., Stojanović, D., Šoštarić, I., Dajić, Z., Ristić, M., (2008b). Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (11): 2036-2041.
- Mamadalieva, N,Z., Herrmann, F., El-Readi, M,Z., Tahrani, A., Hamoud, R, Egamberdieva, D.R., Azimova, S.S., Wink, M. (2011). Flavonoids in *Scutellaria immaculata* and *S. ramosissima* (Lamiaceae) and their biological activity. *J Pharm Pharmacol.* 63(10): 1346-57.
- Marin, P.D. (1989). A chemotaxonomical and micromorphological study of *Micromeria* Benth. and related genera from tribe Saturejeae (Lamiaceae). Unpublished Ph. D. thesis, University of Belgrade.
- Marin, P.D. (1995). Diversity and Taxonomical significance of flavonoids in the Lamiaceae. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 47 (3-4): 101-109.

- Marin, P.D. (1996). Orašice i trihome u familiji Lamiaceae. Biološki fakultet, Beograd.
- Marin, P.D. (2003). Biohemijska i molekularna sistematika biljaka. NNK Internacional, Beograd.
- Marin, P.D., Grayer, R.J., Kite, G.C., Matevski, V. (2003). External leaf flavonoids of *Thymus* species from Macedonia. *Biochem. Syst. Ecol.* 31. (11), 1291-1307.
- Marin, P.D., Grayer, R.J., Kite, G.C., Veljic, M. (2005). External flavones from *Thymus striatus* Vahl (Lamiaceae) (2005). *Biochem. Syst. Ecol.* 33 (11): 1179-1182.
- Marin, M., Koko, V., Duletic-Laušević, S., Marin, P.D. (2008). Micromorphology of trichomes of *Thymus malyi* (Lamiaceae). *Journal of Microscopy* 232: 406 – 409
- Marinova, E.M. and Yanishlieva, N.V. (1996). Antioxidative activity of phenolic acids on triacylglycerols and fatty acid methyl esters from olive oil. *Food Chem.* 56: 139–145
- Markham, K.R., Mabry, T.J, Swift, W.T. (1970). Distribution of flavonoids in the genus *Baptisia* (Leguminosae). *Phytochemistry* 9: 2359-2364.
- Mártonfi, P. (1992). Essential oil content in *Thymus alpestris* pestris in Slovakia. *Thaiszia, Kosice* 2: 75-78.
- Mártonfi, P. Greijtovsky, A., Repcak, M. (1994) Chemotype pattern differentiation of *Thymus pulegioides* on different substrates. *Biochem. Syst. Ecol.* 22: 819-825.
- Mastelic, J., Grzunov, K., Kravar, A. (1992). The chemical composition of terpene alcohols and phenols from the essential oil and terpene glycosides isolated from *Thymus pulegioides* L. grown wild in Dalmatia. *Riv. Ital.* 3: 19-22.
- Mayol, M., Rosselló, J.A., Mus, M., Morales, R. (1990). *Thymus herba-barona* Loisel., novedad para España, en Mallorca. *Anales Jard. Bot. Madrid* 47: 516.

- McPherson, J. K. & Muller, C. H. (1969). Allelopathic effects of *Adenostomafasciculatum*, 'chamise', in the California chaparral. *Ecological Monographs*, 39: 177-198.
- Menitsky, G.L., (1973). Supraspecific taxa in the genus *Thymus* L. (Labiatae). I-II. *Botaniceskyj Zurnal (Leningrad)* 58, 794–805.
- Menitsky, G.L., (1973). Supraspecific taxa in the genus *Thymus* L. (Labiatae). I-II. *Botaniceskyj Zurnal (Leningrad)* 58, 994–998.
- Messana, I., Ferrari, F., Souza, M.A.M., Gacs-Bait, E. (1990). (-)-Salzol, an isopimaranediterpene, and a chalcone from *Hyptis salzmanii*. *Phytochemistry* 29: 329-332.
- Meudt, H. M., Clarke, A. C., 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.* 12, 106–117.
- Mockuté, D. and Bernotiené, G. (1998). Essential oil of lemon-scented *Thymus pulegioides* L. grown wild in Vilnius vicinity. *Rust. Res.*, 34, 131-134.
- Mockuté, D. and Bernotiené, G. (1999). The main citral-geraniol and cavacrol chemotype of the essential oil of *Thymus pulegioides* L. growing wild in Vilnius district. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3787-3790.
- Mockuté, D. and Bernotiené, G. (2001). The α -terpenyl acetate chemotype of essential oil of *Thymus pulegioides* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 69-76.
- Moghaddam, M., Omidbiagi, R., Naghavi, M.R., 2011. Evaluation of genetic diversity among Iranian accessions of *Ocimum* spp. using AFLP markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 39: 619-626.
- Moon, H.K., Hong, S.P., Smets, E., Huysmans, S. (2009a). Micromorphology and Character Evolution of Nutlets in Tribe Mentheae (Nepetoideae, Lamiaceae). *Systematic Botany* 34(4):760-776.

- Moon, H.K., Hong, S.P., Smets, E., Huysmans, S. (2009b). Phylogenetic significance of leaf micromorphology and anatomy in the tribe Mentheae (Nepetoideae: Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 211–231.
- Morales, R. (1986). Taxonomía de los géneros *Thymus* (excluida la sección *Serpyllum*) y *Thymbra* en la Península Ibérica. *Ruizia* 3: 1-324.
- Morales, R. (1989). El género *Thymus* L. en la región mediterránea occidental (*Lamiaceae*). *Biocosme Mésogéen* 6(4): 205-211.
- Morales, R. (1994). El género *Thymus* L. (Labiatae) en Africa. *Anales Jard. Bot. Madrid* 51(2): 205-236.
- Morales, R. (1996). Studies on the genus *Thymus*. *Lamiales Newsletter*. 4: 6-8.
- Morales, R. (1997). Synopsis of the Genus *Thymus* L. In the Mediterranean Area. *Lagascalia* 19 (1-2): 249-262.
- Morales, R., (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl-Biskup, E., Sáez, F. (Eds.), *Thyme: The Genus Thymus*. Taylor and Francis, London and New York, pp. 1-43.
- Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., Lorusso, E., Avato, P. (2010). Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Industrial Crops and Products* 32: 639–649
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J. (2008). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control* 20, 157–160.
- Nei, M., Li, W.H., (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 5269–5273.

- Nixon, K.C., Wheeler, Q.D., (1990). An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6, 211–223.
- Nguefacka, J., Tamguea, O., Lekagne Dongmoa, J.B., Dakolea, C.D., Lethb, V., Vismerec, H.F., Amvam Zolloa, P.H., Nkengfackd, A.E. (2012). Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control* 23: 377-383.
- Ortego, J., Bonal, R., (2009). Natural hybridisation between kermes (*Quercus coccifera* L.) and holm oaks (*Q. ilex* L.) revealed by microsatellite markers. *Plant Biol.* 12, 234-238.
- Özkan, M., Aktaş K., Özdemir C., Guerin, G. (2009). Nutlet morphology and its taxonomic utility in *Salvia* (Lamiaceae: Mentheae) from Turkey. *Acta Bot. Croat.* 68 (1): 105–115.
- Pančić, J. (1865). *Flora u okolini Beogradskoj*. Državna Štamparija, Beograd.
- Pančić, J. (1874). *Flora Kneževine Srbije*. Državna Štamparija, Beograd.
- Pančić, J. (1884). *Dodatak Flori kneževine Srbije*. Kralj.-Srp. Državne Štamparije, Beograd.
- Paolini, J., Falchi, A., Quilichini, Y., Desjobert, J.M., De Cian, M.C., Varesi, L., Costa, J. (2009). Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry* 70: 1146–1160.
- Passet, J. (1971). *Thymus vulgaris* L. chemotaxonomie et biogenese monoterpenique: (These Univ. Montpellier.) 153p.. Ref. in *Bull. Signal., Biol. Physiol. Veg.*, 33(5): 4564 (1972)
- Paton, A.J., Springate, D., Suddee, S., Otieno, D., Grayer, R.J., Harley, M., Willis, F., Simmonds, M.S.J., Powell M., Savolainen, V., (2004). Phylogeny and evolution of Basils and allies (Ocimeae, Labiatae) based on three plastid DNA regions. *Molec. Phylogenet. Evol.* 31, 277–299.

- Patwardhan, S.A., Gupta A.S. (1981). An octomethoxy flavones from *Pogostemon purporosceus*. *Phytochemistry* 20: 1458.
- Pau, L. (1929). Introducción al estudio de los tomillos españoles. *Mem. Real. Soc. Esp. Hist. Nat.* 5: 65-71.
- Petrović, S. (1882). Flora okoline Niša. Kralj.-Srp. Državne Štamparije, Beograd.
- Petrović, S. (1885). Dodatak flori okoline Niša. Kralj.-Srp. Državne Štamparije, Beograd.
- Pluhár, Zs., Héthelyi, É., Kutta, G., Kamondy, L. (2007). Evaluation of environmental factors influencing essential oil quality of *Thymus pannonicus* All. and *Thymus praecox* Opiz. *J. Herbs Spices Med. Plants.* 3: 23-43
- Prather, L.A., Monfils, A.K., Posto, A.L., Williams, R.A., (2002). Monophyly and phylogeny of *Monarda* (Lamiaceae): implications of sequence data from the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA. *Syst. Bot.* 27, 127–137.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Rahimmalek, M., Tabatabaei, B.E.S., Arzani, A., Etemadi, N. (2009). Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochem. Syst. Ecol.* 37, 354-361.
- Richard, H., Benjilali, B., Banquour, N. and Baritoux, O. (1985) Étude de diverses huiles essentielles de Thym du Maroc. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 18: 105-110.
- Rigano, D., Formisano, C., Basile, A., Lavitola, A., Senatore, F., Rosselli, S., Bruno, M. (2007). Antibacterial Activity of Flavonoids and Phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*, *Phytother. Res.* 21: 395–397.
- Ristić, M.D., Duletić-Laušević, S., Knežević-Vukčević, J., Marin, P.D., Simić, D., Vukojević, J., Janačković, P., Vajs, V. (2000). Antimicrobial activity of essential

oils and ethanol extract of *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae), *Phytotherapy Research*, 14 (4): 267-271.

Rodriguez, B. (1977). 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetrametoxyflavone from *Sideritis mugronensis*. *Pytochemistry* 16: 800.

Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Publications, New York.

Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19, 681–687.

Ruiz, E., Marticorena, C., Crawford, D., Stuessy, T., Gonzalez, F., Montoya, R., Silva, M., Becerra, J. (2001). Morphological and ITS sequence divergence between taxa of *Cuminia* (Lamiaceae), an endemic genus of the Juan Fernandez Islands, Chile. *Brittonia* 52, 341–350.

Saad, A., Fadli, M., Bouaziz, M., Benharref, A., Mezrioui, N.E., Hassani, L., 2010. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine* 17, 1057–1060.

Sáez, F., Stahl-Biskup, E. (2002). Essential oil polymorphism in the genus *Thymus*. In: Stahl Biskup, E., Sáez, F. ed(s). *Thyme: the genus Thymus*. (Medicinal and aromatic plants: industrial profiles; v.24.). London: Taylor and Francis pp. 126-143.

Safer, S., Tremetsberger, K., Guo, Y.-P., Kohl, G., Samuel, M. R., Stuessy, T. F., Stuppner, H. (2011). Phylogenetic relationships in the genus *Leontopodium* (Asteraceae: Gnaphalieae) based on AFLP data. *Bot. J. Linn. Soc.* 165, 364–377.

Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A.H., Djafari-Bidgoli. Z., Batooli, H. (2009). GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry* 115: 1524–1528.

Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4), 406-25.

Sakagami, Y., Iinuma, M., Piyasena, K.G.N.P., Dharmaratne, H.R.W., 2005. Antibacterial activity of α -mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine* 12, 203–208.

Salmaki, Y., Zarre, S. Jamzad, Z. (2008). Nutlet micromorphology and its systematic implication in *Stachys* L. (Lamiaceae) in Iran. *Feddes Repertorium* 119 7–8: 607–621. Sang, T., Crawford, D.J., Stuessy, T.F. (1995). Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6813–6817.

Salgueiro, L. R., Vila, R., Tomi, F., TomBs, X., Cafiigueral, S., Casanova, J., Proenga da Cunha, A., Adzet, T. (1997). Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus camphoratus*. *Phytochemistry* 45: 1177-1183.

Schmidt-Lebuhn, A.N. (2007). Using amplified fragment length polymorphism (AFLP) to unravel species relationships and delimitations in *Minthostachys* (Labiatae). *Bot. J. Linn. Soc.* 153, 9–19.

Schmidt-Lebuhn, A.N., (2008). Monophyly and phylogenetic relationships of *Minthostachys* (Labiatae, Nepetoideae) examined using morphological and nrITS data. *Plant Syst. Evol.* 270, 25–38.

Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. (2000). Arlequin: a software for population genetic data. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.*

Schulte, K., Silvestro, D., Kiehlmann, E., Vesely, S., Novoa, P., Zizka, G. (2010). Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57, 1105-1119.

Shonle, I., Bergelson, J. (2000). Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution* 54: 778-788.

Simonović, D. (1959). Botanički rečnik imena biljaka. SANU, Beograd.

Simeon de Bouchberg, M., Allegrini, J., Bessiere, C., Attisso, M., Passet, J., Granger, R. (1976) Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris* L. *Riv. Ital.*, 58: 527-536.

Slavkovska, V., Lakusic, B., Jancic, R., Mimica-Dukic, N. and Vujcic, D. (2006). Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus bracteosus* Vis. ex Bentham (Lamiaceae). *J. Essent. oil Res.* 18: 310-311.

Soković, M.D., Marin P D, Simić, D., Knežević-Vukčević, J., Vajs, V., Petrović, S. (2002). Antimutagenic activity of essential oil and crude extract of *Phlomis fruticosa*, *Pharmaceutical Biology*. 40 (4): 311-314.

Soković, M., Marin, P., Brkić, D., Van Griensven, L.J.L.D. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food Global Science Books*, 1(2), 220-226.

Soković, M., Glamoclija, J., Ćirić, A., Kataranovski, D., Marin, P.D., Vukojević, J., Brkić, D. (2008). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 34 (12) 1388-1393

Soković, M.D., Vukojević, J., Marin, P.D., Brkić, D.D., Vajs, V., Van Griensven L.J.L.D. (2009) Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14 (1):238-249.

Solitis, D., Soltis, P. (2000). Choosing an approach and appropriate gene for phylogenetic analysis. In: Soltis, D., Soltis, P., Doyle, J.J. (eds) *Molecular systematic of plants II, DNA sequencing*. Kulwer academic Publishers, Boston, Dordrecht, London: 1-42.

Stahl-Biskup, E. (1986). Das ätherische Öl norwegischer Thymianarten II. *Thymus pulegioides*. *Planta Med.* 52: 223-235.

Stahl-Biskup, E. (2002). Essential oil chemistry of the genus *Thymus* - a global view. In: Letchamo W, Saez F, Stahl-Biskup E (eds) *Medicinal and aromatic plants— industrial profiles: the genus Thymus*. Harwood Academic, Amsterdam: 75-124.

Sulamian, S.F., Culham, A., Harborne, J.B. (2003). Molecular Phylogeny of Fabaceae based on *rbcL* sequence data: With special emphasis on the tribe Mimoseae (Mimosoideae). *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, Vol. 11 (1): 9-35.

Swain, T. (1975). Evolution of flavonoid compounds. In: Harborne, J.B., Marby, T.J., Mabry, H. (Eds), *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London. 1096-1129.

Šilić, Č. (1979). Monografija rodova *Satureja* L., *Calamintha* Miller, *Micromeria* Benthams, *Acinos* Miller i *Clinopodium* L. U flori Jugoslavije. Zemaljski muzej BiH. Sarajevo.

Takagi, S., Yamaki, M., Inoue, K. (1981). Flavone di-C-glucosides from *Scutellaria baicalensis*, *Phytochemistry* 20 (10): 2443-2444.

Thompson, J.D. (2002) Population structure and the spatial dynamics of genetic polymorphisms in thyme. In: Letchamo W, Saez F, Stahl-Biskup E (eds) *Medicinal and aromatic plants— industrial profiles: the genus Thymus*. Harwood Academic, Amsterdam: 44–74.

Thompson, J.D., Chalchat, J.-C., Michet, A., Linhart, Y.B., Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology* 29(4): 859-880.

Tomás, F., Nieto, J.L., Barberán, F.A.T., Ferreres, F. (1986). Flavonoids from *Phlomis lychnitys*. *Phytochemistry* 25, 1253-1254.

Tomás-Barberán, F.A., Wollenweber, E. (1990). Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some Labiatae species. *Pl. Syst. Evol.* 173. (3-4): 109-118.

- Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I. (1992). Chemistry and natural distribution of flavonoids in the Labiatae. In: Harley, R.M., Reynolds, T. (Eds.), *Advances in Labiate Science*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 299-305.
- Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Marin, P.D., Tomás-Lorente, F. (1991). Flavonoids from some Yugoslavian *Micromeria* species: chemotaxonomical aspects. *Biochem. Syst. Ecol.* 19. (8): 697-698.
- Tomás-Barberán, F.A., Husain, S.Z., Gil, M.I. (1988). The distribution of methylated flavones in the Lamiaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 16: 43-46.
- Tomás-Lorente, F., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., Rivera, D., Obón, C. (1989). Verification of *Sideritis incana* x *S. angustifolia* hybrids by flavonoid analysis. *Phytochemistry* 28 (8): 2141-2143.
- Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H., Namba, T. (1985). Studies of Nepalese crude drugs. V. On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria baicalensis* Colebr. (1). *Chem. Pharm. Bull.* 33: 4457-4463.
- Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H., Suzuki, C. (1984) Studies of the constituents of *Scutellaria* species. IV. On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria baicalensis* Georggi (4). *J. Pharm. Soc. Japan* 104: 529-534.
- Trindade, H., Costa, M.M., Lima, A.S., Pedro, L.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. (2008). Genetic diversity and chemical polymorphism of *Thymus caespititius* from Pico, Saõ Jorge and Terceira islands (Azores). *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 790–797
- Trindade H., Costa, M.M., Lima, S.B., Pedro, L.G., Figueiredo, A.C., Barroso J.G. (2009). A combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for the characterization of *Thymus caespititius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal). *Biochem. Syst. Ecol.* 37, 670–677
- Trusty, J., Olmstead, R.G., Bogler, D.J., Santos-Guerra, A., Francisco-Ortega, J. (2004). Using molecular data to test a biogeographic connection of the Macaronesian genus *Bystropogon* (Lamiaceae) to the New World: a case of conflicting phylogenies. *Syst. Bot.* 29, 702–715.

Trusty, J.L., Olmstead, R.G., Santos-Guerra, A., Sa-Fontinha, S., Francisco-Ortega, J. (2005). Molecular phylogenetic of the Macaronesian endemic genus *Bystropogon* (Lamiaceae): palaeo-islands, ecological shifts and interisland colonizations. *Mol. Ecol.* 14, 1177–1189.

Van de Peer, Y., De Wachter, Y. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570.

Velasco Negueruela, A. and Perez Alonso, M.J. (1986) Aceites esenciales de tomillos ibéricos. VI. Contribución al estudio quimiotaxonomico (Terpenoides) del genero *Thymus* L. *Trab. Dep. Bothica* 13: 115-133.

Velenovsky, J. (1906). Vorstudien zu einer Monographie der Gattung *Thymus* L. *Bot. Zentralhl. Beih.*, 19 B2: 271-287.

Venturella, P., Bellino, A., M.L., Sorrentino, M. (1980). Aurapin, a new dihydroflavonol glycoside and other flavonoids from *Acinos alpinus*. *Heterocycles* 14 (12): 1979-1982.

Vernet, P., Gouyon, P.H., Valdeyron, G. (1986). Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L.: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetics*, 69: 227-231.

Vernet, P., Guillerm, J.L., Gouyon, P.H. (1977a). Le polymorphisme chimique de *Thymus vulgaris* L. (Labiée) I. Repartition des formes chimiques en relation avec certains facteurs écologiques. *Oecol. Plant.*, 12, 159-179.

Vernet, P., Guillerm, J.L., Gouyon, P.H. (1977b). Le polymorphisme chimique de *Thymus vulgaris* L. (Labiée) 11. Carte 2 l'échelle 1:125000 des formes chimiques dans la région de Saint-Martin-de-Londres (Hérault-France). *Oecol. Plant.*, 12, 181-194.

Vicioso, C. (1974) Contribución al conocimiento de los tomillos españoles. In: J. Ruiz del Castillo (ed.), *Anales Inst. Nac. Invest. Agrar. ser. Recursos Nat.*, 1: 11-63.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407–4414.
- Wagstaff, S. J., Olmstead, R. G., Cantino, P.D. (1995). Parsimony analysis of cpDNA restriction site variation in subfamily Nepetoideae (Labiatae) . *American Journal of Botany* 82: 886 – 892.
- Wagstaff, S. J., Olmstead, R. G. (1997). Phylogeny of Labiatae and Verbenaceae inferred from *rbcL* sequences. *Syst. Bot.* 22:165–179.
- Walker, J.B., Sytsma, K.J. (2007). Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Ann. Bot.* 100, 375–391.
- Walker, J.B., Sytsma, K.J., Treutlein, J., Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *Am. J. Bot.* 91, 1115–1125.
- Wang, H.K., Xia, Y., Yang, Z.Y., Natschke, S.L., Lee, K.H. (1998). Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Adv Exp Med Biol.* 439, 191–225.
- Willkomm, M. (1868). Labiatae. In M. Willkomm and J. Lange (eds), *Prodr. Fl. Hisp.*, 96. vol. 2, Stuttgart: 389-480.
- Young, D.A., Sterner, R.W. (1981). Leaf flavonoids of primitive dicotyledonous angiosperms: *Degeneria vitiensis* and *Idiospermum australiense*. *Biochem. Syst. Ecol.* 9: 185-188.
- Zouaria, N., Fakhfakhc, N., Zouarid, S., Bougatefc, A., Karraya, A., Neffati, M., Ayadie, M.A. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food and Bioproducts Processing* 89: 257–265.

Biografija autora

Ivan Šoštaarić rođen je 16. Januara 1971. godine u Beogradu. U Beogradu je završio osnovnu školu 1985. godine i gimnaziju 1989. godine. Diplomirao je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2001. godine, sa prosečnom ocenom 8,41 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije upisao je 2006. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Govori engleski i francuski jezik.

Od 2002. godine zaposlen je na Katedri za agrobotaniku, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Učestvovao je na dva nacionalna projekta i jednom međunarodnom projektu. Tri puta je boravio na stručnom usavršavanju u Jodrell Laboratory, Royal Botanical Gardens, Kew, Ujedinjeno Kraljevstvo.

Prvi autor je dva rad objavljena u časopisima međunarodnog značaja i koautor tri radova u časopisima međunarodnog značaja i jednog rad objavljenog u časopisu domaćeg značaja, kao i većeg broja kongresnih saopštenja.

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Иван Шоштарић

Број уписа ЕВ 060011

Студијски програм Експериментална и примењена ботаника

Наслов рада Фитохемијска и генетичка варијабилност врста из секције *Serpyllum* (Mill.) Benth. рода *Thymus* L. (Lamiaceae) у Србији

Ментор Проф. др Петар Марин, Проф. др Зора Дајић Стевановић

Потписани Иван Шоштарић

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 докторанда

У Београду, 31. 08. 2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Фитохемијска и генетичка варијабилност врста из секције *Serpyllum* (Mill.) Benth. рода *Thymus* L. (Lamiaceae) у Србији

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 докторанда

У Београду, 31. 08. 2012.

