

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 356/4 -7.2.
Датум: 30.01.2013. године

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на извештај о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. став 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета" број 131/06), дате сагласност на извештај о урађеној докторској дисертацији кандидата ДЕЈАНА ПЉЕВЉАКУШИЋА, дипл.инж.

Кандидат **ДЕЈАН (Стеван) ПЉЕВЉАКУШИЋ**, дипл. инж., пријавио је докторску дисертацију под називом: «ТЕХНОЛОШКО РЕШЕЊЕ ПРОИЗВОДЊЕ БИЉНЕ ЛЕКОВИТЕ СИРОВИНЕ ОД БРЋАНКЕ (*Arnica montana* L.) У СРБИЈИ».

из научне области: Ратарство и повртарство.

Универзитет је дана 01.12.2010. године, својим актом 02 број 020-4563/12-10 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «УТИЦАЈ УСЛОВА ГАЈЕЊА НА МОРФОЛОШКЕ И ХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ И БИОЛОШКЕ ЕФЕКТЕ ЕКСТРАКТА *Arnica montana* L.».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације ДЕЈАНА ПЉЕВЉАКУШИЋА, дипл. инж., образована је на седници одржаној 28.11.2012. године, одлуком Факултета број 356/2-5.3., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област

1. др Зора Дајић Стевановић, редовни професор, Пољопривредна ботаника,
2. др Славица Јелачић, ванр. професор, Лековито, ароматично и зачинско биље,
3. др Небојша Менковић, научни саветник, Фармакогнозија,
4. др Слободан Милосављевић, професор емеритус, Органска хемија,
5. др Теодора Јанковић, виши научни сарадник, Физиологија биљака.

Наставно-научно веће факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације, на седници одржаној 30.01.2013. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 356/4-7.2.
Датум: 30.01.2013. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 123. Закона о високом образовању и члана 24. Правилника о последипломским студијама и докторату наука, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 30.01.2013. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднео **ДЕЈАН ПЉЕВЉАКУШИЋ, дипл. инж.** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«УТИЦАЈ УСЛОВА ГАЈЕЊА НА МОРФОЛОШКЕ И ХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ И БИОЛОШКЕ ЕФЕКТЕ ЕКСТРАКТА *Arnica montana* L.»**.

II Универзитет је дана 01.12.2010. године, актом 02 број 020-4563/12-10 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Pljevljakušić, D., Rančić, D., Ristić, M., Vujisić, L., Radanović, D., Dajić-Stevanović, Z. (2012): Rhizome and root yield of the cultivated *Arnica montana* L., chemical composition and histochemical localization of essential oil. *Industrial Crops and Products*, 39 (1), pp. 177-189.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору проф. др Зори Дајић Стевановић, Институту за ратарство и повртарство, Студентској служби и архиви.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА

Датум: 07. 12. 2012.

Одлуком Наставно-научног већа факултета од 28. 11. 2012. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: „**Утицај услова гајења на морфолошке и хемијске особине и биолошке ефекте екстракта *Arnica montana* L.**“, кандидата дипл. инж. Дејана Пљевљакушића, па након што смо проучили завршену докторску дисертацију, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о дисертацији

Докторска дисертација дипл. инж. Дејана Пљевљакушића обухвата 218 страница текста нормалног прореда и уобичајеног формата, у оквиру којих је представљен 91 графикон и 42 табеле, као и 8 прилога. Испред основног текста се налази резиме са кључним речима, на српском и енглеском језику, приказ садржаја, као и списак коришћених скраћеница. У докторској дисертацији је цитирано и у литератури наведено 208 референци.

Дисертација се састоји из следећих поглавља: 1. УВОД (стр. 1), 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ (стр. 2-25), 3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА (стр. 26-27), 4. РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ (стр. 27), 5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА (стр. 28-50), 6. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА (стр. 51-156), 7. ДИСКУСИЈА (стр. 157-189), 8. ЗАКЉУЧАК (стр. 190-191), 9. ЛИТЕРАТУРА (стр. 192-209), 10. ПРИЛОЗИ (стр. 210-217) и 11. БИОГРАФИЈА АУТОРА (стр. 218).

2. Приказ и анализа докторске дисертације

2.1. У в о д

Кандидат у Уводу описује објекат истраживања - биљну врсту *Arnica montana*, њене најважније особине, као и проблем угрожености спонтаних популација на подручју Европе као последице прекомерног сакупљања. Такође је указано на потребу и значај култивације арнике, али и чињеницу да се, за сада, процес добијања сировине (*Arnicae flos*) показао комплекснијим и мање рентабилним у поређењу са сировином добијеном из природе.

2.2 П р е г л е д л и т е р а т у р е

Преглед литературе је конципиран кроз 7 потпоглавља која су даље рашчлањена на мање тематске целине. У оквиру описа **рода *Arnica*** докторант износи досадашња сазнања домаћих и страних истраживача, која се односе на етимологију назива рода *Arnica* и употребу ове биљке у традиционалној медицини. **Биологија врста рода *Arnica*** укључила је преглед таксономског положаја, опис ботаничких особина, као и преглед географске дистрибуције врста и основних карактеристика природних станишта. Напоменуто је да је врста нативна на Балканском полуострву (Michler, 2007, Assyov *et al.*, 2006), најчешће на планинским травњацима са *Nardus stricta*. **Официналност дрога врста рода *Arnica*** је представљена детаљним табеларним

приказом према различитим фармакопејама, а посебно је дат и преглед **народних назива и синонима**. У оквиру **ботаничких карактеристика арнике** истакнуте су главне морфолошке особине вегетативних и генеративних органа. Потпоглавље означено као **Дроге арнике**, веома детаљно приказује морфолошку идентификацију дроге, фалсификате и замене, хемијски састав, као и биолошке ефекте активних супстанци у цветним главицама и корену. Тако је наведено да су најважније активне материје у цветним главицама сесквитерпенски лактони (Merfort, 2003, Wagner *et al.*, 2004), као и флавоноиди у форми флавоонских гликозида и флавоноидних глукунорида (Merfort и Wendisch, 1988), док се за корен и ризом наводе етарска уља, са доминацијом деривата тимола (Rossetti *et al.*, 1984). Кандидат је посебно истакао снажно дејство сесквитерпенских лактона, посебно хеленалина, у антиинфламаторним процесима путем инхибиције транскрипционих фактора NF- κ B и NF-AT (Lyss *et al.*, 1999, Merfort, 2003). Уз то, кандидат је споменуо и новија истраживања антитуморских ефеката сесквитерпенских лактона арнике (Lopez-Anton *et al.*, 2007). Најзад, у потпоглављу **Култивација** докторант кроз посебне целине (Извори биљне сировине и оправданост гајења; Сортимент; Искуства у гајењу арнике) даје преглед технологије гајења и примене различитих агротехничких мера (размножавање – заснивање засада, ђубрење, сузбијање болести и штеточина, нега), начина жетве и примарне дораде (сушење) у циљу добијање квалитетне сировине. Кандидат је истакао потребу плантажног гајења арнике због повећања тражње сировине (Galambosi, 2004, Smallfield и Douglas, 2008), и представио кључне елементе у досадашњим искуствима на пољу domestikације и култивације арнике у свету (Vomme, 1991, 1999, Vomme *et al.*, 1995) и у нас (Степановић и сар., 2009).

2.3. Циљ истраживања

Циљ ове дисертације је био да се проучавањем морфолошких, производних и хемијских особина, под утицајем три индукована фактора (време садње, врста садница и врста ђубрења) изнађе оптималан модел гајења арнике у агроеколошким условима планинског региона Србије. Посебан акценат у току истраживања је стављен на проучавање односа између појединих посматраних особина и приноса цветних главица. Такође, један од циљева истраживања је био да се микроскопским техникама и танкослојном хроматографијом установи једноставна процедура идентификације цвета арнике у односу на претпостављене фалсификате. Важна група циљева у овом раду била је хемијска карактеризација дрога арнике (цветних главица, ризома и корена), добијених од биљака гајених у агроеколошким условима планинског региона западне Србије, где је поред квантификације најважнијих група секундарних метаболита, по први пут на сировини из овог региона извршена идентификација једињења сесквитерпенског комплекса и доминантних фенолних једињења, док је на подземним органима, по први пут у свету, извршена детаљна карактеризација састава етарског уља. Најзад, ради доприноса познавању већ познатих биолошких ефеката дрога арнике, извршено је упоредно тестирање антиоксидативне и антимицробне активности екстракта цветне главице и етарских уља корена и ризома добијених из огледа у овом раду.

2.4. Радне хипотезе докторант сумира у вези са следећим претпоставкама: а) да ће различити услови гајења арнике условити разлике у одговарајућим морфолошким параметрима и приносу сировина; б) да ће посматране особине арнике бити међусобно зависне; в) да ће различити услови гајења имати утицаја на појаву разлика у хемијском саставу сировине, односно хемијским профилима биљних дрога арнике (цветне главице, ризом, корен); г) да ће узорци из виших фаза прераде биљних сировина (екстракти цветних главица и етарско уље ризома и корена) различитог хемијског састава, испољити различите биолошке активности *in vitro*, тј. имати различиту антимицробну и/или антиоксидативну активност.

2.5. Материјал и методе истраживања обухвата опис коришћеног материјала у огледу (семенски материјал, производња садног материјала, ђубрива), као и информације о експерименталној локацији, поставци пољског огледа, морфолошким мерењима, примењеним микроскопским техникама, хемијској аналитици и статистичкој обради података.

2.5.1. Материјал. Испитивањем је обухваћена врста *Arnica montana*, сорте ‘ARBO’. Коришћена су следећа ђубрива: говеђи стајњак и NPK (формулације 15:15:15).

2.5.2. Методе. Пољски оглед је постављен у региону Западне Србије на планини Тара у оквиру расадника Националног парка „Тара“ на локалитету Калуђерске баре, на 1008 м.н.в. Земљиште на локалитету је дистрично-смеђе, благо киселе реакције, формирано на серпентину. Узимање узорака земљишта за анализу је вршено пре ђубрења, а за анализу земљишта коришћене су стандардне методе. Климатске карактеристике локалитета за период истраживања (2008-2010) детаљно су представљене.

Оглед гајења арнике је постављен у 2х3х2 Сплит-плот експерименталном дизајну. Испитиван је утицај три индукована фактора: *време садње* (пролећни и јесењи рок заснивања), *врста ђубрива* (стајско ђубриво, NPK и контрола), *врста садница* (саднице произведене из семена и произведене дељењем бокора).

Од *морфолошких параметара* праћени су: пречник розете, висина цветног изданка, број цветних изданка, број цветних главица, пречник цветне главице и број секундарних розета. Сва морфолошка мерења и посматрања вршена су у фази пуног цветања арнике.

Од *приноса биљних дрога* праћени су: принос цветне главице, принос ризома и принос корена, изражени у kg/ha. Принос етарског уља ризома и корена (%m/m) одређиван је у ваздушно осушеном биљном материјалу. Проценат приноса (%) етарског уља у узорку израчунат је на бази апсолутно сувог узорка.

Микроскопска анализа прашкова и пресека подземних органа рађена је на лупи LEICA XTL 3400D и микроскопу LEICA DCML опремљеним дигиталном камером и пратећим софтвером IM1000. Као реагенс за идентификацију цвета арнике употребљен је Општи реактив. Идентификација биљне дроге *Arnicae flos*, техником танкослојне хроматографије (TLC), урађена је на Camag HPTLC апарату по раније описаној методи (Wagner *et al.*, 1984). *Локализација етарског уља у ризому и корену* спроведена је микроскопском анализом, где су од техника примењене: светлосна микроскопија, хистохемијска анализа, флуоресцентна микроскопија и скенирајућа електронска микроскопија (SEM), док је техника трансмисионе електронске микроскопије (TEM) кошићена у циљу појашњења механизма екскреције уљаних капљица у интерцелуларе.

Аналитичка екстракција за одређивање садржаја укупних сесквитерпенских лактона је извршена по модификованој методи Douglas *et al.* (2004), а сама анализа је спроведена на течној хроматографију Hewlett-Packard HP 1090 по методи прописаној фармакопејом (Ph. Eur. 6.0). Течно масеном техником (LC-MS) извршена је анализа сесквитерпенских лактона на Agilent MSD TOF апарату.

Квантификација доминантних фенолних компоненти извршена је HPLC анализом по раније описаној методи (Spitaler *et al.*, 2006) употребом екстерних стандарда. Анализе су рађене на Agilent 1200 апарату са DAD детектором. Екстракција и изоловање доминантних фенолних компоненти извршена је пречишћавањем сировог екстракта хроматографијом на колони силика

гела. Сакупљено је 90 фракција које су спајане на основу TLC анализе. Спојене фракције су даље пречишћаване на семипрепаративном HPLC, одакле су издвојена два фенолна једињења, кверцетин-3-*O*- β -D-глюкозид и кемпферол-3-*O*- β -D-глюкозид, чија је идентификација потврђена NMR анализом. Добијена чиста једињења су коришћена као екстерни стандарди у квантификацији доминантних фенолних компоненти у цветној главици *A. montana*.

Квалитативна и квантитативна анализа етарских уља ризома и корена спроведена је помоћу гасне (GC-FID) и гасно-масене (GC-MS) хроматографије. Идентификација компоненти је извршена поређењем њихових масених спектра и ретенционих индекса са спектрима добијених из аутентичних узорака и/или NIST/Wiley библиотекама спектра, коришћењем различитих врста претраге (PBM/NIST/AMDIS) и доступним литературним подацима (Adams, 2007; Hochmuth, 2006).

За тестирање биолошких активности одабрани су екстракти цветних главица арнике и етарска уља ризома и корена код којих је садржај секундарних метаболита био највише различит (са минималним и максималним садржајем). Тако су за тестирање биолошких активности дроге цветне главице узети екстракти са максималним и минималним садржајем укупних сесквитерпенских лактона. На сличан начин одабрани су и екстракти за биолошке тестове из групе фенолних једињења, где су издвојени екстракти са максималном и минималном сумом садржаја три квантификована фенолна једињења (хлорогенска киселина, кверцетин-3-*O*- β -глюкозид, кемпферол-3-*O*- β -глюкозид). Одабир етарских уља ризома и корена за антимикробне тестове вршен је на основу процента ароматичних једињења у хемијском саставу.

Антиоксидативно дејство праћено је на бази испитивања способности неутрализације 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикала (Silve *et al.*, 2005).

Антимикробна активност је тестирана на Грам-негативним и Грам-позитивним бактеријама заједно са једним патогеним квасцем. У тесту су коришћене следеће бактерије: *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *S. enteritidis* (ATCC 13076), *Bacillus subtilis* (ATCC 10907), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Proteus mirabilis* (изолат), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13883), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *M. flavus* (ATCC 14452) и гљивични патоген *Candida albicans* (ATCC 10231). Минималне инхибиторне концентрације (MIC) одређене су микродилуционом методом према упутствима Националног одбора за клиничке лабораторијске стандарде (NCCLS, 1997).

Статистичка обрада резултата је укључила анализу утицаја појединачних фактора и њихових интеракција на посматране особине, тестирањем преко двофакторске и трофакторске анализе варијансе, чији су резултати представљени табеларно са вредностима вероватноће прихватања нулте хипотезе. Статистичка значајност разлика између аритметичких средина свих основних скупова посматраних комбинација фактора за одређено својство тестирана је анализом варијансе са пратећим *post-hoc* Данкановим тестом. Јачина веза између посматраних параметара приказивана је графички или табеларно и окарактерисана је Пирсоновим коефицијентима корелације (*r*), са пратећом статистичком значајношћу. Идентификација заједничких варијанси у скупу посматраних особина анализирана је факторском анализом (милтиваријациона статистичка техника), заснованој на корелационој матрици оригиналних података, а екстракција фактора је извршена методом главних компоненти (PCA). Као резултат факторске анализе табеларно су приказана факторска оптерећења, *eigenvalues* и проценти објашњене варијансе, док су графички представљени *scree-plot eigenvalues* и факторска оптерећења два фактора који носе највећу

информацију. За детерминацију секвенцијалне класификације варијанти заснивања плантаже према пожељним особинама коришћено је Ивановићево одстојање (I-одстојање) (Ivanović, 1977). Све статистичке анализе и тестови (изузев I-одстојања), као и излазни графици, урађени су у програмском пакету STATISTICA v.7.0.

2.6. Поглавље Резултати истраживања, подељено је на шест потпоглавља: *Морфолошки параметри*, *Приноси*, *Микроскопска и хроматографска карактеризација дрога*, *Хемијска анализа дрога*, *Међусобни односи тестираних карактеристика* и *Биолошки ефекти*.

2.6.1. Морфолошки параметри. Од свих варијанти фактора индукованих на огледу, варијанта пролећне садње садница из вегетативне пропагације се показала као најмање пожељна. Фактор времена садње је био статистички значајан за све мерене параметре. Варирање фактора „врсте садница“ имало је статистички значајан утицај на све мерене параметре, осим на пречник цветне главице у 2010. години. Фактор врсте ђубрења је имао статистички значајан утицај на варирање вредности готово свих морфолошких параметара. Вредности пречника розете су се кретале од 12,4 – 23,4 cm (14,5 – 28,2 cm) у другој (односно трећој) вегетацији. Висина цветних изданака се кретала од 20,5 – 34,1 cm (25,5 – 41,7 cm), док су се просечне вредности броја цветних изданака кретале од 1,5 – 5,0 (2,4 – 12,6). Број цветних главица по биљци је варирао од 7,2 – 16,3 (8,4 – 38,9), пречник цветних главица се кретао од 6,0 – 7,5 cm (6,4 – 9,1 cm), а број секундарних розета од 5,7 – 18,3 (25,3 – 35,4).

2.6.2. Приноси. Фактор времена садње је био статистички значајан код свих мерених приноса, осим код приноса корена у 2009. и приноса ризома у 2010. години. Такође је варирање фактора „врсте садница“ имало статистички значајан утицај на принос цветне главице у обе посматране године, док на принос ризома и корена у 2009. години и принос ризома у 2010. години, није имао статистички значајан утицај. Фактор врсте ђубрења је имао статистички значајан утицај на варирање вредности приноса. Принос цветних главица се кретао од 59,8 – 143,5 kg/ha (116,2 – 258,7 kg/ha), принос ризома од 106,3 – 373,7 kg/ha (475,9 – 897,5 kg/ha), а принос корена од 194,3 – 426,4 kg/ha (420,9 – 615,0 kg/ha). Садржај етарског уља се у ризому кретао од 4,0 – 4,8% (2,1 – 3,1%), док је у корену био од 1,1 – 3,2% (1,7 – 2,4%).

2.6.3. Микроскопска и хроматографска карактеризација дрога. У циљу идентификације дроге арнике у односу на могуће фалсификате, установљено је да цветне главице арнике и *Doronicum columnae* садрже видљиве и лако препознатљиве папусе, за разлику од *Calendula officinalis*, док се по дебљини папуси арнике могу разликовати од папуса *D. columnae*. Анализом хроматограма поуздано се може идентификовати цветна главица невена који се од остале две врсте разликује по присуству зоне изражене наранџасте флуоресценције у доњој половини хроматограма на $R_f \sim 0,4$.

У оквиру резултата ове дисертације је применом различитих микроскопских техника, установљена локализација и механизам синтезе и акумулације етарских уља у подземним органима арнике, и то на нивоу епителијалних ћелија паренхима кортекса распоређених око лизогених интерцелулара.

2.6.4. Хемијска анализа дрога. Сесквитерпенски лактони присутни у цветној главици арнике су идентификовани, а њихов укупни садржај, изражен као дихидрохеленалин тиглат (DHNT), се у 2009. години кретао од 7,9 – 13,2 mg/g, а у 2010. години од 4,6 – 13,9 mg/g. У обе посматране године садржај сесквитерпенских лактона у дроги *Arnicae flos* је био већи од минимума (4 mg/g) који прописује VI Европска фармакопеја. У узорцима цветне главице арнике идентификовано је пет фенолних једињења и одређен је садржај једне фенолне киселине

(хлорогенска киселина) и два доминантна флавоноида (кверцетин-3-*O*-глукозид и кемпферол-3-*O*-глукозид). Садржај хлорогенске киселине се кретао од 3,1 – 6,0 mg/g (1,9 – 6,57 mg/g) у другој (односно трећој) вегетацији, кверцетин-3-*O*-глукозид од 8,4 – 13,9 mg/g (7,8 – 12,5 mg/g), а кемпферол-3-*O*-глукозид од 2,1 – 4,7 mg/g (2,1 – 4,5 mg/g). У хемијском профилу етарског уља ризома и корена доминантно (са око 80%) су били заступљени деривати тимола и то првенствено 2,5-диметокси-*p*-цимен (28,9 – 40,7%) и тимол метил етар (9,6 – 27,2%).

2.6.5. Међусобни односи тестираних карактеристика. У оквиру овог потпоглавља праћене су јачине односа између посматраних параметара у истраживању. Факторском анализом приноса, морфолошких и хемијских параметара, утврђено је да поједине особине деле заједничку варијансу. Од највећег значаја у овом истраживању је свакако параметар приноса цветне главице, уз који се груписао одређени број мерених морфолошких својстава. Обзиром да је полазна матрица за израду факторске анализе била корелациона, за очекивати је било да су параметри са високим вредностима корелационих коефицијената у вези са приносом цветне главице, одговорни за варирање овог својства. Секвенционално раздвајање свих варијанти заснивања по пожељним особинама приноса и хемијског састава цветне главице, резултирало је рангирањем у којем прва три места заузимају ђубрене варијанте из јесењег заснивања.

2.6.6. Биолошки ефекти. У испитивању антиоксидативне активности екстракта цветних главица арнике већу способност неутрализације DPPH радикала имао је екстракт са максималном вредношћу садржаја укупних сесквитерпенских лактона у односу на екстракт са минималном вредношћу, док су разлике у антиоксидативној активности екстракта са максималном и минималном вредношћу суме садржаја три квантификована фенолна једињења биле незнатне. Тестирани екстракти испољили су и антимикуробну активност, где су се минималне вредности за инхибицију раста девет сојева бактерија и једног квасца кретале од 2 – 15 µl/ml. Антимикуробна активност етарских уља је била селективна, где су MIC вредности за већи број патогених бактерија биле изузетно мале (5 µl/ml), док је квасац *Candida albicans* био високо резистентан на сва тестирана етарска уља.

2.7. Дискусија

У оквиру овог поглавља кандидат је своје резултате поредио и дискутовао са резултатима других аутора, при чему је цитирано укупно 138 референци. Резултати из дисертације су у већем делу били сагласни са наводима других аутора, док су уочене разлике и другачији трендови, правилно образлагани. Посебно су дискутовани *морфолошки параметри и приноси*, при чему је у виду табелорног приказа представљен распон приноса цветних главица у огледима извођеним у више земаља Европе. Констатовано је да се велике разлике у приносима могу објаснити различитим агроеколошким условима. *Микроскопски и хистохемијски тестови* су у складу са наводима за сродне врсте из фамилије Asteraceae. *Хемијска карактеризација и квантификација доминантних једињења* је упоређивана, пре свега са подацима других аутора на овој, али и на њој сродним врстама. Посебно је исканут значај обрнутог односа између приноса дроге и садржаја секундарних метаболита, што је више пута показано на примеру различитих гајених лековитих врста (Yang *et al.*, 2005, Sulpice *et al.*, 2009, Ibrahim *et al.*, 2011, итд.). Биолошки ефекти су дискутовани у вези са наводима других аутора о антиоксидативној активности фенолних једињења (Zheng и Wang, 2001, Saravanakumar *et al.*, 2011), а посебно флавоноида, у смислу способности редукције слободних радикала, као што су супероксид, пероксид, алкосил и

хидроксил радикали (Pietta, 2000). Кандидат је навео да су испољени антимикуробни ефекти били очекивани, када се упореде са резултатима других аутора (Neerman, 2003, Chaturvedi, 2011).

2.8. У Закључку кандидат констатује да је култивација алохтоне врсте *Arnica montana* у циљу добијања квалитетне сировине *Arnicae flos* за фармацеутску индустрију, у агроеколошким условима Србије могућа. Тестирајући различите моделе заснивања плантаже након трогодишњег посматрања и анализе добијених сировина, донето је више важнијих закључака, од чега треба посебно истаћи следеће: а) плантажним гајењем арнике у агроеколошким условима Србије може се добити до 300 kg/ha квалитетне сировине *Arnicae flos* и око 1000 kg/ha подземних органа из којих се може дестилацијом добити око 30 l етарског уља богатог ароматичним једињењима, б) хемијском анализом екстракта цветне главице утврђено је да укупни садржај сесквитерпенских лактона код свих тестираних варијанти задовољава критеријум квалитета прописан Европском фармакопејом, в) препозната је група особина чије варирање у великој мери утиче на варирање приноса цветне главице (пречник розете, висина цветне стабилке, број цветних стабљика и број цветних главица по биљци), г) микроскопском анализом спрашене дроге и техником танкослојне хроматографије установљена је брза и једноставна метода за идентификацију цветне главице арнике у односу на два претпостављена фалсификата, д) у испитивању антиоксидативне и антимикуробне активности цветних главица арнике веће ефекте испољили су екстракти са максималном вредношћу садржаја активне материје у односу на екстракте са минималним садржајем, ђ) на бази висине приноса и квалитета дроге, као најповољнији модел заснивања арнике издвојила се варијанта генеративног размножавања у блоку ђубрења стајским ђубривом, посађена на јесен. Обзиром да је ниво постигнутог приноса цветне главице испод светског просека, а да се у овом истраживању покушало одговорити само на нека од агротехничких питања, даља истраживања би требало да обухвате тестове гајења на различитим надморским висинама и различитим типовима земљишта.

2.6 Литература. У дисертацији је цитирано 208 референци (12 домаћих и 196 страних). Цитирани литературни извори су савремени (углавном објављени између 1995. и 2012. године) и одговарају теми и проучаваној проблематици дисертације.

3. Закључак и предлог

Кандидат Дејан Пљевљакушић је по мишљењу чланова Комисије остварио све циљеве докторске дисертације у складу са одобреном пријавом.

Ова дисертација је резултат оригиналног и самосталног научног рада који је дао значајан допринос разумевању утицаја услова гајења на морфолошке и фитохемијске карактеристике, као и принос дроге арнике у агроеколошким условима који одговарају природном поднебљу на коме се развијају спонтане популације *Arnica montana*.

Тема и садржај ове дисертације су актуелни и значајни, како са научног, тако и са практичног становишта, имајући у виду потребу доместикације и култивације угрожених лековитих биљака, као и раст тражње комерцијално вредних биљних дрога на европском и светском тржишту. Посебну вредност ова докторска дисертација има са аспекта постављања модела и технологије гајења интродуковане и на подручју Балкана ретке и угрожене врсте.

У раду су коришћене најсавременије технике и поступци, посебно у делу хемијске аналитике и карактеризације биљних дрога арнике, као и примене различитих микроскопских техника у локализацији активних материја на хистолошком, целуларном и интрацелуларном нивоу, укључујући скенирајућу и трансмисиону електронску микроскопију.

Кандидат је успео да развије и предложи једноставан поступак идентификације биљне дроге у циљу препознавања њених фалсификата на тржишту. Уз то, по први пут у свету, у овој докторској дисертацији је извршена детаљна хемијска и хистохемијска анализа састава етарског уља корена и ризома арнике, а резултати ових истраживања су валоризовани публиковањем у водећем међународном часопису (Industrial Crops and Products).

Кандидат Дејан Пљевљакушић је систематски проучио обимну литературу, правилно је упоређивао резултате својих истраживања са истраживањима других аутора и адекватно је применио сложене статистичке моделе ради повезивања различитих група података и изналажења односа и веза између бројних тестираних особина. Закључци су правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата.

На основу свега изнетог, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију дипл. инж. Дејана Пљевљакушића под насловом: **„Утицај услова гајења на морфолошке и хемијске особине и биолошке ефекте екстракта *Arnica montana* L.“** и са посебним задовољством предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати ову позитивну оцену и омогући кандидату јавну одбрану.

У Београду
07.12.2012.

Чланови Комисије:

Др Зора Дајић Стевановић, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
(Пољопривредна ботаника)

Др Славица Јелачић, ванредни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
(Лековито, ароматично и зачинско биље)

Др Небојша Менковић, научни саветник
Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, Београд
(Фармакогнозија)

Др Слободан Милосављевић, професор емеритус
Хемијски факултет Универзитета у Београду
(Органска хемија – хемија природних производа)

Др Теодора Јанковић, виши научни сарадник
Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, Београд
(Физиологија биљака)

Прилог:

Pljevljakušić, D., Rančić, D., Ristić, M., Vujisić, L., Radanović, D., Dajić-Stevanović, Z. (2012). Rhizome and root yield of the cultivated *Arnica montana* L., chemical composition and histochemical localization of essential oil. **Industrial Crops and Products**, 39 (1), pp. 177-189.