

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Dejan S. Pljevljakušić

**UTICAJ USLOVA GAJENJA NA
MORFOLOŠKE I HEMIJSKE OSOBINE I
BIOLOŠKE EFEKTE EKSTRAKATA
Arnica montana L.**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Dejan S. Pljevljakušić

**UTICAJ USLOVA GAJENJA NA
MORFOLOŠKE I HEMIJSKE OSOBINE I
BIOLOŠKE EFEKTE EKSTRAKATA
Arnica montana L.**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Dejan S. Pljevljakušić

**INFLUENCE OF GROWING CONDITIONS
ON MORPHOLOGICAL AND CHEMICAL
PROPERTIES AND BIOLOGICAL
EFFECTS OF EXTRACTS OF
Arnica montana L.**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Svom mentoru, redovnom profesoru dr Zori Dajić-Stevanović, izražavam veliku zahvalnost na sveobuhvatnom angažovanju i podršci, vrednim savetima i stručnoj pomoći tokom izrade ove disertacije.

Profesoru emeritusu dr Slobodanu Milosavljeviću, naučnom savetniku dr Dragoju Radanoviću, naučnom savetniku dr Nebojši Menkoviću, vanrednom profesoru dr Slavici Jelačić, kao i višem naučnom saradniku dr Teodori Janković najiskrenije se zahvaljujem na svestranoj stručnoj pomoći, korisnim sugestijama i podršci u toku izrade ovog rada.

Najtoplije se zahvaljujem mr Bertalanu Galabošiju na poslatom semenskom materijalu, dipl. inž. Sreti Brkiću na pomoći u proizvodnji rasada, šum. teh. Branki Spasojević i celoj radnoj ekipi rasadnika NP „Tara“ na vremenu i energiji uloženoj u realizaciju poljskog oglada, vanrednom profesoru dr Svetlani Antić-Mladenović na hemijskim analizama zemljišta i stajskog đubriva, stručnom saradniku dipl. biol. Radenku Radoševiću, dipl. biol. Milošu Bokorovu i dr Dragani Rančić na mikrografijama, mr Miroslavu Novakoviću, mr Aleksandru Nešiću i dr Dejanu Gođevcu na izolovanju i identifikaciji flavonoidnih jedinjenja, mr Ljubodragu Vujisiću i mr Mihailu Ristiću na pomoći u identifikaciji hemijskih profila etarskih ulja, mr Milki Jadranin na pomoći u tečno-masenoj hromatografiji, dipl. farm. Gordani Zdunić i mr Tatjani Stević na pomoći oko određivanja bioloških efekata, naučnom savetniku dr Katarini Šavikin na korisnim savetima u vezi izrade teze, dipl. inž. Milovanu Jezdiću i dipl. inž. Damiru Beatoviću na pomoći u merenjima na ogledu, farm. teh. Snežani Vild na tehničkoj pomoći u laboratoriji.

Svim kolegama iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", koji su mi svako na sebi svojstven način pomogli u izradi ovog rada, dugujem veliku zahvalnost.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj supruzi na strpljenju, roditeljima na omogućenom školovanju, mom bratu i prijateljima koji su mi se našli kada mi je bilo najpotrebnije tokom izrade ove disertacije.

Poljoprivredni fakultet-Beograd

Mentor:

Redovni profesor, dr Zora Dajić-Stevanović, Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

Profesor emeritus, dr Slobodan Milosavljević, Univerzitet u Beogradu,
Hemijski fakultet

Naučni savetnik, dr Nebojša Menković, Institut za proučavanje lekovitog bilja
„Dr Josif Pančić“ Beograd

Vanredni profesor, dr Slavica Jelačić, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni
fakultet

Viši naučni saradnik, dr Teodora Janković, Institut za proučavanje lekovitog
bilja „Dr Josif Pančić“ Beograd

Datum odbrane: _____

Uticaj uslova gajenja na morfološke i hemijske osobine i biološke efekte ekstrakata *Arnica montana* L.

- Rezime -

Arnica montana L. (Asteraceae) je višegodišnja planinska biljka čije se cvetne glavice (*Arnicae flos*) uglavnom koriste za spoljašnju upotrebu kod modrica i uganuća u fitofarmaceutskim preparatima kao što su masti, kreme i gelovi. Do pre par godina svetsko tržište pomenute sirovine je zadovoljavano isključivo iz spontanog resursa, ali su biljne populacije, zbog prekomernog sakupljanja, znatno degradirane, zbog čega je u većini evropskih zemalja stavljena zabrana za njeno dalje sakupljanje iz prirode. Obzirom da tražnja za ovom sirovinom na tržištu ne opada, kultivacija arnike se nameće kao jedino održivo rešenje zadovoljenja potreba farmaceutske industrije.

Budući da *A. montana* (narodni naziv – arnika) nije autohtona biljna vrsta za područje Srbije, iako se spontano javlja u planinskim oblastima nekih susednih zemalja i Balkanskog poluostrva uopšte, cilj ovih istraživanja je bio da se iznađe tehnološko rešenje njivske proizvodnje na osnovu ispitivanja uticaja vremena zasnivanja, primene đubrenja i tipa sadnica. U istraživanju su pored cvetne glavice, kao glavne droge, posmatrani i podzemni organi arnike: rizom i koren, kao sporedne sirovine. Prva faza eksperimentalnog rada obuhvatila je trogodišnji tro-faktorijalni poljski ogled načina proizvodnje arnike, pri čemu su se kao faktori ispitivali: vreme zasnivanja useva (prolećna i jesenja sadnja), đubrenje (stajnjak i NPK) i način zasnivanja useva (iz semena i klonskom propagacijom – deobom bokora). U drugoj fazi eksperimenta, izvršena je karakterizacija sirovine u smislu njene brze identifikacije, hromatografskim tehnikama identifikovani su prisutni sekundarni metaboliti i određen njihov sadržaj u ispitivanim uzorcima i testirani su biološki efekti odabranih ekstrakata.

Ispitivanja su vršena na ogledu postavljenom 2008. godine na lokalitetu Kaluđerskih bara (1008 m n.v.), na planini Tara, u krugu rasadnika Nacionalnog Parka „Tara“. Obzirom na to da arnika prvu vegetaciju provodi u fazi rozete sva merenja morfoloških parametara, prinosa i hemijskih karakterizacija sirovina vršena su tokom 2009. i 2010. godine. Na ogledu su praćeni sledeći parametri: prečnik rozete, visina cvetnog izdanka, broj cvetnih izdanaka, broj cvetnih glavica, prečnik cvetne glavice, broj sekundarnih rozeta. Određeni su sledeći prinosi: prinos cvetne glavice, prinos

rizoma, prinos korena i prinos etarskog ulja (rizoma i korena). U okviru identifikacije biljne sirovine izvršena je poredbena mikroskopska analiza i određen hemijski profil tankoslojnom hromatografijom droge *Arnicae flos* u odnosu na moguće falsifikate: cvetne glavice biljaka *Calendula officinalis* i *Doronicum columnae*. U cilju lokalizacije i određivanja mehanizama ekskrecije etarskog ulja u rizomu i korenu arnike, izvršena je: mikroskopska analiza ultra-tankih preseka pod svetlosnim mikroskopom, ispitivana je fluorescencija i urađeno više različitih histochemijskih bojenih testova, pripremljeni su i analizirani preseki skenirajućom i transmissionom elektronskom mikroskopijom. Hemijska karakterizacija cvetnih glavica arnike obuhvatila je kvalitativnu i kvantitativnu analizu sekundarnih metabolita iz grupe seskviteprenske laktone i fenolnih jedinjenja (fenolne kiseline i flavonoidi). U okviru hemijske karakterizacije etarskog ulja rizoma i korena izvršena je identifikacija i kvantifikacija glavnih komponenti.

Od svih varijanti faktora indukovanih na ogledu, varijanta prolećne sadnje sadnica iz vegetativne propagacije se pokazala kao nepoželjna. Kod ove varijante došlo je do cvetanja velikog broja biljaka odmah nakon sadnje, što je uslovalo iscrpljivanje potencijala biljke na formiranje cvetonosne stabljike, cveta i ploda. Ova pojava je, kako je pokazano u narednoj godini, bila posledica uznapredovale generativne faze razvića biljaka u trenutku rasađivanja. Kao posledica slabog ukorenjavanja biljke ove varijante su u velikoj meri uginule, a preživle biljke su se slabije razvile. Vrednosti dobijene sa ove varijante zastupljene su u statističkim analizama, ali nisu uzimane u obzir za poređenje sa literaturnim podacima. Faktor vremena sadnje je bio statistički značajan za sve merene parametre osim za prinos korena u 2009. i prinos rizoma u 2010. godini. Takođe je variranje faktora vrste sadnica imalo statistički značajan uticaj na sve merene parametre, osim na prinos rizoma i korena u 2009. godini i prinos rizoma i prečnik cvetne glavice u 2010. godini. Faktor vrste đubrenja je imao statistički značajan uticaj na variranje vrednosti gotovo svih morfoloških parametara, ali su statistički značajne faktorske interakcije u većini slučajeva prikrivale doprinos unetih hraniva, tako da se diskusija o značajnosti tretmana đubrenja u gajenju arnike morala rasčlaniti na pojedinačne varijante vrste sadnica i vremena sadnje.

Vrednosti prečnika rozete su se kretale od 12,4 – 23,4 cm (14,5 – 28,2 cm) u drugoj (odnosno trećoj) vegetaciji. Visina cvetnih izdanaka se kretala od 20,5 – 34,1 cm

(25,5 – 41,7 cm), dok su se prosečne vrednosti broja cvetnih izdanaka kretale od 1,5 – 5,0 (2,4 – 12,6). Broj cvetnih glavica po biljci je varirao od 7,2 – 16,3 (8,4 – 38,9), prečnik cvetnih glavica se kretao od 6,0 – 7,5 cm (6,4 – 9,1 cm), a broj sekundarnih rozeta od 5,7 – 18,3 (25,3 – 35,4). Prinos cvetnih glavica se kretao od 59,8 – 143,5 kg/ha (116,2 – 258,7 kg/ha), prinos rizoma od 106,3 – 373,7 kg/ha (475,9 – 897,5 kg/ha), a prinos korena od 194,3 – 426,4 kg/ha (420,9 – 615,0 kg/ha). Sadržaj etarskog ulja se u rizomu kretao od 4,0 – 4,8% (2,1 – 3,1%), dok je u korenu bio od 1,1 – 3,2% (1,7 – 2,4%).

Mikroskopskim snimanjem samlevenog biljnog materijala pod različitim uveličanjima ustanovljena je jednostavna procedura identifikacije cveta arnike u odnosu na dva pretpostavljena falsifikata. Tako, pored ostalih karakterističnih detalja, cvetne glavice arnike i *D. columnae* sadrže vidljive i lako prepoznatljive papuse, za razliku od *C. officinalis*, dok se po debljini papusi arnike ($69 \pm 16 \mu\text{m}$) mogu razlikovati od papusa *D. columnae* ($30 \pm 7 \mu\text{m}$). Analizom hromatograma dobijenih tankoslojnom hromatografijom pouzdano se može identifikovati cvetna glavica nevena koji se od ostale dve vrste razlikuje po prisustvu zone izražene narandžaste fluorescencije u donjoj polovini hromatograma na $R_f \sim 0,4$. Ova zona po položaju odgovara rutinu u smeši standarda, a odsutna je u uzorcima cvetnih glavica *A. montana* i *D. columnae*. U uzorku *A. montana* jasno se uočava još jedna zona narandžaste fluorescencije na $R_f \sim 0,65$ koja je potpuno odsutna u uzorku *C. officinalis* i jedva primetna u uzorku *D. columnae*. Ova zona po položaju i fluorescenciji odgovara standardu izokvercitrina.

Seskviterpenski laktone prisutni u cvetnoj glavici arnike su identifikovani i određen je njihov ukupni sadržaj izražen kao dihidrohelenalin tiglat (DHHT), koji se u 2009. godini kretao od 7,9 – 13,2 mg/g, a u 2010. godini od 4,6 – 13,9 mg/g. U obe posmatrane godine biljna sadržaj seskviterpenskih laktone u drogi *Arnicae flos* je bio veći od minimuma (4 mg/g) koji propisuje Evropska farmakopeja 6.0. U uzorcima cvetne glavice arnike identifikovano je pet fenolnih jedinjenja i određen sadržaj jedne fenolne kiseline (hlorogenska kiselina) i dva dominantna flavonoida (kvercetin-3-*O*-glukozida i kemferol-3-*O*-glukozida). Sadržaj hlorogenske kiseline se kretao od 3,1 – 6,0 mg/g (1,9 – 6,57 mg/g) u drugoj (odnosno trećoj) vegetaciji, kvercetin-3-*O*-glukozida od 8,4 – 13,9 mg/g (7,8 – 12,5 mg/g), a kemferol-3-*O*-glukozida od 2,1 – 4,7 mg/g (2,1 – 4,5 mg/g). U hemijskom profilu etarskog ulja rizoma i korena dominantno

(ca. 80%) su bili zastupljeni derivati timola i to prvenstveno 2,5-dimetoksi-*p*-cimen (28,9 – 40,7%) i timol metil etar (9,6 – 27,2%).

U ispitivanju antioksidativne aktivnosti ekstrakata cvetnih glavica arnike veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala imao je ekstrakt sa maksimalnom vrednošću sadržaja ukupnih seskviterpenskih laktona u odnosu na ekstrakt sa minimalnom vrednošću, dok su razlike u antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata sa maksimalnom i minimalnom vrednošću sume sadržaja tri kvantifikovana fenolna jedinjenja bile neznatne. Testirani ekstrakti ispoljili su i antimikrobnu aktivnost, gde su se minimalne vrednosti za inhibiciju rasta devet sojeva bakterija i jednog kvasca kretale od 2 – 15 µl/ml. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja je bila selektivna, gde su MIC vrednosti za određene mikroorganizme (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus flavus*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella enteritidis*) bile izuzetno male (5 µl/ml), dok je kvasac *Candida albicans* bio visoko rezistentan na sva testirana etarska ulja (MIC koncentracija kretala se i do 83 µl/ml).

Plantažnim gajenjem arnike u agroekološkim uslovima Srbije može se dobiti do 300 kg/ha kvalitetne sirovine *Arnicae flos* i oko 1000 kg/ha podzemnih organa iz kojih se može destilacijom dobiti oko 30 l etarskog ulja bogatog aromatičnim jedinjenjima. Kao najbolja varijanta gajenja izdvojila se kombinacija jesenje sadnje sadnicama proizvedenim iz semena u bloku mineralnog đubrenja, dok se kao najnepovoljnija varijanta pokazala kombinacija zasnivanja plantaže na proleće sadnicama dobijenim vegetativnom propagacijom.

Ključne reči: arnika, lekovito bilje, seskviterpenski laktoni, fenolna jedinjenja, etarsko ulje, mikroskopska analiza, histohemija, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost

Naučna oblast: Biotehnologija

Uža naučna oblast: Ratarstvo i povrtarstvo

UDK:582.998.16:631.575:615.451.1

**Influence of growing conditions on morphological and
chemical properties and biological effects of extracts of
Arnica montana L.**

- Summary -

Arnica (*Arnica montana* L., Asteraceae) is a perennial mountain plant whose flower heads (*Arnicae flos*) are mainly used for topical treatment of bruises and sprains in phytopharmaceutical preparations such as ointments, creams and gels. Until few years ago, the world market demand for this raw material was almost exclusively covered from the spontaneous resources, but plant populations are, due to over-collecting, significantly degraded, what caused prohibition of its collection from the wild in most of European countries. Since the demand for this raw material on the market is constant rise, cultivation arnica is imposed as the only sustainable solution to meet the needs of the pharmaceutical industry.

Since the *A. montana* plant specie is not native to the region of Serbia, although it occurs spontaneously in some mountain areas of neighboring countries and the Balkans in general, the aim of this study was to find a suitable technology solution of field cultivation based on the examination of induced various ecological factor effects. In this research, beside observations connected with flower heads, as the main drug, underground parts of arnica: rhizome and roots, were also studied as side products. The first phase of the experimental work included a three-year three-factorial field experiment in different modes of production, where as the factors examined: time of plantation establishment (spring and autumn planting), fertilization (manure and NPK) and methods of propagation (from seed and clonal propagation - division of the tuft). In the second phase of the experiment, characterization of the raw material was carried out in the terms of its rapid identification, qualitative evaluations based on the content of secondary metabolites and testing of biological effects of extracts obtained.

Tests were performed on the field experiment conducted in 2008 at locality of Kaludjerske Bare (1008 m) on mountain Tara, in area of Nursery production department of the National Park "Tara". Since arnica its first vegetation remains in the rosette phenophase, all measurements of morphological parameters, yields and chemical

characterizations of raw materials was carried out in 2009 and 2010 year. Following parameters were examined at the trial: rosette diameter, height of flower shoots, number of flower shoots, number of flower heads per plant, flower head diameter and number of secondary rosettes. Yields were observed for the flower heads, rhizomes, roots and essential oils (in rhizomes and roots). Identification of the raw material *Arnicae flos* against possible forgeries, *Calendulae flos* and flower heads of *Doronicum columnae*, was performed by comparative microscopic imaging and thin layer chromatography. We examined the localization and mechanisms of excretion of essential oil in rhizome and roots by recording of ultra-thin sections under the light microscope, by examining the fluorescence after histochemical staining, and by recording with scanning and transmission electron microscopy. Chemical characterization of flower heads included quantification and qualification of secondary metabolites from the group of sesquiterpene lactones and phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids). In the frame chemical characterization of essential oils of the rhizomes and roots, quantification and identification of key components were done.

From all factor combinations induced in an experiment, variant of spring planting of seedlings from vegetative propagation is shown to be highly undesirable. In this variant large number plants flowered immediately after planting, causing depletion of plant potential on forming flower shoots, flower heads and seeds. This phenomenon, as shown in the following year, was the consequence of an advanced generative development stage of plants at the time of planting. As a result of poor rooting, plants these variants were withered in a large scale, while survived plants were small and weak. The values obtained from these variants are represented in statistical analysis, but were not considered for comparison with literature data. Factor of planting time was statistically significant for all measured parameters except for root, in 2009, and rhizome yield in 2010 year. Similarly, the variation of type of propagation factor had a statistically significant effect on all the measured parameters, except for the root and rhizome yield in 2009, and rhizome yield and the diameter of the flower head in 2010. Type of fertilizer factor had a significant influence on variations of almost all morphological parameters, but it also had statistically significant interactions with other two factors in most cases, which dissembled nutrient contribution in plant development,

therefore the discussion on the significance of fertilization treatments in growing arnica had to be divided on individual observations within other two factor combinations.

Rosette diameter values ranged from 12.4 - 23.4 cm (14.5 - 28.2 cm) in the second (third) vegetation. Height of flower shoots ranged from 20.5 - 34.1 cm (25.5 - 41.7 cm), while the average value of the number of flowering shoots ranged from 1.5 - 5.0 (2.4 - 12.6). Number of flower heads per plant ranged from 7.2 - 16.3 (8.4 - 38.9), diameter of flower heads ranged from 6.0 - 7.5 cm (6.4 - 9.1 cm), and the number of secondary rosette of 5.7 - 18.3 (25.3 - 35.4). Flower heads yield ranged from 59.8 - 143.5 kg/ha (116.2 - 258.7 kg/ha), rhizome yield from 106.3 - 373.7 kg/ha (475.9 - 897.5 kg/ha), and root yield from 194.3 - 426.4 kg/ha (420.9 - 615.0 kg/ha). The content of essential oil in the rhizome ranged from 4.0 - 4.8% (2.1 - 3.1%), while in the roots ranged from 1.1 to 3.2% (1.7 - 2.4%).

Through microscopic imaging of grounded plant material a simple identification procedure of arnica flower heads against two presumed forgeries has been established. Among to other typical details, arnica flower heads and *D. columnae* contain visible and easily recognizable pappi, unlike *C. officinalis*. Also pappi of arnica are much thicker ($69 \pm 16 \mu\text{m}$) than pappi of *D. columnae* ($30 \pm 7 \mu\text{m}$). Furthermore, thin-layer chromatography can reliably distinguish *C. officinalis* from the other two species, since the extract of this plant in the lower half of the chromatogram ($R_f \sim 0.4$) has zone with strong orange fluorescence, which corresponds to location of rutin in the standard mixture, while is absent in *A. montana* and *D. columnae*. In the sample of *A. montana* another zone with orange fluorescence was clearly visible at $R_f \sim 0.65$, which was absent in sample of *C. officinalis* and barely visible in *D. columnae*. This zone by its position and fluorescence responds to isoquercitrin standard.

Sesquiterpene lactones present in arnica flower were identified and quantified in its overall content, expressed as dihydrohelenalin tiglate (DHHT), which ranged, in 2009, from 7.9 - 13.2 mg/g and, in 2010, from 4.6 - 13.9 mg/g. Considering both years, the herbal drug *Arnicae flos* meet the quality criteria of minimum total sesquiterpene lactones content (4 mg/g) prescribed by the European Pharmacopoeia 6.0. In the flower head samples five phenolic compounds has been identified, out of which content of one phenolic acid (chlorogenic acid) and two dominant flavonoids (quercetin-3-*O*-glucoside and kaempferol-3-*O*-glucoside) has been estimated. Chlorogenic acid content ranged

from 3.1 - 6.0 mg/g (1.9 - 6.6 mg/g) in the second (third) vegetation, quercetin-3-*O*-glucoside from 8.4 - 13.9 mg/g (7.8 - 12.5 mg/g) and kaempferol-3-*O*-glucoside from 2.1 - 4.7 mg / g (2.1 - 4.5 mg/g). In chemical profiles of the essential oils of rhizomes and roots dominant components were thymol derivates (ca. 80%), mainly 2,5-dimethoxy-*p*-cymene (28.9 - 40.7%) and thymol methyl ether (9.6 - 27.2%).

In examined antioxidant activity of extracts of arnica flower heads greater ability to neutralize DPPH radicals had extract with maximum content of total sesquiterpene lactones compared with extract with minimum content, while differences in the antioxidant activities of extracts with maximum and minimum value of the sum of the three quantified phenolic compounds were negligible. Tested extracts exhibited also antimicrobial activity, where minimum inhibitory concentrations (MICs) of nine strains of bacteria and one yeast ranged from 2-15 µl/ml. The antimicrobial activity of the essential oil was selective, where the MIC values for certain microorganisms (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus flavus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*) were very small (5 µl/ml), but the yeast *Candida albicans* was highly resistant to all tested essential oils (MIC concentrations ranged up to 83 µl/ml).

From cultivation of arnica in agro-ecological conditions of Serbia can be obtained up to 300 kg/ha of quality raw material *Arnicae flos* and up to 1000 kg/ha of underground organs, from which can be extracted, by distillation, about 30 l of essential oils rich in aromatic compounds. As the best variant proved to be combination of autumn planting of seedlings produced from seeds in a block of mineral fertilizer, while the least favorable option has been shown combination of spring established variants where seedlings are obtained from vegetative propagation.

Keywords: arnica, herbs, medicinal plants, yield, sesquiterpene lactones, DHHT, flavonoids, essential oils, antioxidant activity, antimicrobial activity

Scientific field: Biotechnology

Scientific discipline: Field and Vegetable Crops

UDC: 582.998.16:631.575:615.451.1

Spisak skraćenica

\bar{x}	aritmetička sredina
ca.	otprilike, oko (lat. <i>circa</i>)
UZ	ultrazvučno
UV	ultraljubičasti spektar
Rt	retenciono vreme
DHHT	11 α , 13-dihidrohelenalin tiglata
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
MeOH	metanol
HPLC	visokokvalitetna tečna hromatografija
TLC	tankoslojna hromatografija
HPTLC	visokokvalitetna tankoslojna hromatografija
GC	gasna hromatografija
GC/MS	gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
LC	tečna hromatografija
ESI	elektrosprej jonizacija
TOF	vreme letenja (Time Of Flight)
MS	masena spektrometrija
DAD	diodni detektor
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija
P	biljke sa prolećnog plota sadnje
J	biljke sa jesenjeg plota sadnje
O	biljke sa bloka đubrenog stajskim đubrivom
M	biljke sa bloka đubrenog mineralnim đubrivom (NPK)
K	biljke sa bloka bez primene đubriva (kontrola)
G	biljke razmnožene iz semena (generativnim putem)
V	biljke razmnožene deljenjem bokora (vegetativnim putem)
JESEN	biljke sa jesenjeg plota sadnje
PROLEĆE	biljke sa prolećnog plota sadnje
Generativno	biljke razmnožene iz semena (generativnim putem)
Vegetativno	biljke razmnožene deljenjem bokora (vegetativnim putem)
NPK	biljke sa bloka đubrenog mineralnim đubrivom
Stajnjak	biljke sa bloka đubrenog stajskim đubrivom
Kontrola	biljke sa bloka bez primene đubriva
MIC	minimalne inhibitorne koncentracije
SL	seskviterpenski laktoni

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Rod <i>Arnica</i>	2
2.1.1. Etimologija naziva roda <i>Arnica</i>	2
2.1.2. Upotreba arnike u tradicionalnoj medicini	4
2.2. Biologija vrsta roda <i>Arnica</i>	6
2.2.1. Taksonomija	6
2.2.3. Botaničke osobine roda	7
2.2.2. Rasprostranjenje i prirodna staništa	8
2.3. Oficinalnost droga vrsta roda <i>Arnica</i>	9
2.4. <i>Arnica montana</i> – narodni nazivi i sinonimi	9
2.5. <i>Arnica montana</i> – botaničke karakteristike	10
2.6. Droge arnike	10
2.6.1. Cvetna glavica arnike - <i>Arnicae flos</i>	10
2.6.1.1. Sinonimi	10
2.6.1.2. Oficinalnost	11
2.6.1.3. Opis droge	11
2.6.1.4. Identifikacija droge	12
2.6.1.5. Hemijski sastav	14
2.6.1.6. Biološki efekti	16
2.6.2. Koren arnike - <i>Arnicae radix</i>	18
2.6.2.1. Sinonimi	18
2.6.2.2. Oficinalnost	18
2.6.2.3. Opis droge	18
2.6.2.4. Identifikacija droge	18
2.6.2.5. Hemijski sastav	19
2.6.2.6. Biološki efekti	19
2.5. Kultivacija	20
2.5.1. Izvori biljne sirovine <i>Arnicae flos</i> i opravdanost gajenja	20
2.5.2. Sortiment	21
2.5.3. Iskustva u gajenju arnike	21
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	26
4. RADNE HIPOTEZE	26
5. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	28
5.1. Materijal	28
5.1.1. Biljni materijal	28
5.1.2. Đubriva	28
5.2. Metode	29

5.2.1. Poljski ogled	29
5.2.1.1. Proizvodnja sadnica	31
5.2.1.2. Postavka i održavanje ogleda	34
5.2.2. Testirane karakteristike	35
5.2.2.1. Morfološki parametri	35
5.2.2.2. Prinosi	37
5.2.2.3. Mikroskopska i hromatografska karakterizacija droga	38
5.2.2.4. Hemijska analiza droga	41
5.2.2.5. Biološki efekti	47
5.2.3. Statističke metode	49
6. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	51
6.1. Morfološki parametri	55
6.2. Prinosi	83
6.3. Mikroskopska i hromatografska karakterizacija droga	107
6.4. Hemijska analiza droga	123
6.5. Međusobni odnosi testiranih karakteristika	146
6.6. Biološki efekti	152
7. DISKUSIJA	157
7.1. Morfološki parametri	158
7.2. Prinosi	167
7.3. Mikroskopska i hromatografska karakterizacija droga	174
7.4. Hemijska analiza droga	178
7.5. Međusobni odnosi testiranih karakteristika	185
7.6. Biološki efekti	187
8. ZAKLJUČAK	190
9. LITERATURA	192
10. PRILOZI	210
11. BIOGRAFIJA AUTORA	218

1. UVOD

Arnika (*Arnica montana* L.) je višegodišnja planinska biljka iz porodice Asteraceae, koja nije autohtona biljna vrsta za područje Srbije, iako se spontano javlja u planinskim oblastima nekih susjednih zemalja i Balkanskog poluostrva uopšte (Gajić, 1975; Ferguson, 1976). Njena introdukcija u Srbiji otpočela je 2004. godine na planini Tara (Radanović *et al.*, 2006), dok su prvi pokušaji na kultivaciji njenog srodnika *A. chamissonis* otpočeli još 2000. godine na planini Suvobor (Roki *et al.*, 2001).

Najveći deo sirovine arnike na tržištu (uglavnom cvetne glavice) potiče iz prirode. Populacije arnike su dugo bile eksploatisane uglavnom u zemljama najvećih potrošača ove sirovine kao što su Nemačka, Švajcarska i Velika Britanija (Kathe, 2006). U međuvremenu, vrsta je postala strogo zaštićena u Francuskoj, Nemačkoj i drugim zemljama, pa je kao takva navedena u Aneksu D Uredbe Saveta EU (EU Council Regulation No. 338/97) i u Aneksu V(b) Direktive o staništima EU (92/43/EC – Directive on the Conservation of Natural Habitats and Wild Fauna and Flora) (Lange, 1998).

Kultivacija arnike u svetu se razvija već više decenija (Galambosi, 2004; Dachler i Pelzmann, 1999; Bomme, 1999) gde se pokazala moguća, ali isto tako komplikovana i prilično skupa, u poređenju sa sakupljanjem biljne sirovine iz prirode (Delabays i Mange, 1991; Bomme *et al.*, 1995).

Cvetna glavica arnike (*Arnicae flos*) se uglavnom koristi za spoljašnju upotrebu kod modrica i uganuća u fitofarmaceutskim preparatima kao što su masti, kreme i gelovi. Kao droga koriste se osušene cvetne glavice. Glavne aktivne komponente koje ispoljavaju farmakološki efekat su uglavnom seskviterpenski laktoni kao što su helenalin, 11 α ,13-dihidrohelenalin i njihovi estarski derivati (Lyss *et al.*, 1997).

Droga *Arnicae flos* je oficinalna po V evropskoj farmakopeji (Ph. Eur. 6.0) gde se kao zahtev kvaliteta postavlja minimalni sadržaj od 0.4% ukupnih seskviterpenskih laktona. Sva sirovina arnike odgajana u našoj zemlji zadovoljila je zahteve evropske farmakopeje (Radanović *et al.*, 2007)

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Rod *Arnica*

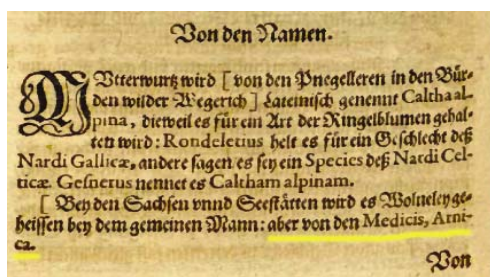
2.1.1. Etimologija naziva roda *Arnica*

Naziv generičkog imena roda *Arnica* Rupp. najverovatnije proizilazi iz deformacije grčke reči Ptarnica, kinuti, aludirajući na cvet koji izaziva takvu reakciju (Muñoz, 1987). U literaturi se još pominje i povezanost grčke reči „arnakis“ – jagnjeća koža, sa teksturom lista (Austin, 2004) što je, sudeći po morfološkoj sličnosti, manje verovatno.

Prvo pominjanje imena *Arnica* koje se pojavljuje u literaturi je u drugom tomu Knjige biljaka od Teodora Tabernaemontanus (Tabernaemontanus, 1625), gde je slika biljke *Arnica montana* prikazana je u kvalitetnom drvorezu, ali je podvedena pod ime *Caltha alpina* (Slika 1). U nastavku, Tabernaemontanus u delu sinonima dodaje „... aber von den Medicis, Arnica.“ (Slika 2).



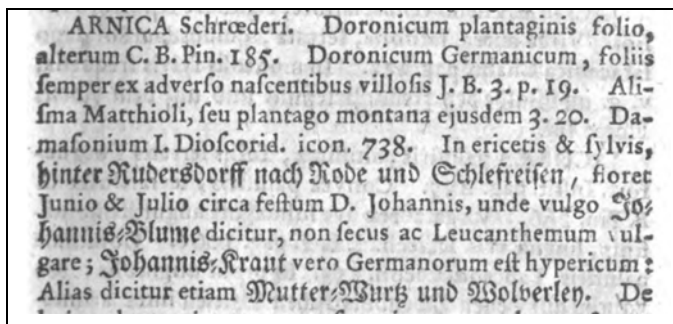
Slika 1. Arnica pod imenom *Caltha alpina* u Kreuterbuch, 1625.



Slika 2. Prvo pominjanje imena *Arnica*, 1625.

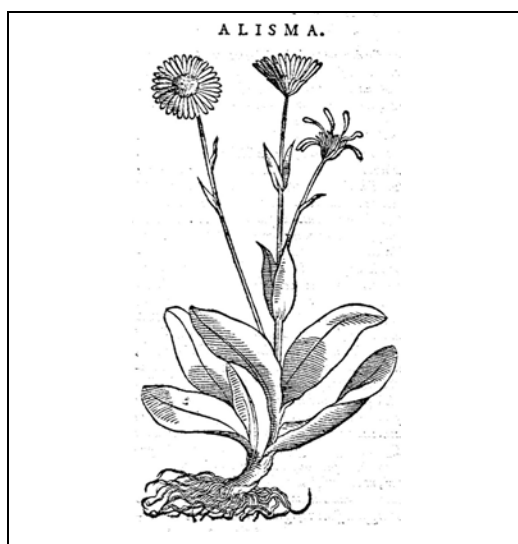
U pomenutoj knjizi, ime *Arnica* nije vezivano ni za jednu drugu biljku. Ista biljka se pojavljuje u Rupovoj “Flori Jene” (Rupp, 1718), gde biljka pod imenom *Arnica Shroederi* (Slika 3), ukazuje na današnju *A. montana*, pa se smatra da je ovo

prva primena termina *Arnica* kao tehničkog imena (Maguire,1943). Naziv ovog roda i danas u sufiksu nosi ime ovog botaničara – upravo: *Arnica* Rupp.



Slika 3. Prva primena termina *Arnica* kao tehničkog imena u Rupovoj „Flori Jene“, 1718.

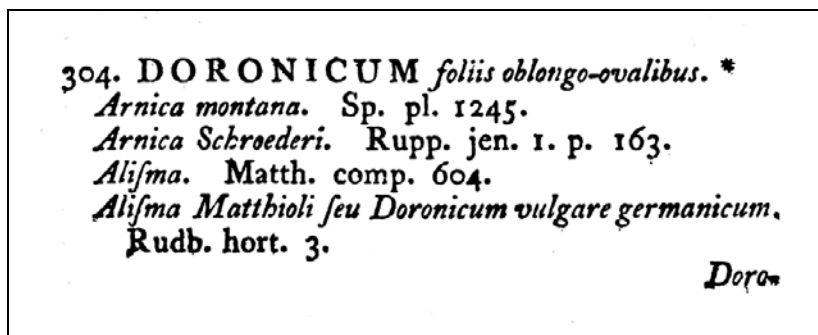
Italijanski fizičar Mattioli koji u svojim Komentarima (Mattioli, 1570) nesumljivo prikazuje sliku *A. montana* pod poglavljem „Alisma“ (Slika 4), ali je prateći opis „Alisma, alii, Datmasonium“ veoma blizak prevodu Dioskoridove „De Materia Medica“ (Dioscoridis, 1552), koja je vodena bokvica (Maguire, 1943).



Slika 4. Crtež *Arnica montana* pod imenom Alisma u Mattiolijevim „Komentarima“, 1570

Slika u Mattiolijevim „Komentarima“, ali ne i prateći opis, verovatno je najstariji poznati zapis biljke iz roda *Arnica* (Maguire,1943).

U literaturi šesnaestog i sedamnaestog veka, termin *Doronicum* je bio taj za koji su evropski botanički autoriteti najčešće vezivali rod *Arnica*. Karl Line je u svom delu *Flora Lapponica* (Linnaei, 1732) prepoznao dve vrste *Arnica* i to *Doronicium foliis oblongo-ovalibus* (Slika 5), koja je današnja *A. montana*, i *Doronicium foliis lanceolatis*, koja je današnja evropska vrsta *A. alpina*. Ove biljke se pod istim imenima pojavljuju i u Lineovoj *Flora Suecica* (Linnaei, 1745).



Slika 5. Jedna od dve prepoznate vrste *Arnica* u Lineovoj „*Flora Lapponica*“ pod nazivom roda *Doronicum*

Moderna taksonomija roda *Arnica* počinje od Lieneovog klasika *Species Plantarum* (Linnaei, 1753), u kojem je prepoznato šest vrsta za koje je usvojeno Rupovo ime *Arnica*. Samo jedna od navedenih, *Arnica montana*, će ostati u rodu *Arnica* do današnjih dana. Raspoređivanje ostalih biljaka po različitim rodovima kao što su *Doronicum*, *Gerbera*, *Senecio*, itd., je bilo potpuno prihvaćeno još pre uvođenja De Kandolinog ranog taksonomskog sistema *Prodromus* (Candolle, 1824). Nakon ovog perioda, intenziviraju se botaničke determinacije, revizije i sistematizacije roda *Arnica*, od strane brojnih svetskih botaničara, da bi u poslednjoj reviziji u rodu ostale zastupljene 32 vrste (Maguire, 1943).

2.1.2. Upotreba arnike u tradicionalnoj medicini

Dokumentovano korišćenje u medicinske evropskog predstavnika arnike, *A. montana*, seže čak do 14. veka, gde se pominje u enciklopediji Mateusa Silvatikusa za menstrualne bolove (Ekenäs, 2008). Od 16. veka, široko se pominje kao "lek za rane" za lečenje spoljnih povreda (Mayer i Czygan, 2000). Line takođe, u *Flora Suecica* (1745), pominje arniku kao zamenu za duvan.

Kada su Evropljani, koji su bili upoznati sa lekovitim efektima arnike, stigli u Novi Svet, otkrili su da domorodci takođe koriste druge vrste arnike u svojoj primitivnoj medicini. Kroz brojna etnobotanička istraživanja potvrđeno je korišćenje severno-američkih vrsta *A. acaulis*, *A. angustifolia*, *A. cordifolia*, *A. latifolia*, i *A. discoidea* u tradicionalnoj medicini (Ekenäs, 2008), kao što je prikazano u Tabeli 1. Zanimljivo je kako su široko razdvojene grupe ljudi koristili razne vrste arnike za lečenje poremećaja koji bi zajedno mogli biti grupisani u zapaljenja.

Tabela 1. Severno-američke vrste arnike dokumentovane u tradicionalnoj upotrebi (Ekenäs, 2008)

Vrsta	Upotreba	Preparat	Deo biljke	Etnička grupa i lokacija
<i>A. acaulis</i>	bol u leđima	infuzija	koren	Catawba, Severna Karolina
<i>A. angustifolia</i>	stomačni problemi	infuzija	-	Gwich'in, Jukon i SZT
<i>A. cordifolia</i>	očno crvenilo	-	-	Shuswap, BK
<i>A. cordifolia</i> i <i>A. latifolia</i>	modrice, otoci i posekotine	melem	cela biljka	Thompson, BK
	tubekoloza	infuzija	cela biljka	Thompson, BK
	afrodizijak	-	koren	Okanagan-Colville, BK
<i>A. discoidea</i>	lečenje rana	-	-	Maidu, Kalifornija

SZT: Severo-zapadne teritorije, BK: Britanska Kolumbija

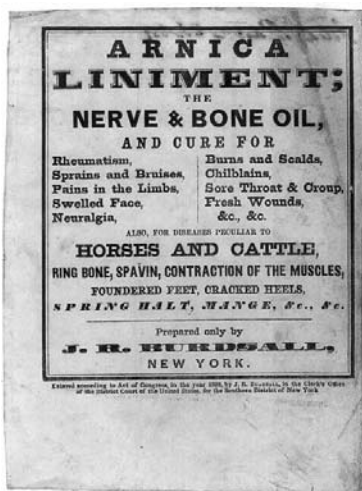
Da arnika nije pogodna za bezbednu internu samoremedikaciju pokazuje slučaj švajcarskog botaničara Konrada fon Gesnera (1516-1565) koji se, testirajući njene farmakološke efekte u internoj upotrebi na sebi, otrovao (Dobelis, 1986).

Uprkos Gesnerovom incidentu upotreba arnike ostaje popularna u velikom delu Evrope. Poznati pesnik, filozof, dramski pisac i botaničar Johan Wolfgang fon Gete (1749-1832) je izjavio da mu je arnika u starosti pomogla da se oslobodi svoje hronične angine (Bown, 2001). Duke i saradnici (2002) savetuju da arniku ne treba koristiti interno, gde u isto vreme potvrđuju da postoje dobri dokazi za blagotvorno dejstvo u spoljnoj aplikaciji.

Arnika se još uvek koristi interno u Nemačkoj, dok je Velikoj Britaniji i Sjedinjenim Američkim Državama njena upotreba ograničena samo na spoljnu (Bown, 2001). Herc i Sosa (1988) su utvrdili da ova vrsta sadrži seskviterpenske laktone kao i mnoge druge vrste iz roda *Arnica*, dok su Ebert i sar. (1988) potvrdili da arnika sadrži i flavonoidne glikozide. Iako su se razne vrste arnika koristile za lečenje raznih bolesti, danas je njena upotreba ograničena samo na spoljašnju (Bown,

2001; Duke *et al.*, 2002). U spoljašnjoj aplikaciji, biljka se smatra baktericidom i vezikantom, a koristi se za lečenje modrica, oteklina, ogrebotina i malih rana.

Na Slici 6 prikazana je reklama, iz 1852. godine, za tečni uljani preparat na bazi arnike namenjen za lečenje širokog spektra bolesti kod ljudi i domaćih životinja.



Slika 6. Reklama za ulje arnike iz 1852. godine (preuzeto sa fr.wikipedia.org; autor: Burdsall, J.R.)

2.2. Biologija vrsta roda *Arnica*

2.2.1. Taksonomija

Familija: Asteraceae (Compositae)

Podfamilija: Asteroideae

Tribus: Heliantheae (Arniceae, Senecioneae)

Podtribus: Chaenactidinae (Senecioninae)

Pozicija roda *Arnica* L. u familiji Asteraceae je još uvek kontraverzna (Maguire, 1943). Nakon godina raspoređivanja u tribus Senecioneae, (Bentham, 1873; Hoffmann, 1894), integrisan je u tribus Heliantheae, (Robinson, 1981; Nordenstam, 1977) što je zasnovano na morfološkim i hemijskim karktaristikama. Budući je trenutna klasifikacija kontroverzna postoje mišljenja da bi trebalo oformiti novi tribus „Arniceae“

(Nordenstam, 1977; Seaman, 1982).

Klasifikacija roda *Arnica*:

U rodu se nalazi 32 vrste *Arnica*, koje su podeljene u 5 podrodova (Maguire, 1943):

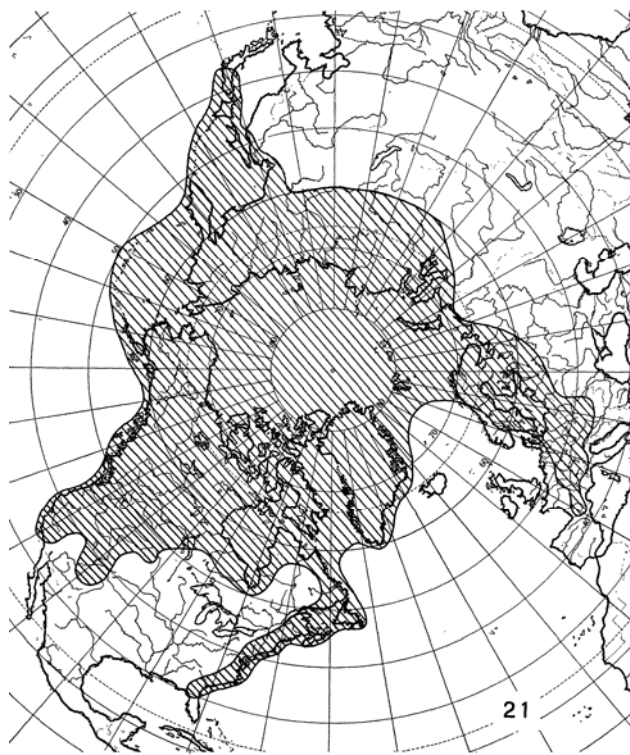
1. Podrod *Arctica*, na primer sa: *A. alpina*, *A. fulgens*, *A. sororia*;
2. Podrod *Austromontana*,
 - Sect. *Eulatifolia*, na primer sa: *A. cordifolia*, *A. nevadensis*;
 - Sect. *Eradiatae*, na primer sa: *A. venosa*, *A. viscosa*;
3. Podrod *Chamissonis*,
 - Sect. *Euchamissonis*, na primer sa: *A. chamissonis*;
 - Sect. *Eulongifolia*, na primer sa: *A. longifolia*;
 - Sect. *Eumollis*, na primer sa: *A. amplexicaulis*, *A. mollis*;
4. Podrod *Montana*, na primer sa: *A. acaulis*, ***A. montana***;
5. Podrod *Andropurpurea* na primer sa: *A. lessingii* *A. sachalinensis*.

2.2.2. Botaničke osobine roda

Višegodišnje zeljaste biljke; cvetna stabljika prosta ili ređe razgranata; listovi prosti sedeći, većina skupljena u rozetu, dok su na cvetnoj stabljici raspoređeni nisko uglavnom naspramno, a ređe naizmenično; žuta cvetna glavica sa zigomorfim ženskim jezičastim cvetovima, koji ponekad potpuno izostaju, i radijalnim hermafroditnim trubastim cvetovima; krunični listići dlakavi lancetasti, jedno- ili dvoredi, čašica je konveksna i dlakava; ahenija je izbrazdana, glatka ili dlakava; papus svilenkast sa jednim redom čekinja (HagerROM, 2002).

2.2.3. Rasprostranjenje i prirodna staništa

Biljke iz roda *Arnica* se rasprostiru uglavnom po Severnoj Americi, a samo nekoliko vrsta se nalazi na tlu Azije (Slika 7). U Evropi se nalaze samo *A. montana* i *A. angustifolia* (Syn. *A. alpina*) (Maguire, 1943). Arnika se može na prirodnim staništima pronaći u velikom broju evropskih država kao što su Au Be Cz Da Ga Ge He Ho Hs Hu It Ju Lu No Po Rm Rs(B,C,W) Su (Tutin *et al.*, 1964-1980). Iako nije autohtona biljna vrsta za područje Srbije (Gajić, 1975), spontano se javlja u planinskim oblastima nekih susednih zemalja i Balkanskog poluostrva uopšte (Ferguson, 1976). Na teritoriji bivše SFRJ (Ju) je pronađena u Sloveniji (Baričević i Rode, 2000), Bosni i Hercegovini i Crnoj Gori (N. Menković, usmena komunikacija). U Rumuniji je arnika široko rasprostranjena u planinskim područjima (Michler, 2007), dok je u Bugarskoj ograničena na usko područje planine Rila (Assyov *et al.*, 2006). Prirodna staništa su im uglavnom visokoplaninske livade sa *Nardus stricta* (Oberdorfer *et al.*, 1994) obrazovane na silikatima (Bruelheide i Scheidel, 1999).



Slika 7. Svetska distribucija biljaka iz roda *Arnica* (Maguire, 1943)

2.3. Oficinalnost droga vrsta roda *Arnica*

Od svih vrsta iz roda *Arnica*, samo su dve zastupljene kao oficinalne droge po farmakopejama i to *A. montana* i *A. chamissonis*. U Tabeli 2. dat je pregled oficinalnih droga poreklom od ove dve vrste.

Tabela 2. Oficinalnost droga arnike (HagerROM, 2002)

Vrsta	Ogran	Droga	Farmakopeje
<i>A. montana</i>	cvetna glavica	<i>Arnicae flos</i>	DAB 10; PF X; BHP 83; Belg V; Ned 6; Hisp IX; BPC 49; Helv VII; ÖAB 90; AB-DDR; Mar 29
<i>A. montana</i>	koren	<i>Arnicae radix</i>	ÖAB 90; Hisp IX;
<i>A. chamissonis</i>	cvetna glavica	<i>Arnicae flos</i>	AB-DDR; DAB 10;

2.4. *Arnica montana* - narodni nazivi i sinonimi

U Tabeli 3 dat je pregled sinonima i narodnih naziva za *A. montana*.

Tabela 3. Pregled sinonima i narodnih naziva za *A. montana*

Latinski naziv	<i>Arnica montana</i> L.
Sinonimi	<i>Doronicum arnica</i> Desf.; <i>Doronicum montanum</i> Lam. (HagerROM, 2002)
Domaći nazivi:	brđanka, brđanka žuta, veprina, veprovac, zlatenica, konjski petrovac, majasil trava, mali divlji neven, modrice, modrulja, moravka, paprica, potras gorska, tičji neven, trava od majasila (Simonović, 1959)
Ruski:	арника горная, баранник горный, баранка, купальник, пу-повник, лесная титунь (Rabinović, 1987)
Engleski:	<i>Arnica</i> , Celtic bane, Leopard's bane, Mountain, Mountain tobacco (HagerROM, 2002)

Nemački:	Arnika, Bergwohlverleih, Wundkraut, Fallkraut, Kraftwurz, Kraftrosen, Mutterkraut, Engelkraut, Stichkraut (Mayer and Czygan, 2000), Bergdotterblume, Johannisblume, St-Luzianskraut, Stichwurz, Schnupftabaksblume, Tabakblume, Verfangkraut, Wohlverleih, Wulfesblaume, Wulfsblöme, Wulfsblom (HagerROM, 2002)
Francuski:	Arnique, Arnica, Panacée des chutes, Tabac des Vosges (Simonović, 1959)

2.5. *Arnica montana* – botaničke karakteristike

Arnika je zeljasta i višegodišnja biljka koja razvija cvetne stabljike visine 20 do 60 cm i prosečne debljine 0,5 cm; obično nerazgranate, tripartijske i simpodijalne. Podzemno razvija braonkasti rizom koji može biti dugačak čak i do 23 cm, a sastavljen je od šest partija, razgranat. Jedna biljka obično ima dva do tri rizoma iz kojih bočno izrastaju, do 1 mm debeli, žućkasto-braonkasti korenovi. Četiri do šest sedećih listova formiraju ravnu prizemnu rozetu. Listovi su celi ovalni do objajasti sa pet (ili sedam) lisnih nerava. Cvetna stabljika je visine do 60 cm prekrivena je glandularnim trihomama sa dva do šest manjih sedećih, ovalnih do lancetastih, celih do blago nazubljenih, naspramno raspoređenih, listića. Cvetna glavica je terminalna i obično je u osi sa najvišljim parom listića; 6 – 8 cm u prečniku; žumance do narandžasto-žuta, retko bledo-žuta; karakteristično prijatnog mirisa; čašica i krunica su dlakave; ženski cvetovi su jezičasti i ima ih 12 – 20; hermafroditni cvetovi su trubasti i ima ih do 100. Plod je ahenija sa čekinjastim papusom.

2.6 Droge arnike

2.6.1 Cvetna glavica arnike - *Arnicae flos*

2.6.1.1. Sinonimi

Flores Arnicae; Flores Calendulae alpinae; Flores Plantaginis montanae; Flores Ptarmicae; Flores Alismae; Flos Arnicae

2.6.1.2. Oficinalnost (HagerROM, 2002)

Arnikablüten – DAB 10;

Arnica – PF X; BHP 83;

Arnicae Flos – Belg V; Ned 6; Hisp IX; BPC 49; Helv VII; Ph Eur. 6.0.

Flos Arnicae – ÖAB 90;

Flores Arnicae – AB-DDR;

Arnica Flower – Mar 29

Definicija droge po farmakopejama

„Cele ili delimično izlomljene cvetne glavice biljke *Arnica montana* L.“ (Ph.Eur. 6.0); „Suva, u komadu ili izlomljena cvetna glavica sa čašicom“ DAB 10, PF X, BPC 49, ÖAB 90, Helv VII, AB-DDR, BHP 83, Mar 29; „Suvi, od čašice i čašičnih listića oslobođeni, pojedinačni cvetovi (trubasti i jezičasti) cvetne glavice“ Belg V, Ned 6, Hisp IX; „Sveže ili suve cvetne glavice“ (BAz, 1984)

2.6.1.3. Opis droge (Ph.Eur. 6.0)

Cvetna glavica je, kada je raširena, prečnika oko 20 mm, oko 15 mm duboka i ima 2-3 cm dugačku cvetnu dršku. Involukrum se sastoji od 18-24 izduženo lancetastih brakteja, sa zašiljenim vrhom, poređanih u 1-2 reda: brakteje, oko 8-10 mm dugačke, su zelene sa žućkasto-zelenim spoljnim dlačicama koje se mogu videti pod lupom. Cvetna loža, oko 6 mm u prečniku, je konveksna, sačasta i pokrivena dlačicama. Na periferiji lože nalazi se oko 20 jezičastih cvetova 20 - 30 mm dugačkih, a na disku se nalazi veliki broj cevastih cvetova dugačkih oko 15 mm. Tučak, oko 4-8 mm dugačak, je krunisan papusom od belih dlačica 4 - 8 mm dugačkim. U suvoj drogi u manjoj meri mogu biti prisutne i braon ahenije, krunisane papusom ili ne.

2.6.1.4. Identifikacija droge

Morfološka identifikacija (Ph.Eur. 6.0)

Involukrum se sastoji od izduženih ovalnih brakteja sa zašiljenim vrhovima, po obodu dlakavim. Jezičasti cvetovi imaju redukovanu čašicu krunisanu finim, svetlucavim, beličastim dlačicama koje nose male trihome. Narandžasto-žuta krunica jezičastih cvetova ima 7-10 paralelnih nerava, a na vrhu joj se nalaze tri mala režnja. Prašnici su sa tri antere i nisu kompletno razvijeni. Iz uskog braon tučka izlazi stubić podeljen na dve grane zakrivljene ka spolja. Trubasti cvetovi su aktinomorfni. Tučak i čašica su slični kao kod jezičastih cvetova. Kratka krunica ima 5 trouglastih režnjeva, a 5 fertilnih prašnika je spojeno u antere.



Slika 8. Biljka arnike sa botaničkim detaljima (Köhler, 1883-1914)

Hemijska identifikacija

Za analizu biljnih droga u praškastom obliku uobičajeno se koristi tehnika tankoslojne hromatografije (TLC). Identifikacija droga se vrši na osnovu prisustva jedinjenja koja su karakteristična za određenu biljnu vrstu. Za brzu identifikaciju droge *Arnicae flos* koristi se metoda po Vagneru (Wagner *et al.*, 1984).

Falsifikati i zamene

Falsifikati i zamene najčešće potiču iz kruga žuto-cvetajućih biljaka roda Asteraceae. Elektronska publikacija HagerROM (2002) navodi 11 vrsta koje se najčešće sreću kao falsifikati droge *Arnicae flos* (Tabela 4).

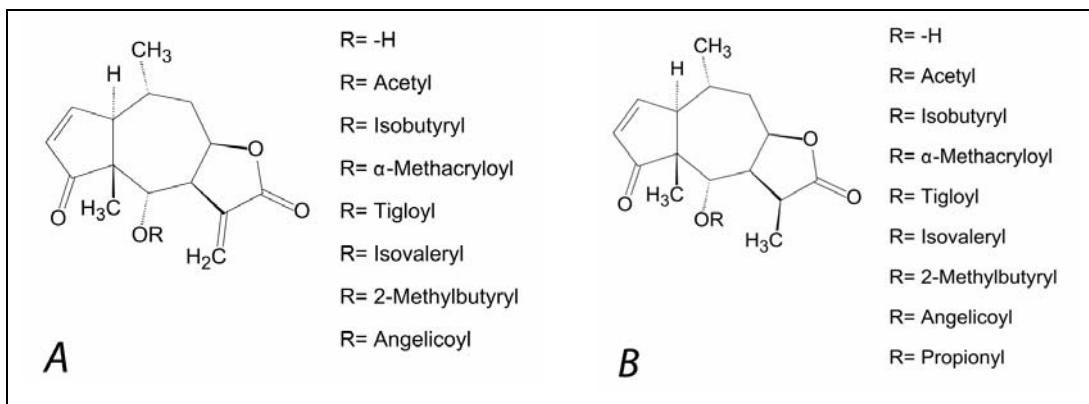
Tabela 4. Biljke koje se najčešće nalaze u prometu kao falsifikati droge *Arnicae flos*

Naziv biljne vrste	Razlika za raspoznavanje
<i>Anthemis tinctoria</i>	Plodnik je bez papusa; cvetna loža sa paljama (ljustastim listićima)
<i>Bupthalmum salicifolium</i>	Involukrum postavljen u više redova, antere su na donjem kraju slabije razvijene
<i>Calendula officinalis</i>	Plodnik je bez papusa, jezičasti cvetovi sa četiri nerva (linije)
<i>Doronicum clusii</i>	Kratak (1 mm dužine) plodnik bez papusa, jezičasti cvetovi sa četiri nerva (linije)
<i>Doronicum pardalianches</i>	Plodnik je bez papusa, jezičasti cvetovi sa četiri do pet nerava
<i>Heterotheca inuloides</i>	Jezičasti cvetovi bez papusa, cevasti cvetovi sa dvorednim papusom, žig tučka u obliku slova V (nije kao kod cvetnih glavica arnike savijen naniže), plodovi bez fitomelanina, sitni, ovalni (kod arnike su tanki, dugi sa fitomelanom), trihomi plodnika su dugi i tanki, sa ćelijama postavljenim u dva reda
<i>Inula britannica</i> i druge vrste istog roda	Jezičasti cvetovi sa četiri nerva, plodnik go
<i>Pulicaria dysenterica</i>	Dvoredan papus
<i>Scorzonera humilis</i>	Svi cvetovi su jezičasti (50), ahenija duplo veća
<i>Senecio doronicum</i>	Plodnik go, mali prizmatični kristali u centru
<i>Tragopogon pratensis</i>	Svi cvetovi su jezičasti, paperjast papus u obliku štita.

2.6.1.5. Hemijski sastav

Kao i ostali biljni lekovi, arnika takođe predstavlja mešavinu različitih grupa aktivnih materija koje zajedno doprinose ukupnom delovanju. Nesumnjivo su seskviterpensi laktoni sastojci droge sa najjačom aktivnošću (Lyss *et al.*, 1997, Wagner *et al.*, 2004; Merfort, 2003; Wagner i Merfort, 2007). Pored seskviterpenskih laktona najviše izučavana jedinjenja u cvetu arnike su svakako flavonoidi u formama flavonoidnih glikozida (Merfort i Wendisch 1987, 1992), flavonoidnih glukunorida (Merfort i Wendisch 1988) i flavonoidnih aglikona (Merfort i Wendisch 1985). Ostale prateće supstance u cvetu arnike su karotenoidi (Vanhaelen, 1973), diterpeni (Schmidt *et al.*, 1992); arnidiol (triterpen) (Santer i Stevenson, 1962), pirolizidinski alkaloidi (tusilagin i izotusilagin) (Paßreiter *et al.*, 1992), poliacetileni (Schulte *et al.*, 1969), kumarini (umbeliferon i skopoletin) (Willuhn, 1989), fenolne kiseline (holorogenska kiselina, kafena kiselina i cinarin) (Merfort, 1992; Ebert *et al.*, 1988; Kohlmünzer 2000; Reyes-Salas *et al.* 2002), lignani (Schmidt *et al.* 2006) and oligosaharidi (White *et al.*, 1985; Kennedy *et al.*, 1988). Etarska ulja sadrže masne kiseline, timolne derivate, monoterpene i seskviterpene (Güntzel *et al.*, 1967; Kating *et al.*, 1970; Willuhn, 1972a, b; HagerROM, 2002; Ristić *et al.*, 2007).

Seskviterpensi laktoni cvetne glavice arnike su pseudoguainolidnog tipa (Pinchon and Pinkas, 1988; Willuhn, 1989). U suvoj drogi ih ima između 0.2 – 0.8% i dominantno su zastupljeni kao estri helenalina (Helenalin) i dihidrohelenalina (11 α , 13-Dihydrohelenalin) i kratko-lančanih masnih kiselina (HagerROM, 2002) (Slika 9). Willuhn i saradnici (1994) predložili su 0.4% m/m kao minimalnu količinu ukupnih seskviterpenskih laktona za farmakopejsku standardizaciju droge *Arnicae flos*. Taj kriterijum je usvojen i trenutno je važeći po šestoj evropskoj farmakopeji (Ph.Eur. 6.0).



Slika 9. Helanalin(A) i dihidrohelenalin(B) i mogući estri (HagerROM, 2002)

U analizama hemijskog sastava arnike otkrivena je regionalnost u sadržaju pojedinih seskviterpenskih laktona, gde srednje-evropske vrste arnike sadrže dominantno helenalinske estre, dok kod španskog tipa arnike prevladavaju dihidrohelenalinski estri (Willuhn *et al.*, 1995; Perry *et al.*, 2009). Takođe je primećeno da su kod biljaka sa većih nadmorskih visina (1330-1460 m) zastupljeniji helenalinski estri, a su kod biljaka iz nižih predela bili dominantni dihidrohelenalinski estri (Perry *et al.*, 2009).

Flavonoidi imaju značajna antioksidativna i antibakterijska svojstva (Iauk *et al.* 2003; Santos *et al.* 2006) i pretpostavlja se da sinergistički deluju sa seskviterpenskim laktonima (Willuhn 1991). Fenolne komponente cvetne glavice arnike su uglavnom fenolne kiseline (ca. 50 mg/g) i flavonoidi (ca. 20 mg/g) (HagerROM, 2002; Merfort, 1992; Kohlmünzer, 2000; Reyes-Salas *et al.*, 2002). Od fenolnih kiselina najzastupljenije su hlorogenska, 3,5-dikafeoilhinska (Ganzera *et al.*, 2008) i drugi derivati kafene kiseline, dok su od fenolnih jedinjenja najzastupljeniji kvercetin-3-*O*-glukozid, kempferol-3-*O*-glukozid, kempferol-3-*O*-glukoronid, 6-metoksikempferol-3-*O*-glukozid i hispidulin (Spitaler *et al.*, 2008; Albert *et al.*, 2009). Schilcher i sar. (2007) takođe su prijavili su 16 flavonidnih aglikona i 17 flavonoidnih glikozida u hemijskom sastavu ekstrakata cvetne glavice, od kojih izdvajaju hispidulin kako najaktivniju komponentu.

2.6.1.6. Biološki efekti

Iako se u literaturi pominje moguća upotreba cvetne glavice arnike za antibiotsku aktivnost (Kolodziej, 1993; Willuhn *et al.*, 1982), usled moguće toksičnosti (Wijnsma, 1995; Macêdo, 2004), danas se upotrebljava isključivo zbog svojih anti-inflamatornih svojstava (Duke *et al.*, 2002).

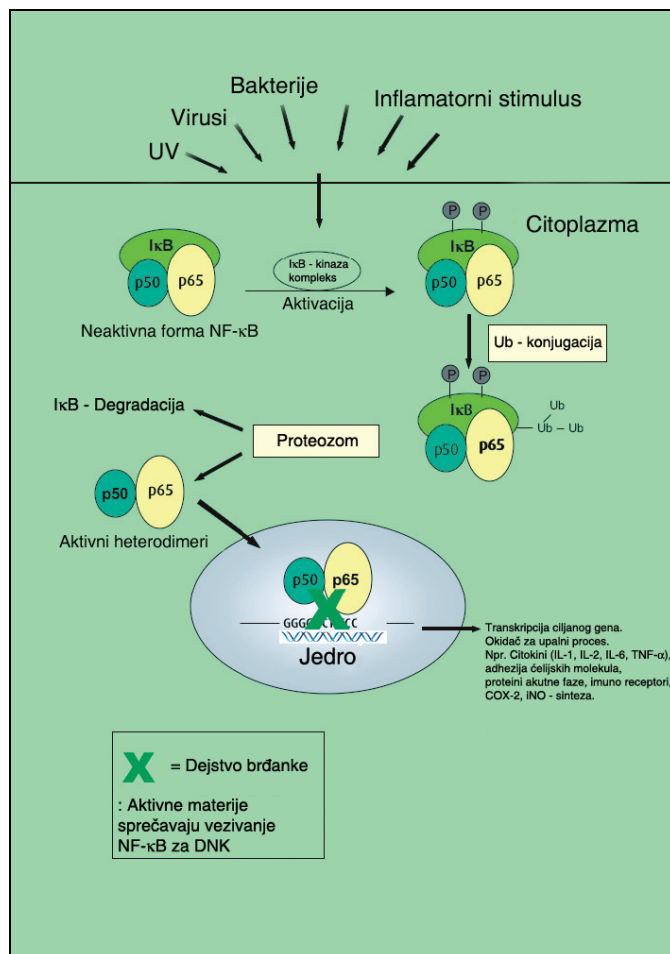
Seskviterpenski laktoni pokazuju jaku anti-inflamatornu aktivnost utičući na zapaljenske procese u početnim fazama (García-Piñeres *et al.*, 2001). Mikromolarne koncentracije helenalina, dihidrohelenalina i njihovih estara, inhibiraju aktivaciju transkripcionih faktora NF- κ B i NF-AT (Lyss *et al.*, 1999; Tornhamre *et al.*, 2001; Klaas *et al.*, 2002) (Slika 10). Transkripcioni faktor NF- κ B uzrokuje ekspresiju više od 150 gena kao reakciju na zapaljenje, bakterijske i virusne procese. Aktivatori NF- κ B i tipovi ispoljenih gena čine ga ključnim faktorom imuno odgovora ljudskog tela (García-Piñeres *et al.*, 2001). Faktor NF- κ B se sastoji od dve podjedinice p50 i p65, i kao takav je prisutan u neaktivnoj formi u citoplazmi. Treća subjedinica I κ B sprečava njegov ulazak u ćelijsko jedro. U toku zapaljenja, bakterijske ili virusne infekcije, inhibitorna podjedinica I κ B se razgrađuje i tada NF- κ B prelazi u jedro, vezuje se za DNK i inicira formiranje različitih medijatora zapaljenja (proteini akutne faze, pro-zapaljenskih citokina kao što su IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 i tumor-nekrozni-faktor (TNF- α) (Merfort, 2003).

Helenalin takođe pokazuje inhibitorno delovanje u ovom procesu tako što sprečava vezivanje NF- κ B za DNK. Majklovom reakcijom adicije helenalin se vezuje za podjedinicu p65 transkripcionog faktora (Rüngeler *et al.*, 1999). Preparati arnike inhibiraju NF-AT i na taj način sprečavaju produkciju citokina tipova IL-2, IL-3, GM-CSF, IFN- γ i TNF- α . Ovi medijatori su takođe uključeni u tok zapaljenske reakcije.

U poređenju sa ostalim anti-inflamatornim supstancama, seskviterpenski laktoni inhibiraju zapaljenski proces u njegovoj suštinskoj tački nastajanja. Nesteroidni anti-inflamatorni lekovi (NSAIDs) ili osnovne anti-reumatske supstance deluju samo u daljim fazama zapaljenskog procesa na nivou enzima koji učestvuju u metabolizmu arahidonske kiseline, ali su do ovog momenta, zapaljenski procesi već uveliko otpočeli (Rüngeler *et al.*, 1999). Pojedini autori navode i citotoksičnu aktivnost seskviterpenskih

laktone izolovanih iz cvetne glavice arnike, zbog čega može naći primenu i u lečenju različitih vrsta karcinoma (Woerdenbag *et al.*, 1994; Lopez-Anton *et al.*, 2007).

Pored naširoko proučavane anti-inflamatorne aktivnosti seskviterpenskikh laktone, zastupljenih u cvetnoj glavici arnike, manja pažnja je pridavana je sporednim farmakološkim aktivnostima fenolnih komponenti. Od fenolnih sekundarnih metabolita najzastupljenije su fenolne kiseline i flavonoidi (Spitaler *et al.*, 2006). Biološke aktivnosti fenolnih jedinjenja su dosta proučavane, kako zbog njihove velike rasprostranjenosti u biljnom svetu, tako i zbog relativno male toksičnosti (Janković, 2005). Najviše je proučavana antioksidativna aktivnost *in vitro* zbog sposobnosti fenolnih jedinjenja da redukuju slobodne radikale (Pourmorad *et al.*, 2006). Gawlik-Dziki i sar. (2011) su pokazali da tinktura cvetne glavice arnike ima antioksidativne osobine.



Slika 10. NF-κB zapaljenski procesi i delovanje arnike (Bioforce Monograph)

2.6.2. Koren arnike - *Arnicae radix*

2.6.2.1. Sinonimi

Od ostalih naziva u literaturi su najčešće zastupljeni *Arnicae rhizoma*; *Radix Arnicae*; *Radix Doronici germanici*; *Rhizoma Arnicae*.

2.6.2.2. Oficinalnost

Koren arnike je oficinalan po austrijskoj (*Radix Arnicae* – ÖAB 90) i španskoj (*Arnicae Rhizoma* – Hisp IX) farmakopeji.

Definicija droge po farmakopejama

„Osušeni rizom sa korenom“ (ÖAB 90, Hisp IX).

2.6.2.3. Opis droge (ÖAB 90)

Rizom je skoro cilindričan, obično zakrivljen, dužine do 10 cm, debljine do 5 mm, crvenkasto-braon boje. Površina rizoma je hrapava sa ožiljcima od stabljika i listova. Na preseku se vidi široka sivkasta kora, venac žućkasto-sivog drvenastog dela sa braonkasto-sivim oznakama. Iz donjeg dela rizoma izlazi veliki broj adventivnih korenova, 1 mm debljine, koji se u suvom stanju veoma lako lome.

2.6.2.4. Identifikacija droge

U farmakopejama nije opisan postupak identifikacije ove droge (HagerROM, 2002)

Falsifikati i zamene

U Tabeli 5. dat je pregled najčešćih falsifikata droge *Arnicae rhizoma*.

Tabela 5. Biljke koje se najčešće nalaze u prometu kao falsifikati droge *Arnicae rhizoma*

Naziv biljne vrste	Razlika za raspoznavanje
<i>Eupatorium cannabinum</i>	Adventivni korenovi izlaze sa svih strana i po celoj dužini rizoma
<i>Fragaria vesca</i>	Nemaju ekskretornih ćelija
<i>Hieracium murorum</i>	
<i>Hieracium umbellatum</i>	
<i>Hypochoeris maculate</i>	
<i>Geum urbanum</i>	Miriše na karanfil
<i>Solidago virgaurea</i>	Rizom je deblji, veliki broj tankih korenčića, skoro aromatičan

2.6.2.5. Hemijski sastav

Rizom i koren vrste *A. montana* se odlikuju visokim sadržajem etarskog ulja. U rizomu se nalazi 2.70 do 6.31%, a u korenu 1.75 do 3.74% etarskog ulja (HagerROM, 2002). Odnos korena i rizoma u suvoj drogi je otprilike 1:1. Glavne komponente (oko 90%) etarskog ulja su derivati timola (Willhun, 1972b; Rossetti *et al.*, 1984; Pinchon and Pinkas, 1988).

2.6.2.6. Biološki efekti

U litereturi se ne mogu pronaći podaci o farmakološkom delovanju korena arnike (HagerROM, 2002). Budući da je poznata hemijska sturkura etarskog ulja, sa visokim sadržajem timola i timolnih derivata, može se pretpostaviti da bi se u spoljnoj upotrebi moglo koristiti kao antiseptičko sredstvo. U pogledu antiseptičke primene u veterinarskoj medicini, droga *Arnicae radix* je predložena za uključivanje u Aneks II Regulative Saveta (EEC) No. 2377/90 (Lange, 1998).

2.5. Kultivacija

2.5.1. Izvori biljne sirovine *Arnicae flos* i opravdanost gajenja

Do pre par decenija unazad arnika (*Arnica montana* L.) je bila uobičajena biljka na tlu Evrope (Kathe, 2006). Mogla se pronaći širom kontinenta najčešće na kiselim zemljištima planinskih pašnjaka do 2850 m.n.v. (Bown, 2001). Kao i mnoge druge biljne vrste, populacije arnike su postepeno proređivane ili potpuno nestale sa delova područja predhodnog rasprostiranja. Razlozi za ovakav nepovoljni trend su mnogostruki: prekomerno sakupljanje biljaka iz prirodnih staništa, intenzifikacija poljoprivrede, velika gustina stoke na staništima arnike i promene namene zemljišta (Kathe, 2006).

Godišnja svetska tražnja za suvom cvetnom glavicom arnike se procenjuje na oko 50 t (Galambosi, 2004). Najveći deo sirovine arnike potiče iz prirode. Glavni izvori cvetne glavice biljke *Arnica montana*, u Evropi su Rumunija i Španija (Lange, 1998). Populacije arnike su dugo bile eksploatisane u glavnom u zemaljama najvećih potrošača ove sirovine kao što su Nemačka, Švajcarska i Velika Britanija (Kathe, 2006). U međuvremenu, vrsta je postala strogo zaštićena vrsta u Francuskoj, Nemačkoj i drugim zemljama, pa je kao takva navedena u Aneksu D Uredbe Saveta EU (EU Council Regulation No. 338/97) i u Aneksu V(b) Direktive o staništima EU (92/43/EC – Directive on the Conservation of Natural Habitats and Wild Fauna and Flora). Poslednjih godina najveća količina biljne droge *Arnicae flos*, na evropskom tržištu, je uvežena iz južne i jugoistočne Evrope, a naročito iz Španije i Rumunije (Lange, 1998). U nekim delovima Rumunije, populacije arnike su još uvijek relativno velike, ali trend uništenja ili konverzije staništa i pritiska usled prekomernog sakupljanja može ugroziti i arniku i druge lekovite biljke prirodnih resursa u zemlji. Iz tog razloga su svetske organizacije za zaštitu životne sredine WWF-UK i WWF-DCP (Danube-Carpathian Programme) u saradnji sa Univerzitetom poljoprivrednih nauka i veterine (USAMV) iz Kluža-Napoke u Rumuniji, pokrenuli projekt „Očuvanje istočno-evropskog lekovitog bilja: *Arnica montana* u Rumuniji“ (Michler *et al.*, 2008).

Kultivacija arnike u svetu se razvija već više decenija (Heeger, 1956; Bomme, 1999; Dachler i Pelzmann, 1999; Galambosi, 2004) gde se pokazala moguća, ali isto

tako komplikovana i prilično skupa, u poređenju sa biljnom sirovinom iz prirode. Budući da je svetska tražnja farmaceutske i kozmetičke industrije za cvetnom glavicom arnike u stalnom porastu, a prirodni resursi sve ugroženiji, kultivacija ove kulture se ispostavlja kao jedini održivi način obezbeđivanja sirovine za tržište (Smallfield i Douglas, 2008).

2.5.2. Sortiment

Godine 1990. profesor Urlih Bome iz Bavarskog državnog istraživačkog centra za poljoprivredu (LfL) je proizveo prvu sortu arnike pod nazivom 'ARBO' (Kathe, 2006), koja je postala komercijalno dostupna nekoliko godina kasnije, i do danas je jedina priznata sorta vrste *Arnica montana* L. (Blatt für Sortenwesen, 2010). 'ARBO' u proseku daje oko 90 cvetnih glavica po biljci, a potvrđeno je da u hemiskom sastavu suve droge sadrži oko 0,7% flavonoida i oko 0.8% seskviterpenskih laktona (Bomme, 1999).

2.5.3. Iskustva u gajenju arnike

Arnika se može naći u spontanoj flori od Skandinavije do Iberijskog poluostrva, a njena distribucija je uglavnom ograničena na planinske livade siromašne u hranivima (Bruehlheide & Scheidel, 1999). Većina autora je definiše kao biljku hladnih staništa, ali optimalna nadmorska visina za gajenje u literaturi nije precizno definisana, budući da su ogledi izvođeni na različitim geografskim širinama (Bomme *et al.*, 1995; Galambosi, 2004; Smallfield i Douglas, 2008). Istraživanja na polju introdukcije arnike na Novom Zelandu su pokazala da biljka, na nižim nadmorskim visinama, nije prešla u generativnu fazu (Smallfield i Douglas, 2008), dok se, u pogledu kvaliteta biljne droge, ukupna količina derivata kafene kiseline, flavonoida i fenola značajno se povećava sa povećanjem nadmorske visine (Spitaler *et al.*, 2008). Takođe se i štete nanete od strane puževa golaća pojavljuju kao ograničavajući faktor na nižim nadmorskim visinama (170 m) (Bruehlheide i Scheidel, 1999; Bruehlheide, 2003). U našim agroekološkim uslovima Stepanović i saradnici (2009) preporučuju gajenje arnike u planinskim predelima na visini od 900 do 1500 m nadmorske visine.

Arnika je vrlo osetljiva prema tipu zemljišta. Najbolje uspeva na rastresitim, humusom-bogatim, dobro aerisanim oceditim zemljištima. pH vrednost zemljišta bi trebalo da se kreće od blago kiselog do neutralnog, s tim da procenat kalcijuma (CaCO_3) u zemljištu ne bi smeo da prelazi 1,5%, pošto u suvišku dovodi do hloroze, slabog porasta i uginuća biljaka (Dachler i Pelzmann, 1999; Bomme, 1999). Ukoliko su ispoštovani osnovni agroekološki uslovi, arnika se u kulturi može gajiti i do četiri godine (Marquard i Kroth, 2001)

Razmnožavanje

Arnika se razmnožava setvom ili deljenjem rozeta (vegetativno). Seme arnike je cilindričnog oblika sa težinom hiljadu semena između 0.9 – 1.3 g i dobrom klijavošću koja je obično ispod 80% (Smallfield i Douglas, 2008).

Direktna setva arnike je moguća, ali obično dovodi do neujednačenog sklopa, pa se preporučuje zasnivanje plantaža putem sadnica (Prommersberger i Dapper, 1995; Bomme, 1991; Smallfield i Douglas, 2008). Tretman semena za obe procedure ima smisla (Bomme *et al.*, 1995). Ovo se može izvesti putem sedmodnevnog hlađenja vlažnog semena na 5°C (Bomme *et al.*, 1995), potapanjem semena na 48 sati u destilovanu vodu ili sedmodnevno potapanje u rastvor polietilen-glikola-6000 sa naknadnim sušenjem semena (Prommersberger & Dapper, 1995; Bomme, 1991; Bomme, 1999), pri čemu se postiže bolja sinhronizacija klijanja (Smallfield i Douglas, 2008). Pri konstantnoj temperaturi od 18 – 20°C i optimalnoj vlažnosti, seme arnike bi trebalo da klija u roku od pet do sedam (deset) dana (Marquard i Kroth, 2001). Sadnice se proizvode setvom semena u kontejnere za proizvodnju rasada. Sadnica je spremna za presađivanje nakon 6-8 nedelja, kada ima formirana 3-4 para pravih listova i dobro razvijen koren (Smallfield i Douglas, 2008).

Sadnju treba obaviti u aprilu ili najkasnije u maju mesecu (Bomme *et al.* 1995; Marquard i Kroth, 2001). Iako neki strani autori preporučuju postizanje većeg broja biljaka po hektaru (čak i do 125000) sužavanjem međurednog rastojanja na 30 ili 40 cm (Bomme *et al.* 1995; Muñoz, 1987), za naše uslove se preporučuje model 60-70 cm rastojanje između redova i 23 - 25 cm u redu (Stepanović *et al.*, 2009) zbog primene

standardne (nespecijalizovane) poljoprivredne mehanizacije: Ovim rasporedom se postiže 60000 – 72500 biljaka po hektaru.

Đubrenje

Potrebe arnike za hranivima u zemljištu su prilično male (Prommersberger i Dapper, 1995; Bomme, 1991). Na zemljištima koja su prebogata hranivima arnika može reagovati lisnim ožegotinama ili čak uginućem (Dachler i Pelzmann, 1999). Uprkos ovoj tvrdnji, višegodišnji ogledi u Južnom Tirolu pokazuju da arnika pozitivno reaguje na dodatnu ishranu dajući pri tom veću rozetu, višlje i razgranatije biljke sa većim brojem cvetnih glavica (Seeber *et al.*, 1997). Ishranu u kulturi arnike treba prilagoditi postojećem potencijalu hraniva, tako da primenu đubrenja treba uraditi tek posle izvršene analize zemljišta (Marquard i Kroth, 2001). Bomme i saradnici (1995) savetuju primenu đubriva neposredno pred sadnju u količini 150 kg N/ha, 70-84 kg P₂O₅/ha i 100-240 K₂O/ha. Stepanović i saradnici (2009), ukazuju da fosfor pospešuje cvetanje, a da je njegova pristupačnost na jako kiselim zemljištima otežana, tako da posebnu pažnju treba posvetiti đubrenju ovim elementom.

Budući da kalcijum u zemljištu može prouzrokovati hlorozu arnike (Bomme *et al.*, 1995), smanjeni porast i oslabljeno usvajanje fosfora i magnezijuma (Jenelten i Feller, 1992), izbegavaju se đubriva koja u sebi sadrže kalcijum, kao i zemljišta koja ovaj element sadrže više od 1,5% (Bomme, 1999).

Bolesti i štetočine

Na neodgovarajućim zemljištima (alkalna i neutralna) učestala je pojava hloroze (Dachler i Pelzmann, 1999). Pojava mušice *Tephritis arnicæ* L. (Slika 11) može da nanese velike štete, obzirom da ovaj insekt polaže jaja u cvetni pupoljak, u ranoj fazi, tako da larve pojedju veliki deo cvetne glavice prilikom otvaranja cvetova (Marquard i Kroth, 2001)



Slika 11. Pojava larve mušice *Tephritis arnicae* L. na cvetnoj glavici arnike (preuzeto sa fr.wikipedia.org)

Od gljivičnih obolenja prisutne su *Phyllosticta arnicae*, koja izaziva venuće arnike, i *Sphaerotheca humuli* var. *fuliginea*, koja izaziva pepelnicu (Dachler i Pelzmann, 1999).

Nega

Od mera nege u kulturi arnike, najznačajnija je svakako borba protiv korova (Stepanović *et al.*, 2009), budući da za nju trenutno ne postoje registrovana zaštitna sredstva (Krushe i Kusterer, 2010). Savetuje se regularna međuredna obrada motičastim ili rotacionim kultivatorima radi provazdušenja zemljišta i uklanjanja korovske flore (Prommersberger i Dapper, 1995) sa posebnom pažnjom na izbegavanje povređivanja podzemnih i nadzemnih delova kulture (Bomme *et al.*, 1995).

U sušnim prilikama i prilikom zasnivanja plataže poželjno je umereno navodnjavanje (Marquard i Kroth, 2001). Stepanović i saradnici (2009) takođe predlažu i prihranu azotom u sredini vegetacije u dozi 27 – 40 kg N/ha.

Upotreba zaštitnih sredstava u kulturi arnike je moguća ukoliko naručilac sirovine propiše kritične maksimalne vrednosti rezidua aktivne materije upotrebljenog sredstva (Prommersberger i Dapper, 1995).

Žetva i prinosi

Berba cvetnih glavica arnike počinje u drugoj godini i obavlja se ručno ukoliko ne postoje specijalizovani berači (Marquard i Kroth, 2001). Optimalan trenutak žetve cvetnih glavica je kada je cvetna stabljika potpuno razvijena, kunučni listići i jezičasti cvetovi potpuno otvoreni, a trubasti cvetovi otvoreni od polovine do punog diska (Douglas *et al.*, 2004). U našim klimatskim uslovima cvetna glavica se bere od sredine maja do kraja juna, ali, zavisno od nadmorske visine, ovaj rok može biti pomeren (Stepanović *et al.*, 2009). Berba se obavlja višekratno na svaka 4 - 7 dana, zavisno od intenziteta cvetanja (Prommersberger i Dapper, 1995; Bomme, 1991). Zavisno od lokacije i pristupačnosti, za branje jednog kilograma svežih cvetnih glavica potrebno je oko 26 minuta (Bomme, 1991). Berbe bi trebalo obavljati po suvom vremenu u podnevnim časovima kada je nivo aktivnih materija najviši (Prommersberger i Dapper, 1995).

Koren se vadi nakon tri ili četiri godine kultivacije u oktobru ili novembru, vibracionom vadilicom za krompir (Prommersberger i Dapper, 1995; Bomme, 1991).

Prinosi suve cvetne glavice se po većini autora kreću između 300 – 700 (1000) kg/ha (Bomme, 1991; Dachler und Pelzmann, 1999; Muñoz, 1987; Stepanović *et al.*, 2009). Prinosi korena se kreću od 500 – 1000 kg/ha (Dachler i Pelzmann, 1999) do 700 – 2300 kg/ha (Bomme, 1999), opet u zavisnosti od gustine biljaka na parceli.

Arnika se može brati od druge do četvrte godine, a nakon toga prinosi opadaju (Bomme, 1999; Stepanović *et al.*, 2009).

Sušenje

Cvetna glavica se suši u sušarama odmah nakon branja na temperaturi od 40° C (Prommersberger i Dapper, 1995; Bomme, 1991). Manje količine se mogu prirodno sušiti u tankom sloju na zasenjenom i provetrenom mestu (Bomme, 1991). Odnos mase sveže i suve cvetne glavice je 4-5:1, a korena 3:1 (Dachler i Pelzmann, 1999). Koren je manje osetljiv i može se sušiti, opran i uzdužno isečen, na 50° C (Marquard i Kroth, 2001).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Za sirovinom cvetne glavice arnike (*Arnica montana*) postoji rastuća međunarodna tražnja obzirom da je neophodan sastojak mnogih masti i gelova koji se koriste u proizvodima za medicinsku, fizioterapeutsku i sportsku masažu, kako i u sve većem broju preparata namenjenih za ličnu kozmetiku. Većina svetske proizvodnje osušenog cveta arnike još uvek zavisi od samoniklih resursa. Prirodne populacije arnike su ugrožene zahvaljujući gubitku staništa, promenama u ekološkim uslovima i prevelikoj eksploataciji za medicinske svrhe, pa su u većini evropskih zemalja uvedene specijalne mere zaštite ove biljne vrste. Kako potreba za arnikom na svetskom tržištu nastavlja raste, gajenje ove biljne vrste dobija na značaju kao održivi izvor kvalitetne biljne sirovine. Budući da Srbija ima reputaciju izvoznika velikih količina visokokvalitetnih „industrijom nezagađenih“ lekovitih biljnih sirovina u zemlje Evropske Unije, a da su područja planinskih livada i pašnjaka nedovoljno iskorišćena, gajenje arnike bi moglo da pruži alternativni izvor prihoda seoskim domaćinstvima na većim nadmorskim visinama.

Cilj ovog rada je bio da se proučavanjem morfoloških, proizvodnih i hemijskih osobina pod uticajem tri indukovana faktora (vreme sadnje, vrsta sadnica i vrsta đubrenja) **iznađe optimalan model gajenja arnike** u agroekološkim uslovima planinskog regiona Srbije. Poseban akcenat u toku istraživanja je stavljen na proučavanje jačine odnosa između pojedinih posmatranih osobina radi **boljeg razumevanja biologije formiranja prinosa cvetnih glavica**. Pored prinosa cvetne glavice, kao sporedni proizvodi, proučavani su i podzemni organi arnike (rizom i koren) koji sadrže velike količine etarskog ulja u kojima su dominantno zastupljena aromatična jedinjenja.

Jedan od ciljeva istraživanja je bio da se mikroskopskim snimanjem samlevenog biljnog materijala pod različitim uveličanjima i tehnikom tankoslojne hromatografije ustanovi **jednostavna procedura identifikacije cveta arnike** u odnosu na dva pretpostavljena falsifikata. Takođe je proučavana mikrostruktura skladišnih kanala i mehanizam ekskrecije etarskih ulja u podzemnim organima. Važna grupa ciljeva u ovom radu bila je **hemijska karakterizacija droga arnike** (cvetnih glavica, rizoma i korena), dobijenih od biljaka gajenih u agroekološkim uslovima planinskog regiona zapadne Srbije, gde je pored kvantifikacije najvažnijih grupa sekundarnih metabolita po prvi put na sirovini iz ovog regiona izvršena identifikacija jedinjenja seskviterpenskih

kompleksa i dominantnih fenolnih jedinjenja, dok je na podzemnim organima po prvi put po prvi put izvršena detaljna razdvojena karakterizacija etarskog ulja rizoma i korena.

U cilju doprinosa već poznatim aktivnostima aktivnih materija arnike, izvršeno je uporedno testiranje **antioksidativne i antimikrobne aktivnosti** ekstrakata cvetne glavice i etarskih ulja podzemnih organa.

4. RADNE HIPOTEZE

U ovom istraživanju pošlo se od sledećih pretpostavki:

- Da će različiti uslovi gajenja arnike usloviti razlike u odgovarajućim morfološkim parametrima i prinosu sirovina.
- Da će posmatrane osobine arnike biti međusobno zavisne.
- Da će različiti uslovi gajenja imati uticaja na pojavu razlika u hemijskom sastavu sirovine, odnosno hemijskim profilima biljnih droga arnike (cvetne glavice, rizom, koren).
- Da će uzorci iz viših faza prerade biljnih sirovina (ekstrakti cvetnih glavica i etarsko ulje rizoma i korena), različitog hemijskog sastava, ispoljiti različite biološke aktivnosti *in vitro*, tj. imati različitu antimikrobnu i/ili antioksidativnu aktivnost.

U cilju testiranja radnih hipoteza, razvijene su i testirane odgovarajuće nulte hipoteze za svaki posmatrani parametar po svakom indukovanom faktoru.

5. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

5.1. Materijal

5.1.1. Biljni materijal

Za zasnivanje ogleda korišćeno je seme arnike sorte 'ARBO', trenutno jedine priznate sorte ove vrste, koje je nabavljeno posredstvom semenske razmene iz Centra za poljoprivredna istraživanja u Finskoj (Beratalan Galambosi, MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen).

5.1.2. Đubriva

Stajsko đubrivo – zgoreli goveđi stajnjak (u daljem tekstu – stajnjak) je nabavljano u dva navrata (proleće i jesen) od lokalnog proizvođača sa Kaluđerskih Bara, a pregled fizičko-hemijske analize te dve partije je dat je u Tabeli 8. Specifična gustina stajanjaka bila je 0.8 kg/dm³.

Tabela 8. Pregled fizičko-hemijskih osobina stajnjaka kojim je đubren ogled

Karakteristika	Proleće	Jesen	
pH	8.79	8.81	
Vlaga (%)	75.20	79.10	
Suva materija (%)	24.80	20.90	
Organska materija (% na svežu masu)	17.98	15.40	
Mineralne materije (% na svežu masu)	6.82	5.50	
Organska materija (% na suhu masu)	72.50	73.60	
Organski ugljenik (% na suhu masu)	36.25	36.80	
Mineralne materije (% na suhu masu)	27.50	26.40	
C/N	16.55	9.92	
Sadržaj soli (% na svežu masu)	0.15	0.50	
Ukupni N (% na suhu masu)	2.19	2.68	
Ukupni N (% na svežu masu)	0.54	0.56	
AL-pristupačni	P ₂ O ₅ (mg/100 g	744	265
	K ₂ O (sveže mase)	240	500

Kao mineralno đubrivo korišćeno je kompleksno NPK đubrivo formulacije 15:15:15 (HIP-Azotara, Pančevo).

5.2. Metode

5.2.1. Poljski ogled

Eksperimentalna lokacija

Mesto na kome je postavljena ogledna plantaža arnike se nalazi u regionu Zapadne Srbije na planini Tara u okviru rasadnika Nacionalnog parka „Tara“ na lokalitetu Kaluđerske bare (43°53'44.17"N 19°33'11.62"E, 1008 m.n.v.) (Slika 12).



Slika 12. Lokalitet ogleda

Zemljište je distrično-smeđe blago kisele reakcije formirano na serpentinu (Radanovic *et al.*, 2007). Uzimanje uzoraka zemljišta za analizu je rađeno pre đubrenja, pri čemu su deset nezavisnih uzoraka po bloku đubrenja spajani u jedan reprezentativni za analizu.

Agrohemijska analiza zemljišta je obuhvatila:

1. Reakciju zemljišta (pH) – po potenciometrijskoj metodi
2. Sadržaj humusa – metodom Turina modifikovanom po Simakovoj

3. Ukupni azot (%N) – metoda po Kjeldahl-u
4. Lakopristupačni azot (NH_4^+ , NO_3^-) – metodom modifikovanom po Bremner-u
5. Lakopristupačni fosfor i kalijum – Al-metodom po Egner-Riehm-u

Za analizu zemljišta korišćene su standardne metode (Džamić *et al.*, 1996). Agrohemijske analize zemljišta odrađene su u laboratoriji za fiziologiju i agrohemiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Rezultati analiza pH reakcije i hraniva u zemljištu data je u Tabeli 6.

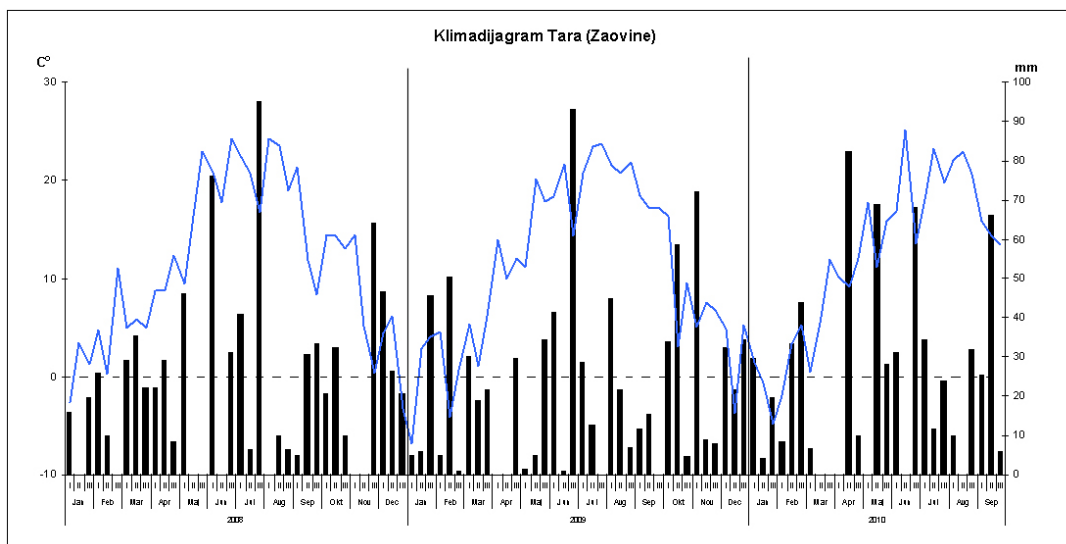
Tabela 6. pH reakcija i potencijal plodnosti zemljišta ogledne parcele

Varijanta đubrenja*	pH		Humus %	Ukupni N %	NH ₄ mg/kg	NO ₃ mg/kg	Al-P ₂ O ₅ mg/100g	Al-K ₂ O mg/100g
	H ₂ O	nKCL						
PO	6.35	4.95						
PM	6.42	5.27						
PK	6.54	5.34	4.2	0.21	6.7	20.1	20	26.4
JO	6.41	5.17						
JM	6.17	4.18						
JK	6.53	5.20						

* P -prolećno zasnivanje, J -jesenje zasnivanje, O - stajnjak, M -mineralno đubrivo, K - kontrola

Klimatske karakteristike

Na Grafiku 1. prikazan je klimadijagram po Walter-u (Walter *et al.*, 1975) za lokalitet Zaovine, koji je udaljen oko 25 km od lokaliteta Kaluđerske Bare gde je ogled postavljen. Obzirom da se meteorološka stanica nalazi na istoj planini i na približno istoj nadmorskoj visini (ca. 900 m), smatrali smo da klimatski podaci dobijeni iz ovog izvora verno prezentuju variranje u temperaturi i količini padavina na samom ogledu.



Grafik 1. Klimadijagram po Walteru za lokalitet Zaovine

Pregled maksimalnih, minimalnih i prosečnih godišnjih temperatura dat je u Tabeli 7, zajedno sa prosečnim temperaturama u vegetaciji (mart – septembar) i sumom godišnjih padavina.

Tabela 7. Temperaturni proseci, ekstremi i sume padavina na lokalitetu Zaovine periodu 2008-2010

	Temperatura			Padavine	Prosečna T u vegetaciji (mart - sept.)
	Prosek	Min	Max	Σ	
Godina	°C	°C	°C	mm	°C
2008	11.44	-7.33	28.00	819	15.46
2009	10.92	-6.83	23.78	806	16.06
2010	10.54	-9.33	26.33	936	15.25

5.2.1.1. Proizvodnja sadnica

Proizvodnja sadnica iz semena

Seme je sejano u pikir sanduke 400 x 250 x 80 mm, a pikiranje je vršeno u kontejnere dimenzija 494 x 274 x 40 mm sa 66 ćelija. Kao setveni supstrat korišćen je treset Floradur B fine (Floragard, Nemačka), a kao supstrat za pikiranje korišćen je Floradur B Grossier + Argile (Floragard, Nemačka).

Postupak proizvodnje sadnica arnike traje oko 3 meseca, a započinje setvom semena u pikir sanduke. Seje se prirodno seme, doručeno prema uobičajenoj semenarskoj proceduri klijavosti oko 80%. Težina 1000 semenki arnike se kreće od 0.9 do 1.3 g. Setva je obavljena omaške u pikir sanduke napunjene komercijalnim setvenim supstratom, a seme prekriveno tankim slojem supstrata (oko 3 mm). U našim temperaturnim uslovima za klijanje (oko 15 – 25°C) arnika je nikla u roku od 7 – 10 dana (Slika 13).



Slika 13. Klijanje arnike



Slika 14. Faza pred pikiranjem

Do pikiranja, od mera nege, održavana je samo optimalna vlažnost supstrata. Pikiranje je obavljeno kada je biljka dostigla fazu početka formiranja trećeg pravog lista (otprilike mesec dana od nicanja) (Slika 14).

Pikiranje je obavljeno u kontejnere za proizvodnju rasada napunjene komercijalnim supstratom za pikiranje (Slike 15 i 16).



Slika 15. Ispikirani kontejner



Slika 16. Faza pred sadnju

Zapremina pojedinačne ćelije u kontejneru je bila 50 ml. Nakon pikiranja i punog porasta trećeg pravog lista (otrilike 15 dana nakon pikiranja), sve do sadnje, pored redovnog oržavanja vlage supstrata, i zasene po potrebi, u vremenskom razmaku od 10 dana primenjivana je prihrana kompleksnim tečnim NPK hranivom (Wuxal, Chemical Agrosava) (formulacije 8:8:6) u 0.3% razblaženju. Nakon faze formiranja punog četvrtog pravog lista, rasad je prenešen na kaljenje, u planinski mikroklimat, na lokalitet ogleda, bez direktne insolacije. Nakon nedelju dana kaljenja, čim su se ukazale povoljne vremenske prilike, rasad je posađen (Slike 17 i 18).



Slika 17. Sadnica arnike

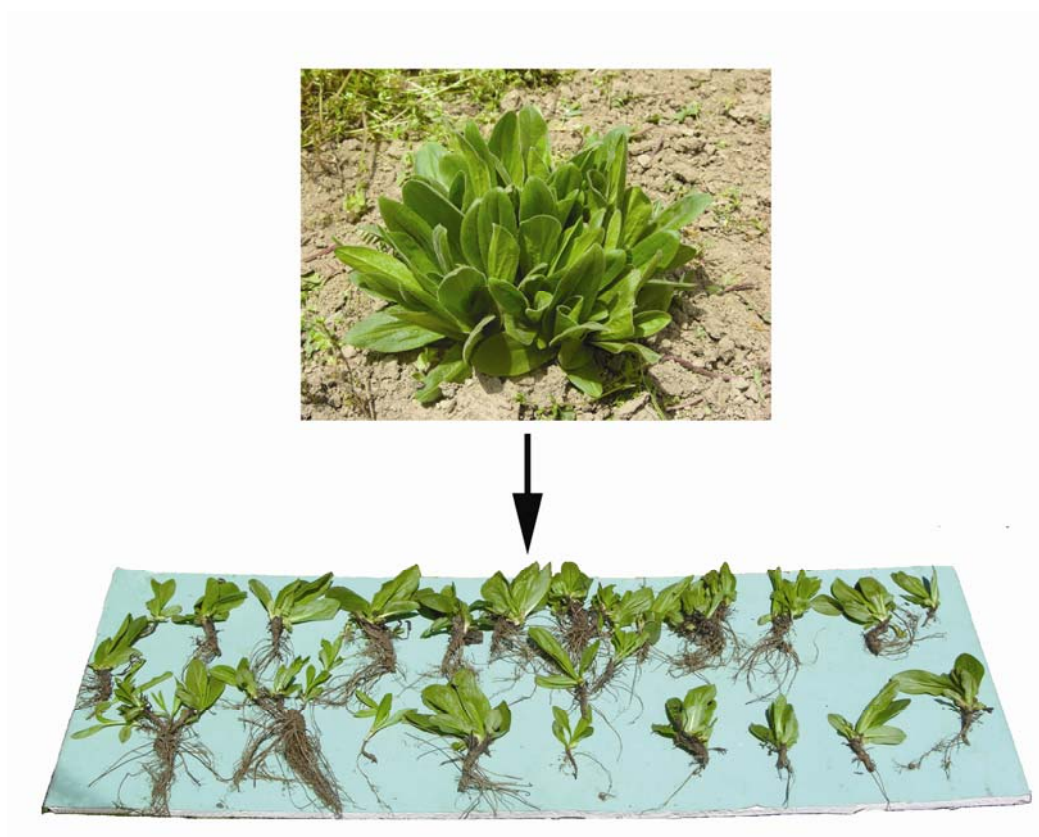


Slika 18. Sadnja arnike

Sadnice za prolećnu sadnju su proizvedene u stakleniku, dok su sadnice za jesenju sadnju proizvedene na otvorenom uz prisustvo jutarnje direktne insolacije do 11h i zasenom u drugom delu dana.

Proizvodnja sadnica deljenjem bokora

Sadnice za vegetativnu propagaciju su dobijane deobom bokora biljaka arnike istog semenskog porekla (sorta 'ARBO') iz prethodnih poljskih ogleda gajenja na istom lokalitetu od biljaka koje su ušle u treću vegetaciju. Sadnice su i za prolećni i za jesenji rok vađene i odvajane neposredno pre sadnje. Sadnice dobijene deobom bokora predstavljene su na Slici 19.



Slika 19. Sadnice dobijene deljenjem bokora na sekundarne rozete sa pripadajućim rizomom i korenom

5.2.1.2. Postavka i održavanje ogleda

Ogled gajenja arnike je postavljen u 2x3x2 Split-plot eksperimentalnom dizajnu. Šematski prikaz ogleda (jednog plotu sadnje) dat je u Prilogu 1. Ispitivan je uticaj tri indukovana faktora:

1. Vreme sadnje – prolećni i jesenji rok zasnivanja
2. Vrsta đubriva – stajnjak, NPK i kontrola
3. Vrsta sadnica – sadnice proizvedene iz semena (generativne) i proizvedene deljenjem bokora (vegetativne ili klonske)

Prolećna sadnja obavljena je 12. maja 2008. godine (Slika 20), a jesenja sadnja 10. oktobra 2008. godine. Ova dva roka se razlikuju 151 dan u vremenu sadnje.



Slika 20. Postavka ogleda na lokalitetu Kaluđerske bare, Tara

Đubrivo je unešeno u zemljište freziranjem neposredno pred sadnju i to u količini:

1. Stajnjak - 100 m³/ha
2. NPK – 2 t/ha

Površina ogleda je podeljena na dva osnovna plotova po vremenu sadnje: prolećni i jesenji, a na svakom plotu su razdvojena tri sub-plota po tipu đubrenja: stajsko đubrivo, mineralno đubrivo i kontrola. U svakom sub-plotu su se nalazile osam parcelica koje su predstavljale po četiri ponavljanja dva tipa sadnica: iz semena i deobom bokora. Sve biljke su bile posađene u rasporedu 20x70 cm, a svaka parcelica je sadržala 72 biljke. Prostorni razmak između osnovnih plotova je bio 2 m, između sub-plotova 1.5 m, a između parcelica 1 m. Ukupna površina ogleda bila je 680 m², površina osnovnih plotova 340 m², površina sub-plotova 100 m² i površina parcelica 8,4 m². Šematski prikaz jednog plotova sadnje ogleda predstavljen je u Prilogu 1.

Od mera nege primenjivano je zalivanje nakon sadnje i redovno okopavanje.

5.2.2. Testirane karakteristike

5.2.2.1. Morfološki parametri

Svi morfološki parametri, osim broja sekundarnih rozeta, mereni su, odnosno brojani, neposredno pred početak branja cvetnih glavica. Za prolećni deo ogleda

prikupljeni su podaci za 2009. i 2010. godinu, a za jesenji deo ogleda samo za 2010. godinu. Merenja su vršena metrom, a brojanja ručno. Brojanje sekundarnih rozeta je vršeno zajedno sa vađenjem korena i za oba roka sadnje su prikupljeni podaci za 2009. i 2010. godinu.

Prečnik rozete [cm]

Za vrednost parametra prečnika rozete meren je maksimalni prečnik listova rozete (Slika 21A).



Slika 21. Način merenja prečnika rozete (A) i visine cvetnog izdanka (B)

Visina cvetnog izdanka [cm]

Visina cvetnog izdanka je merena metrom od površine zemlje do terminalne cvetne glavice (Slika 21B).

Broj cvetnih izdanaka

Izolovane cvetne stabljike, koje vode poreklo iz iste rozete, brojane su ručno.

Broj cvetnih glavica

Broj cvetnih glavica po biljci je naknadno izračunati parametar koji predstavlja odnos ukupno ubranih cvetnih glavica po parcelici i broja biljaka cvetalih na parcelici.

Prečnik cvetne glavice [cm]

Parametar prečnik cvetne glavice je meren lenjirom na terminalnoj cvasti neposredno pred prvu žetvu i predstavlja maksimalno rastojanje najudaljenijih tačaka dva naspramna jezičasta cveta.

Broj sekundarnih rozeta

Brojanje sekundarnih rozeta je rađeno zajedno sa vađenjem podzemnih organa arnike. Jedino na taj način je bilo moguće prebrojati novonastale rozete koje se na matičnoj biljci nalaze u veoma gustom sklopu.

5.2.2.2. Prinosi

Prinos cvetnih glavica [kg/ha]

Berbe cvetnih glavica su obavljane ručno, a brane su samo one cvetne glavice čiji su cevasti cvetovi bili potpuno otvoreni. Berbe su vršene periodično u razmaku od oko 5 dana, koliko je otprilike potrebno da se cvetne glavice nižeg sprata u potpunosti razviju. Cvetne glavice sa jedne parcelice su prebrojavane u toku branja, skladištene u kartonske kese kao posebne partije i razdvojeno sušene. Sušenje ubranih cvetnih glavica je organizovano na sušarskim lesama i zasenjenoj promajnoj prostoriji (Prilog 4 C i D). Temperatura u prostoriji nije prelazila 30°C. Nakon sušenja (vlaga < 10%) cvetne glavice su merene na laboratorijskoj vagi, a prinosi preračunavani na kg/ha.

Prinos rizoma i korena [kg/ha]

Podzemni organi arnike su vađeni na kraju vegetacionog perioda (kraj oktobra). Operacija vađenja je vršena ašovom, a izvađene biljke oprane pod jakim mlazom vode i ostavljene na sušenje u tankom sloju na zasenjenom promajnom mestu. Nakon sušenja, baštenskim makazama je odstranjivana rozeta od podzemnih delova, a koren odvajan od rizoma ručnim krunjenjem. Prinosi po ponavljanjima su mereni na laboratorijskoj vagi i preračunavani na kg/ha.

Prinos etarskog ulja rizoma i korena [% m/m]

Priprema uzoraka za destilaciju etarskog ulja je bazirana na vazdušno suvom biljnom materijalu. Samleveni uzorak se stavlja u balon za destilaciju i destiliše pomoću Klevendžer tipa aparata prema proceduri Jugoslovenske Farmakopeje (Ph Yug IV, 1984). Procenat prinosa (%) ulja u uzorku izračunat je na bazi apsolutno suvog uzorka. Ovaj parametar nije meren u ponavljanjima zbog nedostatka biljnog materijala.

5.2.2.3. Mikroskopska i hromatografska karakterizacija droga

Mikroskopska analiza praškova i preseka podzemnih organa rađena je na lupi LEICA XTL 3400D i mikroskopu LEICA DCML opremljenim digitalnom kamerom i pratećim softverom IM1000.

Kao reagens za identifikaciju cveta arnike upotrebljen je Opšti reaktiv čiji je sastav dat u Tabeli 10., a pregled upotrebljenih reagenasa za histohehemijske analize podzemnih organa dat je u Prilogu 2.

Tabela 10. Sadržaj Opšteg reaktiva

Reagens	Predmet bojenja	Boja
Anilin-sulfat	odrveneli elementi – traheje, traheide, mehanička vlakna, sklerenhimske ćelije	zlatnožuto
Feri-amonijum-sulfat	tanini	plavocrno ili zeleno
Sudan III	masna i etarska ulja, smole, suberin, kutin, vosak	crveno
Jod	skrob	plavoljubičasto

Tankoslojna hromatografija

Priprema uzorka

Suve cvetne glavice biljnog materijala (*Arnica montana*, *Calendula officinalis*, *Doronicum columnae*) su samlevene, precizno izmerene (1.0 g) i ekstrahovane sa 10 ml metanola na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 min. Ekstrakti su nakon hlađenja filtrirani. Smešu standarda je činio rastvor kafene kiseline (2 mg), hlorogenske kiseline (2 mg) i rutina (5 mg) u 30 ml metanola. Standard izokvercicina je zasebno rastvoren u metanolu u koncentraciji 1 mg/ml.

HPTLC uslovi

HPTLC analiza urađena je u skladu s metodom opisanom ranije, uz manje izmene (Wagner *et al.*, 1984). Camag HPTLC aparat opremljen Linomat 5 aplikatorom uzorka, automatskom komorom za razvijanje ADC2, TLC Scanner 3 jedinicom i trans-iluminatorom Reprostar 3 je korišćen za analizu. Uzorci ekstrakata biljnih droga (2 µl), smeša standarda (3 µl) i izokvercitin (3 µl) naneti su na HPTLC ploču (20 × 10 cm silikagel 60, 0.25 mm debljina sloja, proizvođač Merck) u širini traka od 12 mm. Ploča je razvijana u mobilnoj fazi etil acetat-voda-mravljja kiselina-sirćetna kiselina (100:27:11:11, v/v) u zasićenoj komori. Nakon razvijanja, ploča je osušena 10 min na 120°C. Nakon sušenja, izvršena je derivatizacija hromatograma prskanjem prirodnim reaktivom (NP/PEG). Ploča je zatim posmatrana pod UV-lampom na talasnoj dužini 365 nm. Fotografisanje ploče vršeno je u trans-iluminatoru Reprostar 3 opremljenim softverski kontrolisanim digitalnim foto-aparatom.

Lokalizacija etarskog ulja u rizomu i korenu

Svetlosna mikroskopija

Za opšta histološka zapažanja uzeti su uzorci rizoma i korena sa biljaka sa kraja druge godine gajenja. Preparati nastali parafinskim rezovima (5-10 μ m) su obojeni pomoću alcian plave i safranina (1% u 50 posto etanola). Polu-tanki preseci (0.9-1.0 μ m debljine) su obojeni pomoću 0,25% toluidinskim plavim O u vodi (Ruzin, 1999). Analiza prikaza sprovedena korištenjem LEICA DCML mikroskopa opremljenog digitalnom kamerom i softverom IM1000.

Histohemijska analiza

Rizom i koren arnike (25 mm i 5 mm u prečniku, respektivno) secirani su ručno poprečno. Sva histohemijska ispitivanja obavljena su upotrebom svežeg biljnog materijala. Urađene su sledeće histohemijske reakcije: Phloroglucinol-HCl za lignin, (Jensen, 1962), Ruthenium crvena za pektine (Johansen, 1940), Lugol za skrob (Johansen, 1940), Fuchsin kiselina za proteine (Peterson i sur, 2008.), Sudan III i Sudan crna B za lipide (Johansen, 1940; Lison, 1960), Gvožđe-trihlorid za fenolna jedinjenja (Johansen 1940), aluminijum-trihlorid za flavonoide (Guerin i sur., 1971), hloridni vanilin (Mace i Howell, 1974), gvožđe-sulfat i gvožđe-hlorid (Clark, 1981; Johansen, 1940) za tanine, Wagner-ov reagens i Dittmar-ov reagens za alkaloidne (Furr i Mahlberg, 1981) i sumporna kiselina za seskviterpenske laktone (Geissmen i Griffin, 1971). Standardni kontrolni postupci u svim testovima su urađeni istovremeno. Pregled upotrebljenih reagenasa za histohemijske analize podzemnih organa *A. montana* dat je u Prilogu 2.

Fluorescentna mikroskopija

Za ispitivanja fluorescentne mikroskopije korišćen je epifluorescentni mikroskop (Leica DMLS opremljen HBO 50 W živinom lampom) i rasponom filter blokova (A: BP 340 - 380, I3: BP 450-490 i N2.1: BP 515-580). Nebojeni preseci su

promatrani pod UV (340-380 nm), kako bi se istražila prisutnost fenola koji su autofluorescirali na tim talasnim dužinama (Ruzin, 1999). Materijal je takođe bio tretiran s aluminijum trihloridom za ispitivanje prisustva flavonoida (Guerin i sur., 1971).

Elektronska mikroskopija - skenirajuća (SEM) i transmisiona (TEM)

Da bi se istražila ultrastruktura sekretornog tkiva, primenjene su tehnike SEM i TEM. Na SEM su uzorci su osušeni obloženi zlatom u BAL-TEC ISS 005 Sputter Coater u periodu od 100 sekundi na 30mA, a korišćen je JEOL JSM-6460 LV elektronski mikroskop sa ubrzanjem napona od 15 kV.

Uzorci za TEM istraživanja su fiksirani u 2% glutar-aldehidu u cacodylate puferu u periodu od 24 sata na 4°C, nakon čega su isprani cacodylate puferu, post-fiksirani u osmijum-tetroksidu (1%, 0,1 M cacodylate pufer, pH 7.4), kontrastovani sa olovo-citratom i uranil acetatom, dehidrirani serijom etanolnih razblaženja i konačno infiltrirani i ugrađeni u epoksidne smole (EPON 812 sa DDSA i MNA). Nakon polimerizacije na 60°C, izrezani su preseki debljine 60 nm korišćenjem LEICA Ultracut-UCT ultramicrotome i staklenog noža. Uzorci su pregledavani pod MORGANI 268 transmisionim elektronskim mikroskopom na 100 kV.

5.2.2.4. Hemijska analiza droga

Određivanje sadržaja ukupnih seskviterpenskih laktona [mg/g]

Analitička ekstrakcija

Ekstrakcija seskviterpenskih laktona iz cveta arnike za kvanitativnu i kvalitativnu analizu je rađena po modifikovanoj metodi Douglas i sar. (2004). Samleveni biljni materijal (1 g) je prelišen sa CHCl₃ (20 mL) čemu je dodat interni standard (1 mg Santonin) i postavljen na ultrazvučno kupatilo (5 min, 50 Hz). Rastvor je profiltriran, ispran (3x2 mL CHCl₃), uparen do suvog (na 35°C, vakuum uparivač), ekstrakt je rastvoren u MeOH (2 mL) i nanesen na kolonu oktadecilsilan silika gel,

reverzna faza (BAKERBOND SPE, 6 mL zapremina, 1000 mg punjenje, 40 μm veličina čestice, 60 Å), prethodno nakvašenu smešom rastvarača MeOH:H₂O (3:2, 3 mL). Kolona je puštena da se ocedi do suvog, a kombinovani ocedak se hladio na -20°C (30 min), filtrirao (Phenex 13 mm 0.45 μm PTFE) i tako dobijeni rastvor se aplikovao na HPLC i LC/MS.

HPLC analiza

Određivanje sadržaja ukupnih seskviterpenskih laktona u biljnom materijalu *A. montana* je izvedena po metodi propisanoj u farmakopeji (Ph. Eur. 6.0), a analiza se obavljala na tečnom hromatografu Hewlett-Packard HP 1090. Injekciona zapremina uzorka je 20 μl . Protok kroz kolonu je bio 1.2 ml/min, a UV detekcija na 225 nm.

Kolona: Superspher 100 RP-18 LiChroCART 125-4

dimenzije: l = 120 mm, \varnothing = 4 mm;

stacionarna faza: oktadecilsilik silika gel za hromatografiju R (4 μm)

Mobine faze:

- mobilna faza A: voda (H₂O)
- mobilna faza B: metanol (MeOH)

Vreme (min)	Mobilna faza A (procenat V/V)	Mobilna faza B (procenat V/V)
0 – 3	62	38
3 – 20	62 → 55	38 → 45
20 – 30	55	45
30 – 55	55 → 45	45 → 55
55 – 57	45 → 0	55 → 100
57 – 70	0	100
70 - 90	62	38

Proračun procenta sadržaja ukupnih seskviterpenskih laktona, izraženih preko dihidrohelenalin tiglata (DHHT) vrši se po sledećoj formuli:

$$\frac{S_{LS} \times C \times V \times 1.187 \times 100}{Ss \times m \times 1000}$$

- S_{LS} = površina svih pikova koji po spektru referišu kao seskviterpenski laktoni, a na hromatogramu ispitivanog uzorka se pojavljuju posle pika internog standarda (santonin)
- Ss = površina pika internog standarda (santonin) u ispitivanom uzorku
- m = masa ispitivanog uzorka, u gramima [g]
- C = koncentracija santonina u rastvoru internog standarda korošćenog u ispitivanju uzorka, u miligramima po mililitru [mg/ml]
- V = zapremina rastvora internog standarda korišćenog u ispitivanju uzorka, u mililitrima [ml]
- 1.187 = korelacioni faktor između pikova dihidrohelenalin tiglata i santonina

Sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona se izračunava preko odnosa površine internog standarda i površina ostalih pikova koji po retencionom vremenu izlaze posle pika standarda, a koji svojim spektrom odgovaraju seskviterpenskim laktonima.

LC-MS analiza seskviterpenskih laktona

LC/MS analiza je izvršena na Agilent MSD TOF aparatu, povezanim sa Agilent 1200 series HPLC koristeći istu kolonu, mobilne faze, protok eluiranja i gradijentni program kao i kod analitičkog HPLC-a. Napon fragmentora je bio 140V, a opseg spektralnog snimanja 225 nm. Maseni spektri su dobijeni na Agilent Esi-MSD TOF uređaju. Injekciona zapremina je bila 5 μ l. Protok sušecćeg gasa (N₂) je bio 10 l/min, pritisak raspršivača 45 psig, a temperatura sušecćeg gasa 350°C. Za elektrosprej jonizaciju (ESI), uslovi su bili sledeći: napon kapilare 4000 V, skimer 60 V, Oct RF V 250 V, opseg masa 100 do 1500 m/z .

Određivanje sadržaja fenolnih komponenti [mg/g]

Analitička ekstrakcija

Samlevenih 100 mg cveta je tri puta sonifikovan na UZ kupatilu sledećim redosledom:

1. u 5 mL MeOH/ (CH₃)₂CO/ H₂O (3/1/1, v/v/v) – 30 min
2. u 5 mL MeOH/ (CH₃)₂CO/ H₂O (3/1/1, v/v/v) – 30 min
3. u 5 mL MeOH/ H₂O (1/1, v/v) – 30 min

Između svake sonifikacije rastvor je profiltriran u normalni sud od 20 mL i na kraju ispran sa 20 mL MeOH/(CH₃)₂CO/H₂O (3/1/1, v/v/v). Sud je dopunjen do 20 mL sa smešom rastvarača MeOH/(CH₃)₂CO/H₂O (3/1/1, v/v/v). Odavde je izdvojeno 10 mL rastvora i upareno do suvog. Suvi ostatak je pokupljen sa 2 mL MeOH/(CH₃)₂CO/H₂O (3/1/1, v/v/v), koji je nakon filtracije aplikovan na HPLC.

HPLC analiza

Kvantifikacija dominantnih fenolnih komponenti izvršena je HPLC analizom po ranije opisanoj metodi (Spitaler *et al.*, 2006). Analize su rađene na Agilent 1200 aparatu opremljenim DAD detektorom, a primenjeni su sledeći parametri metode: kolona Phenomenex Synergi Hydro-Rp 80A 150 mm × 4.6 mm (4 μm veličina čestica); mobilna faza A, H₂O/HCOOH/CH₃COOH (99/0.9/0.1, v/v/v); faza B, MeCN/MeOH/HCOOH/CH₃COOH (89/10/0.9/0.1, v/v/v/v); protok, 1.00 ml min⁻¹; injekciona zapremina 10 μl; talasna dužina detekcije 350 nm; temperatura kolone, sobna; linearni gradient, 0 min 5% B, 5 min 15% B, 20 min 16% B, 35 min 18% B, 45 min 19% B, 55 min 27.5% B, 60 min 65% B, 65 min 98% B, 70 min stop. Količine jedinjenja su određivane poređenjem površina pikova, dobijenih za pojedina fenolna jedinjenja, sa površinama pikova eksternih standarda kalibrisanih prethodno u različitim razblaženjima po istoj metodi.

Za formiranje kalibracionih kriva za kvantifikaciju flavonoida upotrebljena su razblaženja čistih jedinjenja dobijenih semipreparativnom HPLC tehnikom, dok je za formiranje kalibracione krive za hlorogensku kiselinu korišćen komercijalni HPLC standard (Sigma Aldrich, Nemačka).

LC/MS analiza fenolnog kompleksa

LC/MS analiza je izvršena na Agilent MSD TOF aparatu, povezanim sa Agilent 1200 series HPLC koristeći istu kolonu, mobilne faze, gradijentni program i protok eluiranja kao za HPLC analizu. Napon fragmentora bio je od 140V. Opseg spektralnog snimanja 190 – 550 nm. Maseni spektri su dobijeni na Agilent Esi-MSD TOF uređaju. Protok sušecog gasa (N₂) je bio 12 l/min, pritisak raspršivača 45 psig, temperatura sušecog gasa 350°C. Za elektrosprej jonizaciju (ESI), uslovi su bili sledeći: negativna jonska polarnost, napon kapilare 4000 V, skimer 60 V, Oct RF V 250 V, opseg masa 100 do 2500 *m/z*.

Ekstrakcija i izolovanje dominantnih fenolnih komponenti

Samleveni cvet biljke (5.0 g) je ekstrahovan tri puta sistemom rastvarača metanol/acetone/voda (3:1:1). Sirovi ekstrakt prečišćavan je hromatografijom na koloni silika gela (260 x 30 mm). Gradijentno eluiranje je započeto metilen-hloridom (95%), a polarnost eluensa povećavana je dodavanjem metanola (Tabela 11).

Tabela 11. Gradijentno eluiranje gravitacione hromatografije ekstrakta cveta arnike

Eluens	Procentni sadržaj	Zapremina frakcije [ml]
metilen hlorid-metanol	95:5	200
metilen hlorid-metanol	90:10	100
metilen hlorid-metanol	85:15	100
metilen hlorid-metanol	80:20	200
metilen hlorid-metanol	75:25	100
metilen hlorid-metanol	70:30	300
metilen hlorid-metanol	65:35	200
metilen hlorid-metanol	60:40	100
metilen hlorid-metanol-mravlja kis.	55:45	200
metilen hlorid-metanol-mravlja kis.	54:45:1	200
metilen hlorid-metanol-mravlja kis.	48:50:2	100
metilen hlorid-metanol-mravlja kis.	28:70:2	100
metanol-mravlja kis.	98:2	100
metanol-mravlja kis.	98:2	100

Sakupljeno je 90 frakcija koje su spajane na osnovu TLC analize. Spojene frakcije 83-90 su dalje prečišćavane na semipreparativnom HPLC odakle su izdvojena dva fenolna jedinjenja, kvercetin 3-*O*- β -D-glukozid i kempferol 3-*O*- β -D-glukozid, čija je identifikacija potvrđena NMR analizom. Dobijena čista jedinjenja su korišćena kao eksterni standardi u kvantifikaciji dominantnih fenolnih komponenti u cvetnoj glavici *A. montana*.

Semipreparativni HPLC

Izolovanje komponenti ekstrakta cveta arnike izvršeno je na Agilent 1200 aparatu opremljenim sa DAD model G1315B, binarnom pumpom G1312A, autosamplerom model G1313A i kolonom Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 250 x 9,4 mm). Mobilna faza A je bila 0.2% mravlja kiselina u vodi, a mobilna faza B acetonitril. Protok eluiranja je bio 4 mL/min sa gradijentnim programom (0-25 min 10-20% B, 25-30 min 20-30% B, 30-35 min 30-60% B, 35-37 min 60-100% B). UV-VIS detekcija je praćena na 254 nm, 280 nm i 320 nm. Injekciona zapremina je iznosila 50 μ L, a postupak hromatografisanja je ponovljen dvadeset puta. Izolovana su dva jedinjenja iz ekstrakta cveta *A. montana*: kvercetin 3-*O*- β -D-glukozid (2 mg) i kempferol 3-*O*- β -D-glukozid (1,5 mg).

NMR analiza

^1H i ^{13}C NMR spektri (500,13 MHz za ^1H) su snimani na Bruker Avance 500 spektrometru opremljenom sa 5 mm inverznom probom. Spektri su snimani na temperaturi od 298 K, u u deuterisanom metanolu (CD_3OD) kao rastvaraču. Hemijska pomeranja su data u δ skali u odnosu na tetrametilsilan kao interni standard. Za ^{13}C NMR spektroskopiju, korišćena je pulsna sekvenca „inverse gated decoupling“. Prikupljeno je 8000 skenova sa vremenom relaksacije 10s. Tris (2,4-pentadionato) hrom (III) (CrAcac) koncentracije 50 mM je korišćen kao relaksacioni reagens.

Hemijska analiza etarskih ulja rizoma i korena

GC-FID i GC-MS analiza

Kvalitativna i kvantitativna analiza sprovedena je pomoću GC-FID i GC-MS. U prvom slučaju korišćen je gasni hromatograf model HP-5890 Series II opremljen sa split-splitless injektorom, HP-5 kapilarne kolone (25 m x 0,32 mm, debljine 0,52 μm) i plamen-jonizujućim detektorom (FID). Kao gas nosač korišćen je vodonik (1 ml/min). Injektor je grejan na 250°C, detektor na 300°C, a temperatura kolone je linearno programirana od 40°C - 260°C (4°C/min). GC-MS analiza je sprovedena pod gotovo istim analitičkim uslovima, koristeći HP G 1800C Series II GCD analitički sistem, opremljen s HP-5MS kolonom (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Kao gas nosač korišćen je helijum. Linija za transfer (MSD) je grejana na 260°C. EI masenog spektra (70 eV) bio je podešen za skeniranje u modu m/z raspona 40-400. U svakom pojedinačnom slučaju analiziralo se 1 μL uzorka rastvorenog u etanolu (20 μl / 2 ml) ubrizganog u split modu (1:30). Identifikacija komponenti je izvedena poređenjem njihovih masenih spektara i retencionih indeksa sa spektrima dobijenih iz autentičnih uzoraka i/ili NIST/Wiley bibliotekama spektara, korišćenjem različitih vrsta pretrage (PBM/NIST/AMDIS) i dostupnim literaturnim podacima (Adams, 2007; Hochmuth, 2006). Procenat udela komponenti se izračunavao iz elektronskih merenja pomoću plamen-jonizujuće detekcije (FID; 250°C).

5.2.2.5. Biološki efekti

Odabir ekstrakata i ulja za testiranje bioloških aktivnosti

Za testiranje bioloških aktivnosti odabrani su ekstrakti cvetnih glavica arnike čiji je sadržaj sekundarnih metabolita (SL i fenolnih jedinjenja) kvantifikovan HPLC analizom i etarska ulja rizoma i korena čiji su hemijski profili okarakterisani GC i GC/MS analizom. Od svakog tipa ekstrakta izabrana su po dva: ekstrakt sa maksimalnim sadržajem i ekstrakt sa minimalnim sadržajem određene grupe jedinjenja. Tako su za testiranje bioloških aktivnosti seskviterpenskih laktona uzeti ekstrakti sa

maksimalnim i minimalnim sadržajem ukupnih seskviterpenskih laktona (SL max i SL min, respektivno). Na sličan način odabrani su i ekstrakti za biološke testove iz grupe fenolnih jedinjenja, gde su izdvojeni ekstrakt sa maksimalnom sumom i ekstrakt sa minimalnom sumom sadržaja tri kvantifikovana jedinjenja (hlorogenska kiselina, kvercetin-3-*O*-glikozid, kempferol-3-*O*-glikozid) (F max i F min, respektivno). Odabir etarskih ulja za antimikrobne testove vršen je na osnovu procenta aromatičnih jedinjenja u hemijskom sastavu, tako su i za rizom i za koren odabrani predstavnici sa maksimalnim sumom i minimalnom sumom sadržaja aromatičnih jedinjenja (AU max i AU min, respektivno).

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Za uzorke dobijene u procesu ekstrakcije seskviterpenskih laktona i flavonoida iz cveta arnike, koji su korišćeni za kvalitativnu i kvantitativnu analizu (sa najmanjim odnosno najvećim sadržajem ovih sekundarnih metabolita), ispitivana je sposobnost neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala po metodi Silve i sar. (2005). Ekstrakti (100 μ L) su pomešani sa 1400 μ L of 80 μ M metanolnog rastvora DPPH radikala i ostavljeno u mraku 20 min. Apsorbancija rastvora je zatim merena na 517 nm. Procenat neutralizacije DPPH radikala je izračunat korišćenjem sledeće formule:

$$I (\%) = [(A_k - A_a) / A_k] \times 100$$

gde je A_k apsorbancija negativne kontrole (koja umesto ispitivanih ekstrakata sadrži 100 μ l odgovarajućeg rastvarača), a A_a je apsorbancija uzoraka. Konstruisan je grafik zavisnosti procenta neutralizacije DPPH radikala od koncentracije ekstrakta. Koncentracije ekstrakata koje neutrališu 50% DPPH radikala (EC_{50} vrednosti) su zatim određene korišćenjem algoritma nelinearne regresije. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

Antiomikrobna aktivnost

Testirane su Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije zajedno sa jednim patogenim kvascem. U testu su korišćene sledeće bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Bacillus subtilis* (ATCC 10907), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Proteus mirabilis* (izolat), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13883), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Micrococcus flavus* (ATCC 14452) i gljivični patogen *Candida albicans* (ATCC 10231). Mikroorganizmi su nabavljeni iz Mikološke laboratorije, Odseka za biljnu fiziologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu.

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) određene su mikrodilucionom metodom prema uputstvima Nacionalnog odbora za kliničke laboratorijske standarde (NCCLS, 1997). Metanolni ekstrakti cvetnih glavica su primenjivani u izvornom obliku, a etarska ulja su razređivana u dimetil sulfoksidu (DMSO) u odnosu 1:1. Serijska razređenja su testirana u mikrotitarskim pločama (96 bunara). U svim testovima se samo poredila antimikrobna aktivnost između ekstrakata sa najvišom i najnižom koncentracijom određene grupe jedinjenja.

5.2.3. Statističke metode

Sva morfološka brojanja i merenja su rađena na po 10 slučajno izabranih biljaka po svakom ponavljanju kombinacije tretmana. Hemijske analize su rađene na reprezentativnom uzorku iz mase cvetnih glavica ubranih po parcelici. Sva merenja i analize, osim prinosa etarskih ulja su rađena u četiri ponavljanja. Podaci u tabelama i grafikonima su predstavljani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Uticaj pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na posmatrane osobine testiran je preko dvofaktorske i trofaktorske analize varijanse, čiji su rezultati predstavljeni tabelarno sa vrednostima verovatnoće prihvatanja nulte hipoteze. Statistička značajnost razlika između aritmetičkih sredina svih osnovnih skupova posmatranih kombinacija faktora za određeno svojstvo testirana je analizom varijanse sa pratećim *post-hoc* Dankanovim testom, gde su u graficima i tabelama različitim slovima označene statističke značajnosti testa na nivou $p < 0,05$. Značajnosti razlika između srednjih vrednosti plotova vremena zasnivanja i varijanti vrste sadnica utvrđene su Studentovim t-testom. Značajnosti razlika između blokova đubrenja za svaku posmatranu osobinu utvrđene su analizom

varijanse, a rezultati su prikazani na posebnom tipu grafika, gde su predstavljene aritmetičke sredine posmatranog svojstva sa rasponom intervala variranja od 95% pouzdanosti i pratećim verovatnoćama prihvatanja nulte hipoteze. Jačina veza između posmatranih parametara prikazivana je grafički ili tabelarno i okarakterisana Pirsonovim koeficijentima korelacije (r), sa pratećom statističkom značajnošću. Pored indukovanih faktora na ogledu praćen je i faktor vremena (starenja) koji nije planiran u eksperimentu, ali je *de facto* bio prisutan i u posmatranju višegodišnjih biljaka očekivano značajan kod svakog morfološkog parametra ponaosob. Proučavanjem faktora starenja u ovom radu nije se pretendovalo da se odgovori na uticaj faktora godine, pošto je od ranije poznato da se razlike između aritmetičkih sredina merenih svojstava na višešegodišnjim biljkama u dve uzastopne godine ne mogu smatrati nezavisnim (Hadživuković, 1991; Fernandez, 2007), već da se okarakteriše trend razvića biljaka i akumulacije sekundarnih metabolita. Identifikacija zajedničkih varijansi u skupu posmatranih osobina analizirana je faktorskom analizom (miltivarijaciona statistička tehnika), zasnovanoj na korelacionoj matrici originalnih podataka, a ekstrakcija faktora je izvršena metodom glavnih komponenti (PCA). Kriterijum za odabir broja faktora je bio dvostruk: s jedne strane da eigenvalues budu veće od 1, a s druge strane da prelom linije skri (*scree*) testa maksimizuje procenat objašnjene varijanse. Pojednostavljenje faktorske strukture i maksimizacija faktorskih opterećenja izvršena je Varimax normalizovanom rotacijom. Kao rezultat faktorske analize tabelarno su prikazana faktorska opterećenja, eigenvalues i procenti objašnjene varijanse, dok su grafičkim prikazima predstavljena scree-plot eigenvalues i faktorska opterećenja dva faktora koji nose najveću informaciju. Faktorska opterećenja promenljivih su u analizi ocenjivana kao značajna ukoliko im je vrednost prevazišla 0,7; da bi se očuvala valjanost testa (construct validity), kako su predložili brojni autori (Shimp i Sharma, 1987; Carmines and Zeller, 1979; Hulland, 1999). Za determinaciju sekvencijalne klasifikacije varijanti zasnivanja plantaže prema poželjnim osobinama korišćeno je Ivanovićevo odstojanje (I-odstojanje) (Ivanović, 1977). Sve statističke analize i testovi (izuzev I-odstojanja), kao i izlazni grafici, urađeni su u programskom paketu STATISTICA v.7.0.

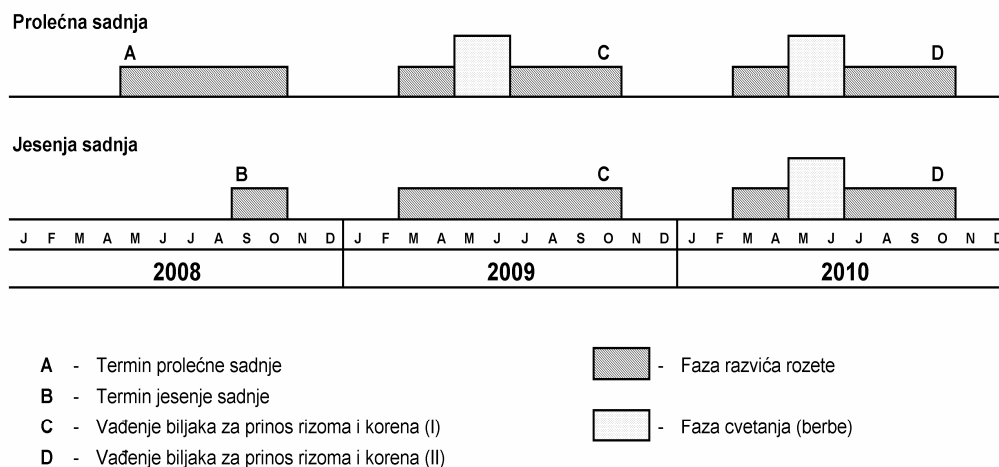
6. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Prezentacija rezultata

U prezentovanju rezultata korišćeni su grafički i tabelarni prikazi. Za predstavljanje varijanti određene kombinacije faktora korišćene su kombinacije slova P, J, G, V, O, M i K, koja su pojašnjena u spisku skraćenica [npr. **POG** – za biljke iz prolećnog plota sadnje (**P**) u bloku đubrenja stajskim đubrivom (**O**) razmnožene generativnim putem (**G**)]. Prolećni i jesenji plot sadnje su definisani oznakama PROLECE i JESEN, a tipovi sadnica su označeni Generativno i Vegetativno. U stubičnim graficima različita slova označavaju statističke značajnosti Dankanovog testa na nivou $p < 0.05$, dok su oznakama *, ** i n.s. označene statističke značajnosti t-testa na nivou verovatnoća $p < 0.05$, $p < 0.01$ i nije značajno, respektivno.

Stanje ogleđa i broj preživelih biljaka

Biljke arnike posađene na proleće su cvetale u narednoj godini, dok su biljke posađene na jesen celu vegetaciju 2009. godine provele u fazi rozete. U 2010. godini su cvetale biljke oba plota sadnje. Šematski prikaz termina sadnje, faza rozete i cvetanja (berbi) i termina vađenja podzemnih organa arnike u trogodišnjem ogleđu dat je na Slici 22.



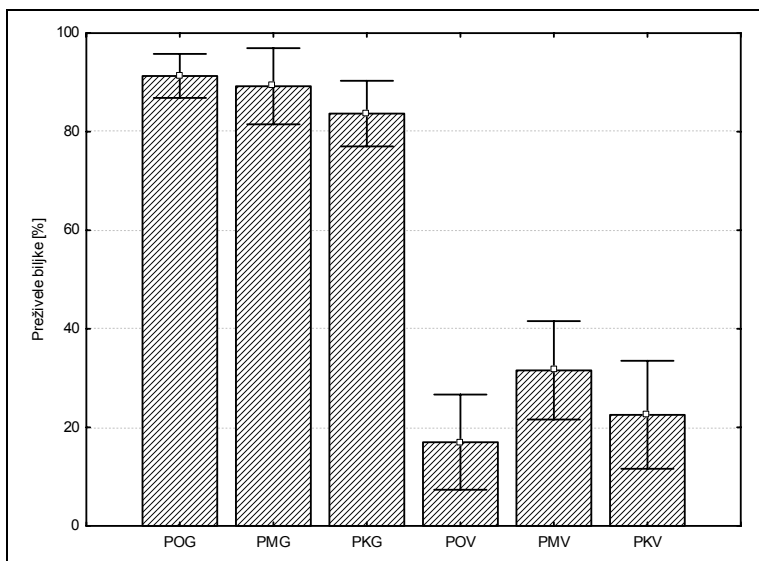
Slika 22. Vremenski prikaz osnovnih faza razvića i termina sadnje i vađenja biljaka

Neposredno nakon sadnje prolećnog dela ogleda (10 dana) došlo je do cvetanja varijanti zasnovanih iz vegetativnih sadnica (Slika 23).



Slika 23. Pojava ranog cvetanja na varijantama razmnoženim deljenjem bokora 31. maj 2008. godine

Ova neočekivana pojava, koja je zahvatila preko 90 % varijante, uticala je na slabiji prijem ovih sadnica i do 85% (Grafik 2). Loši početni uslovi imali su za posledicu slabiji razvoj preživelih biljaka na toj varijanti, što se kasnije odrazilo na većinu praćenih parametara na ogledu. Kod varijanti zasnovanih iz sadnica proizvedenih iz semena (u nastavku – generativnih sadnica) u prolećnoj sadnji nije došlo do pojave ranog iscvetavanja, tako da je prijem sadnica ove varijante u odnosu na vegetativnu varijantu bio znatno bolji (Prilog 4 A).



Grafik 2. Procenat preživelih biljaka na ogledu na dan prve žetve 2009. godine

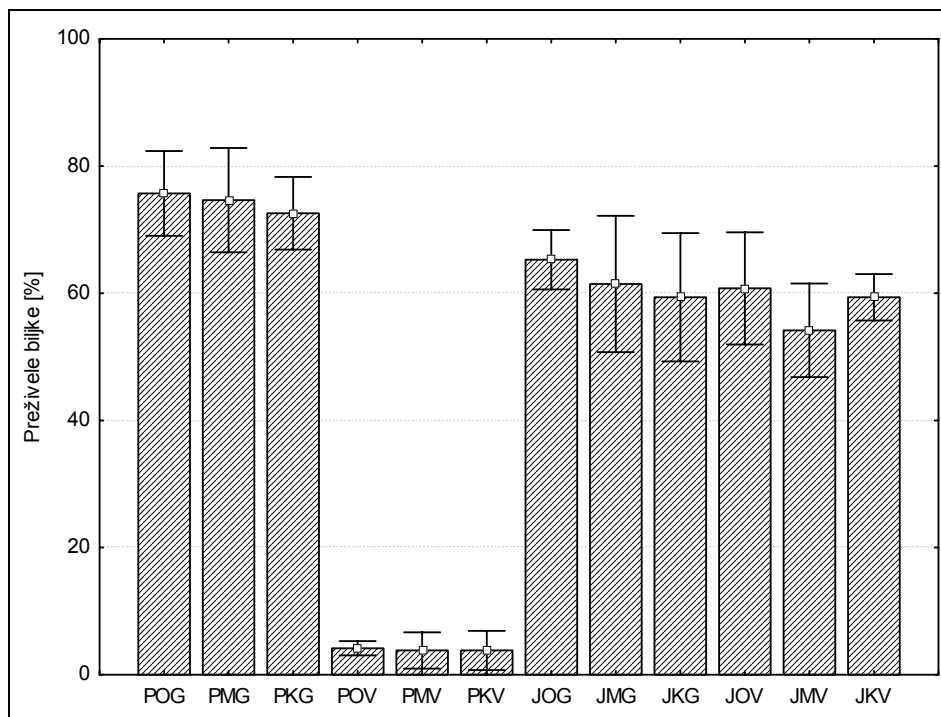
Uzrok ovoj pojavi je, kako je pokazano u narednoj godini, uznapredovala generativna faza na matičnim biljkama sa kojih su deljenjem bokora proizvedene vegetativne sadnice (Slika 24).



Slika 24. Vegetativne sadnice sa formiranom cvetnom glavicom 6. maj 2009. godine

Pretpostavka je da su biljke fiziološki reagovale ka produženju vrste u smislu formiranja cveta i semena, trošeći pri tom celokupan energetske potencijal na nadzemni deo, što je uslovalo lošiji razvoj korenovog sistema i uginuće.

U narednoj godini broj preživelih biljaka se dodatno smanjivao (Grafik 3), ali je procentualni bilans ovih varijanti bio približan nivou varijanti zasnovanih generativnim sadnicama (Tabela 12).



Grafik 3. Procenat preživelih biljaka na ogledu na dan prve žetve 2010. godine

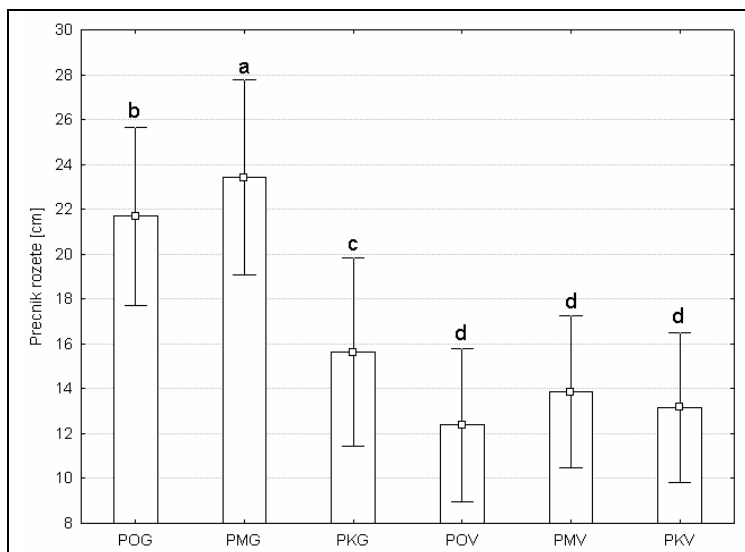
Tabela 12. Odnos preživelih biljaka na plotu prolećne sadnje u dve uzastopne godine neposredno pred berbu cveta

Varijanta	2009 %	2010 %	Δ %
POG	91.3	75.7	15.6
PMG	89.2	74.7	14.6
PKG	83.7	72.6	11.1
POV	17.0	4.2	12.8
PMV	31.6	3.8	27.8
PKV	22.6	3.8	18.8

6.1. Morfološki parametri

Prečnik rozete

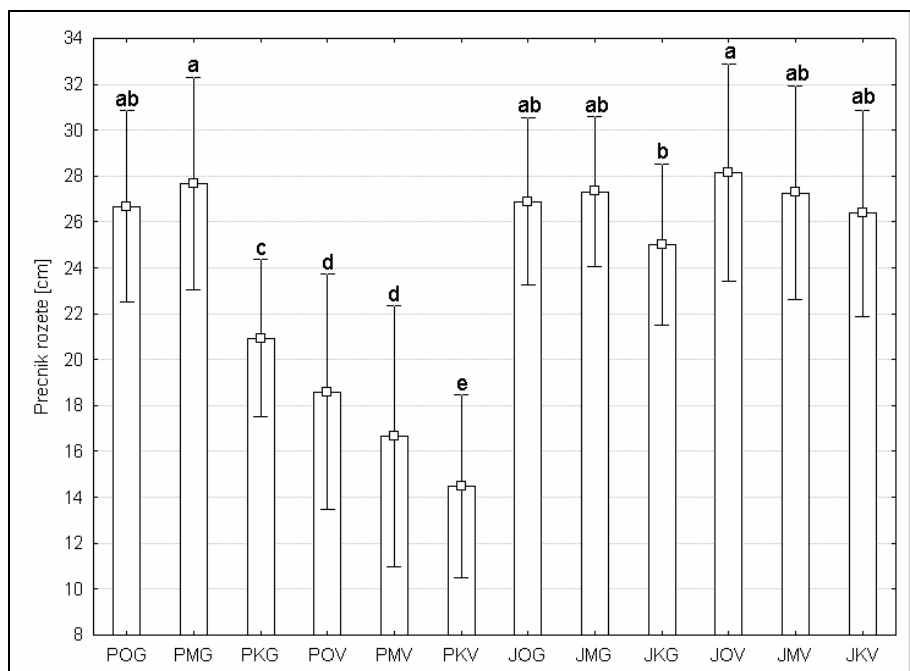
U 2009. godini vrednosti merenja prečnika rozete na ogledu *A. montana* su se kretale od 12,4 – 23,4 cm (Grafik 4). Na grafiku se vidi da je faktor vrste đubriva imao uticaj samo na prečnike rozeta generativnih sadnica i da su obe varijante đubrenja ocenjene statističkom značajnošću u odnosu na kontrolu, ali i međusobno, gde su varijante đubrene mineralnim đubrivom razvile veće prečnike rozeta ($\bar{x} = 23,4$ cm) od varijanti đubrenih stajnjakom ($\bar{x} = 21,7$ cm). Takođe je uočljivo da su varijante vegetativnog razmnožavanja imale značajno manje prečnike (12,4 – 13,8 cm).



Grafik 4. Vrednosti izmerenih prečnika rozeta u 2009. godini

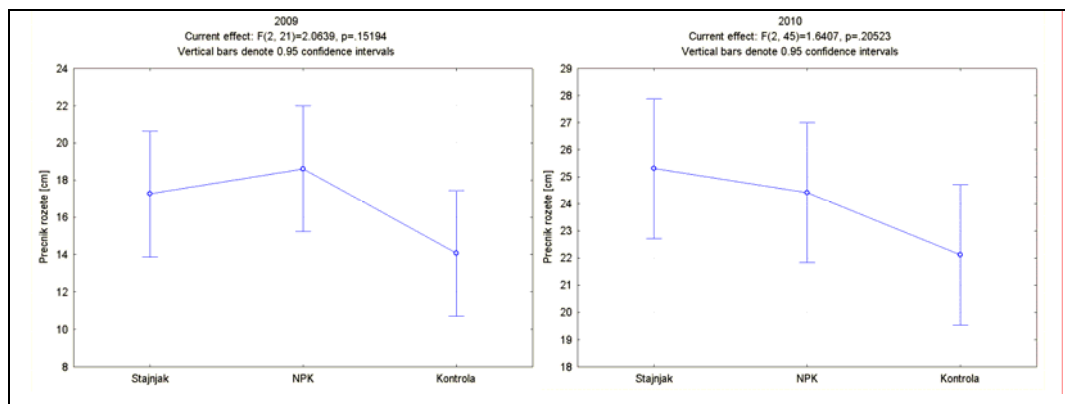
U 2010. godini prečnik rozete na celom ogledu se kretao od 14,5 – 28,1 cm (Grafik 5). Posmatrajući vrednosti prečnika rozeta može se zaključiti da su u 2010. godini najmanje prečnike rozeta imale varijante vegetativno razmnožene na proleće, a da su varijante jesenje sadnje imale ujednačene prečnike u visini đubrenih varijanti prolećne sadnje. Uticaj đubrenja je bio osetan samo na prolećno sađenom plotu, gde su se sve đubrene varijante statistički značajno razlikovale od kontrolnih varijanti. Na plotu

sađenom u jesen đubrene varijante su u proseku imale veće prečnike rozeta, ali razlike od kontrolnih varijanti nisu bile statistički značajne.



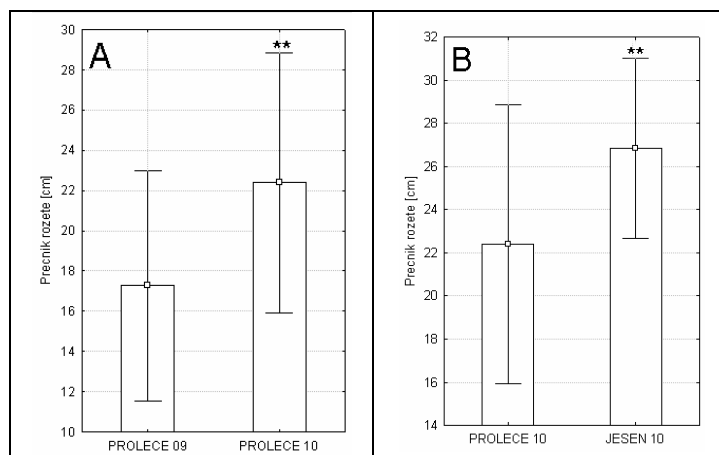
Grafik 5. Vrednosti merenja prečnika rozete u 2010. godini

I pored iznetih zapažanja o uticaju faktora vrste đubriva na posmatrni parametar prečnika rozeta arnike, ukupan uticaj ovog faktora u obe posmatrane godine nije bio statistički značajan (Grafik 6). Očigledno je da su đubrene varijante na ogledu u proseku imale veće prečnike rozeta u odnosu na kontrolne varijante, ali su verovatnoće za prihvatanje nulte hipoteze bile $p=0,15$ (u 2009. godini) i $p=0,20$ (u 2010. godini).



Grafik 6. Uticaj đubrenja na prečnik rozete arnike u 2009. i 2010. godini

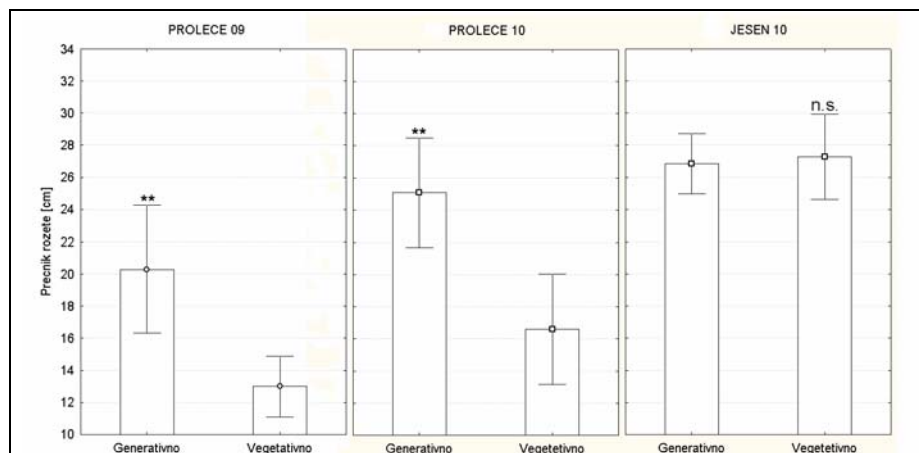
Razlike u dimenzijama rozete u dve uzastopne godine su bile očekivane i njihova statistička značajnost je predstavljena na Grafiku 7A.



Grafik 7. Uticaj starenja (A) i vremena zasnivanja (B) na prečnik rozete

Vrednosti prečnika rozeta posmatrene preko uticaja faktora vremena sadnje su predstavljeni na Grafiku 7B., gde se može videti da su u 2010. godini prečnici rozeta na delu oglada sađenog na proleće u proseku bili statistički veoma značajno manji od prečnika rozeta jesenje sađenog plotu. Na ovakvu statističku značajnost u velikoj meri utiče negativni doprinos slabije razvijenih biljaka vegetativno razmnoženih varijanti u plotu prolećne sadnje.

Faktor vrste sadnica uticao je na variranje vrednosti prečnika rozete samo na plotu prolećne sadnje (Grafik 8). Uticaj ovog faktora bio je značajan u obe posmatrane godine, gde su u 2009. godini generativno razmnožene biljke u proseku formirale veće prečnike rozeta ($\bar{x} = 20,3$ cm) u odnosu na biljke iz vegetativne propagacije ($\bar{x} = 13,0$ cm). Takođe su i u 2010. godini, na prolećnom plotu sadnje, biljke iz generativnih varijanti formirale veće prečnike rozeta ($\bar{x} = 25,1$ cm) u odnosu na biljke iz vegetativnih varijanti ($\bar{x} = 16,6$ cm).

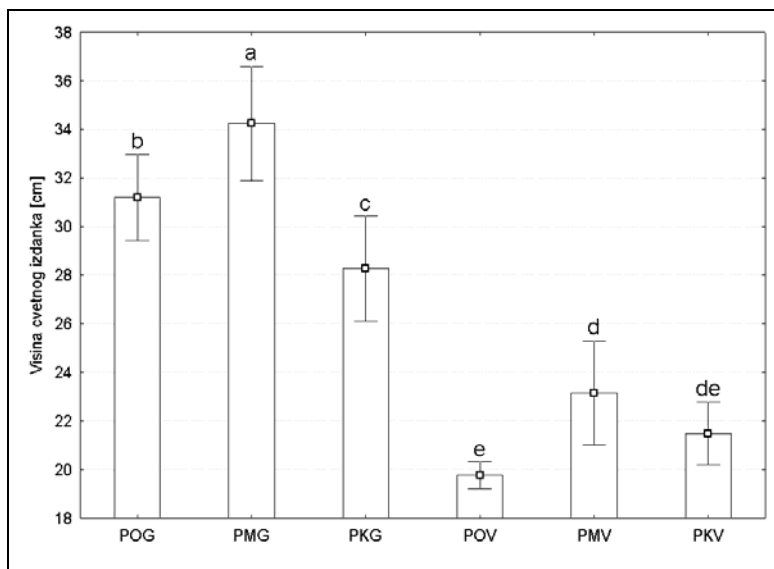


Grafik 8. Uticaj vrste sadnica na prečnik rozete u 2009. i 2010. godini

Razlike u prosečnim vrednostima prečnika rozeta na plotu jesenje sadnje nisu bile statistički značajne.

Visina cvetnog izdanka

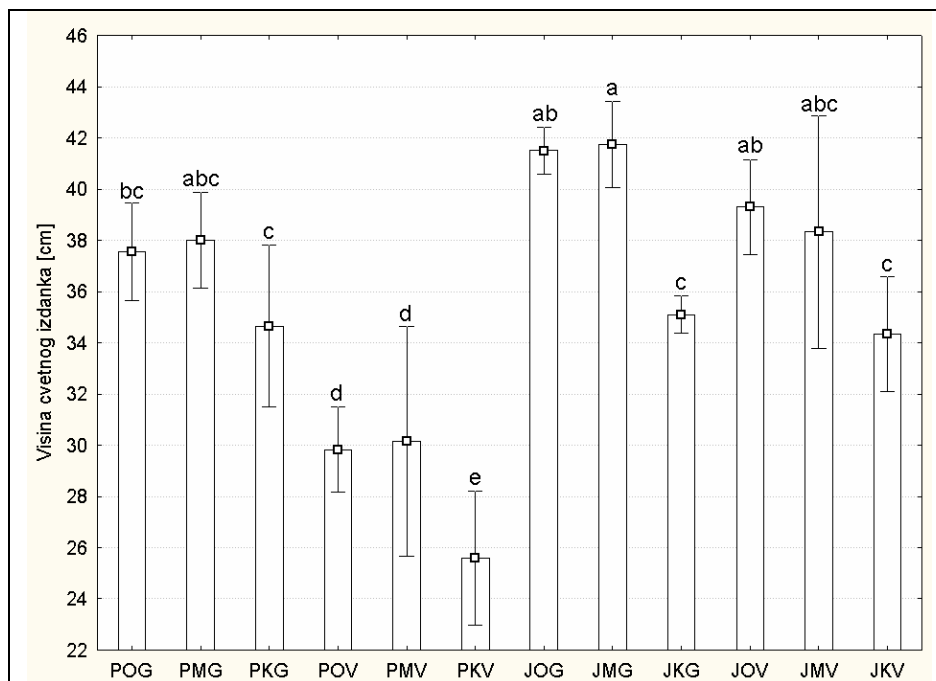
U 2009. godini vrednosti merenja visine cvetnog izdanka na ogledu gajenja arnike su se kretale od 19,7 – 34,2 cm (Grafik 9). Iz priloženog se može videti da su veću visinu cvetnih izdanaka imale biljke iz varijanti generativnog razmnožavanja (28,3 – 34,2 cm), dok su varijante vegetativnog razmnožavanja formirale znatno niže izdanke (19,7 – 23,2 cm). Takođe su biljke iz generativne propagacije bolje reagovalе na uneto hranivo, tako da su se đubrene varijante statistički veoma značajno razlikovale od kontrolnih varijanti. Varijante đubrene mineralnim đubrivom su u proseku formirale najviše cvetne izdanke ($\bar{x} = 34,2$ cm). Nešto niže izdanke su formirale varijante đubrene stajnjakom ($\bar{x} = 31,2$ cm), a najniže izdanke, u ovom tipu propagacije, formirale su biljke kontrole grupe ($\bar{x} = 28,3$ cm).



Grafik 9. Vrednosti izmerenih visina cvetnih izdanaka u 2009. godini

Biljke iz vegetativne propagacije su lošije reagovale na uneto hranivo, tako da đubrene varijante ovog tipa razmnožavanja nisu formirale statistički značajno više izdanke u odnosu na kontrolne varijante.

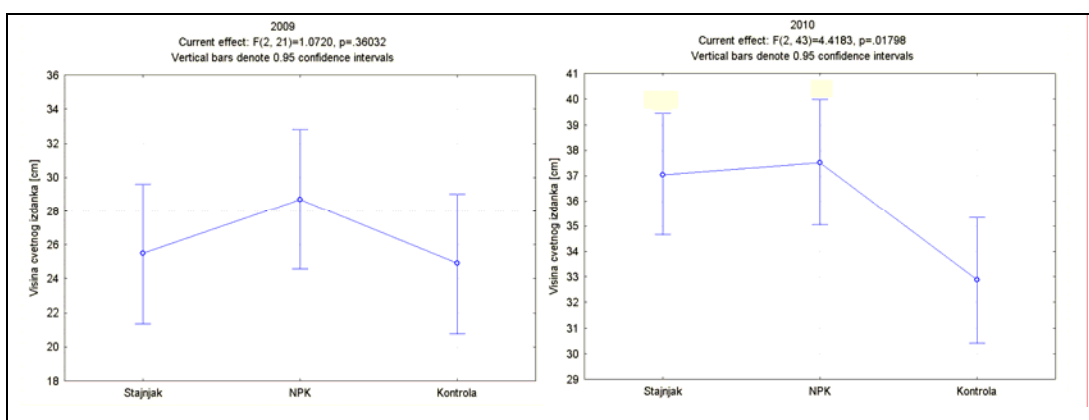
U 2010. godini visina cvetnog izdanaka na celom ogledu se kretala od 25,6 – 41,7 cm (Grafik 10).



Grafik 10. Vrednosti izmerenih visina cvetnih izdanaka u 2009. godini

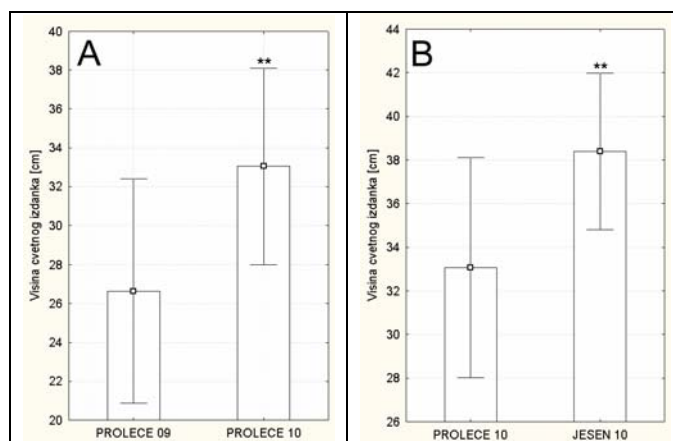
Najviše cvetne izdanke su formirale đubrene varijante jesenjeg plota sadnje, zatim varijante generativne propagacije prolećnog plota sadnje i na kraju varijante vegetativne propagacije prolećnog plota sadnje. Uticaj đubrenja u ovoj godini bio je primetan u svim posmatranim varijantama, ali, iako osetan, uticaj faktora đubrenja na delu oglada razmnoženim generativno u prolećnom plotu sadnje nije bilo statistički značajnih razlika đubrenih varijanti u odnosu na kontrolne varijante.

Ukupni uticaj faktora đubrenja na visinu cvetnog izdanka je bio značajan samo u 2010. godini ($p=0,018$), gde su se oba bloka đubrenja (stajnjak i NPK) statistički veoma značajno razlikovali od kontrole (Grafik 11).



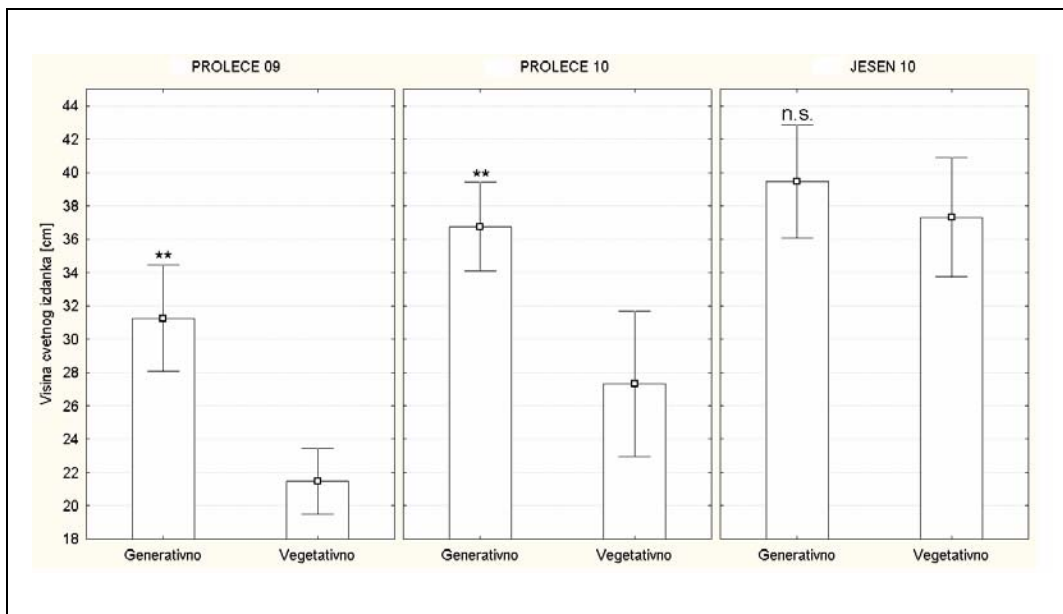
Grafik 11. Uticaj đubrenja na visinu cvetnog izdanka arnike u 2009. i 2010. godini

Uticaj starenja na visinu cvetnog izdanka na prolećnom plotu sadnje je bio očekivano statistički veoma značajan, gde su biljke u 2009. godini formirale niže cvetne izdanke ($\bar{x} = 26,7$ cm) od biljaka u 2010. godini ($\bar{x} = 33,1$ cm) (Grafik 12A).



Grafik 12. Uticaj starenja (A) i vremena zasnivanja oglada (B) na visinu cvetnog izdanka

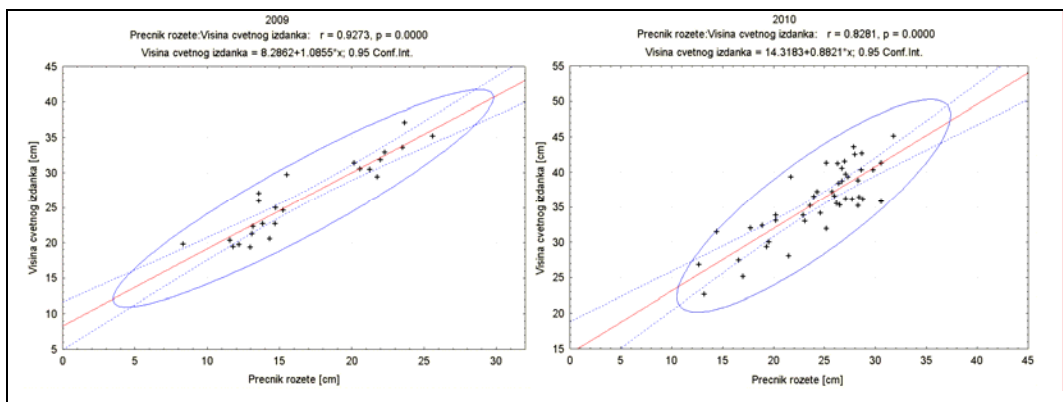
Faktor vremena zasnivanja je po pitanju ovog parametra bio statistički veoma značajan, tako da su u 2010. godini biljke iz jesnjeg plota sadnje imale značajno više vrednosti ($\bar{x} = 38,4$ cm) u odnosu na biljke iz prolećnog plota sadnje ($\bar{x} = 33,1$ cm) (Grafik 12B).



Grafik 13. Uticaj vrste sadnica na visinu cvetnog izdanka

Faktor vrste sadnica imao je uticaj na variranje vrednosti visine cvetnog izdanka samo na prolećno sađenom plotu (Grafik 13), gde su u obe posmatrane godine generativno razmnožene biljke formirale više cvetne izdanke u poređenju sa varijantama vegetativne propagacije (Prilog 4 E i F). Iako su biljke iz generativne propagacije na plotu jesenje sadnje imale više cvetne izdanke od biljaka iz vegetativnih varijanti, razlike između aritmetičkih sredina ovih varijanti nisu bile statistički značajne.

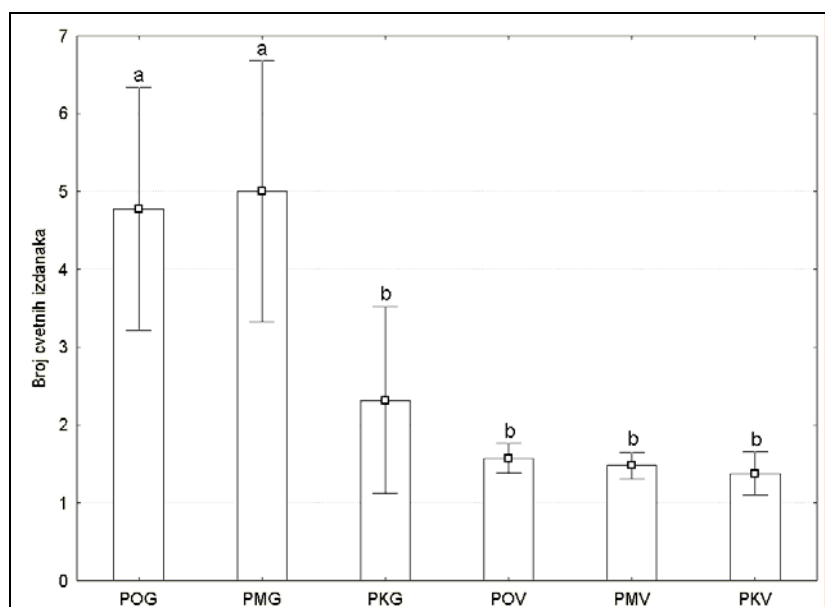
Visina cvetnog izdanka je u obe posmatrane godine bila u uskoj vezi sa prečnikom rozete (Grafik 14). Obzirom na korelacione koeficijente $r=0,93$ u 2009. godini, i $r=0,83$, u 2010. godini, može se zaključiti da su ova dva parametra u veoma jakoj pozitivnoj korelacionoj vezi.



Grafik 14. Jačine veza između prečnika rozete i visine cvetnog izdanaka

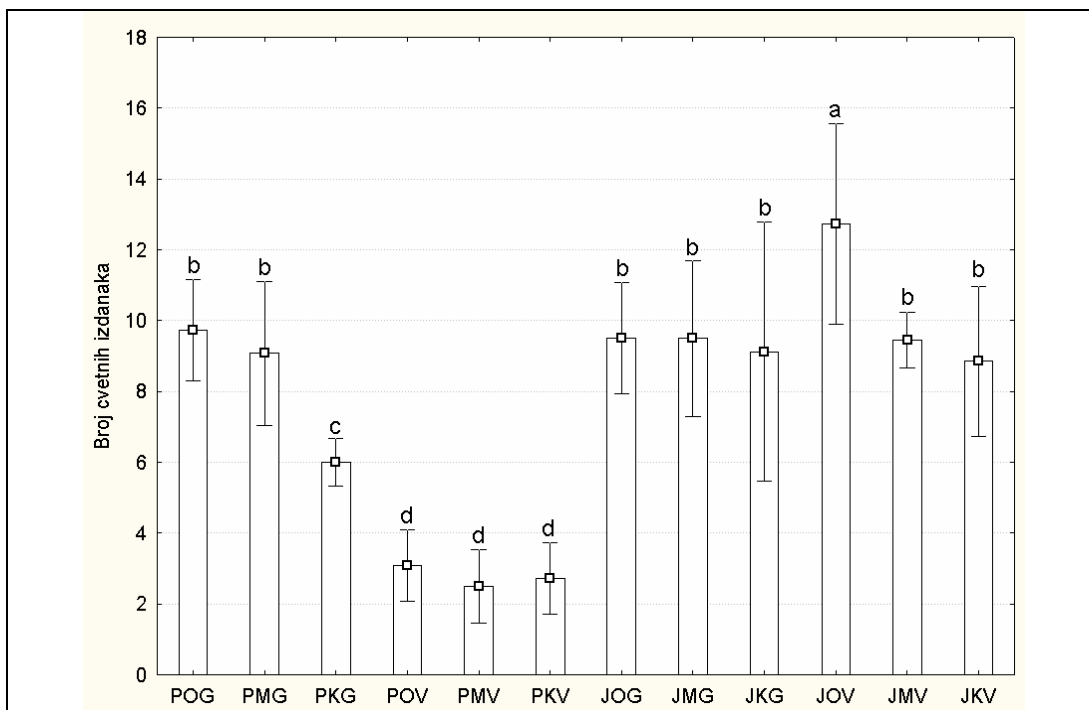
Broj cvetnih izdanaka

U 2009. godini broj cvetnih izdanaka na ogledu kretao se od 1,5 – 5,0 izdanaka po biljci (Grafik 15). Iz prikazanog se može zaključiti da su varijante generativne sadnje formirale veći broj cvetnih izdanaka (2,2 – 5,0) u odnosu na biljke iz vegetativne propagacije (~ 1,5). Takođe je uticaj đubrenja na variranje broja cvetnih izdanaka bio statistički značajan samo u generativnim varijantama, gde su obe đubrene varijante formirale veći broj (stajnjak - ca. 4,8; NPK ca. – 5,0) cvetnih izdanaka u odnosu na kontrolu (ca. 2,2).



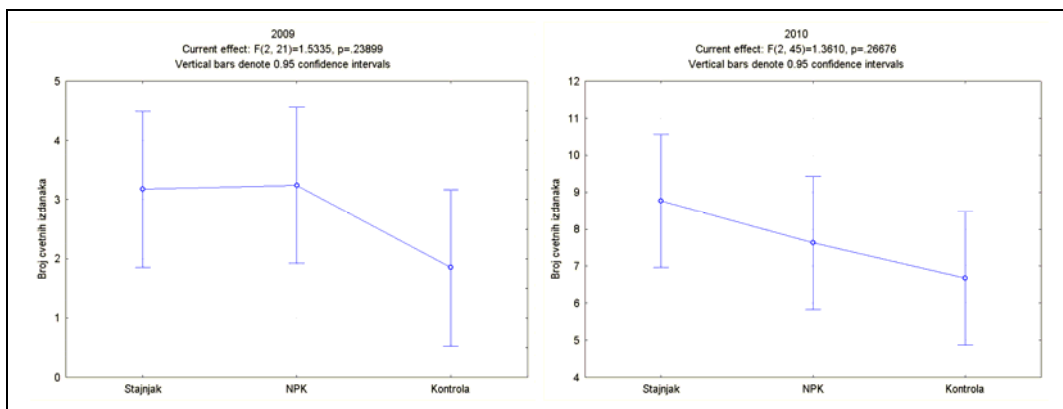
Grafik 15. Broj cvetnih izdanaka na ogledu arnike u 2009. godini

U 2010. godini broj cvetnih izdanaka na celom ogledu se kretao od 2,5 – 12,7 (Grafik 16). Najveći broj cvetnih izdanaka formirala je varijanta vegetativnog razmnožavanja, đubrena stajnjakom i sađena na jesen ($\bar{x} = 12,7$ izdanaka), a najmanji broj cvetnih izdanaka su formirale varijante vegetativnog razmnožavanja u prolećnom plotu sadnje (2,5 – 3,8 izdanaka). Statistički značajan uticaj đubrenja na variranje ovog svojstva je bio primetan samo u varijantama generativnog razmnožavanja prolećnog plota sadnje i vegetativnog razmnožavanja jesenjeg plota sadnje, gde su, u oba slučaja, đubrene varijante formirale veći broj cvetnih izdanaka, ali se međusobno nisu statistički značajno razlikovale.



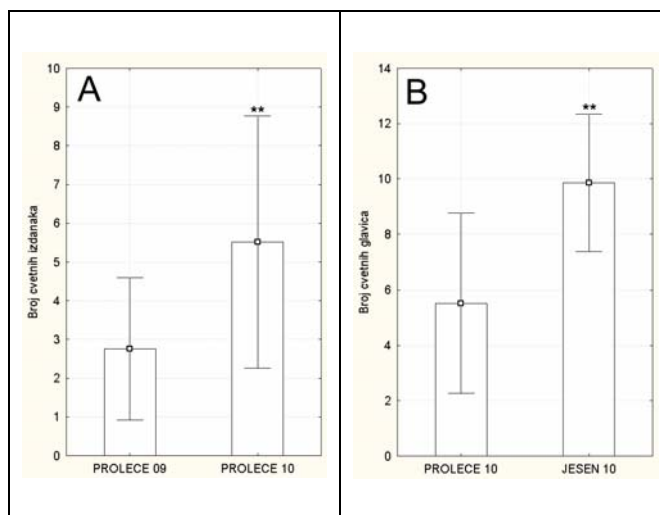
Grafik 16. Broj cvetnih izdanaka na ogledu arnike u 2010. godini

Iako su pomenute dve varijante povoljno reagovale na uneto hranivo u zemljište, ukupni uticaj faktora đubrenja na celom ogledu nije bio statistički značajan ni u jednoj posmatranoj godini (Grafik 17). Tako je mogućnost prihvatanja nulte hipoteze ocenjena verovatnoćom od $p=0,24$ u 2009. godini, odnosno sa $p=0,25$ u 2010. godini.



Grafik 17. Uticaj đubrenja na broj cvetnih izdanaka na ogledu arnike u 2009. i 2010. godini

Na plotu prolećne sadnje biljke arnike su u 2009. godini formirale statistički značajno manji broj cvetnih izdanaka ($\bar{x} = 2,8$ izdanaka) nego u narednoj godini ($\bar{x} = 5,5$ izdanaka) (Grafik 18A).

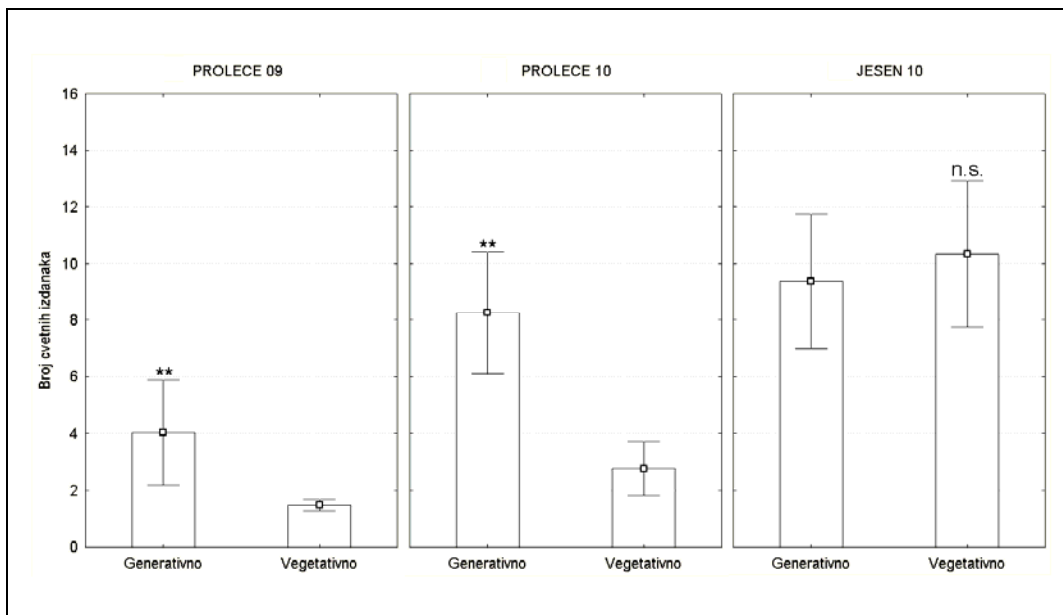


Grafik 18. Uticaj starenja (A) i vremena zasnivanja ogleda (B) na broj cvetnih izdanaka

Uticaj vremena zasnivanja na vrednosti ovog svojstva je bio statistički veoma značajan, tako da su biljke arnike sađene u jesenjem plotu sadnje formirale veći broj cvetnih izdanaka ($\bar{x} = 9,9$ izdanaka) od biljaka sađenih u prolećnom plotu sadnje ($\bar{x} = 5,5$ izdanaka) (Grafik 18B).

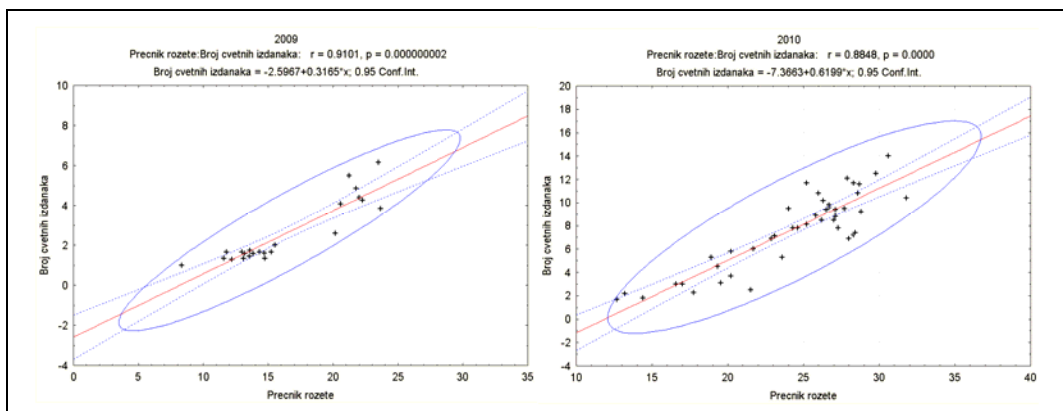
Uticaj faktora vrste sadnica na broj cvetnih izdanaka na ogledu gajenja arnike bio je značajan u obe posmatrane godine samo na plotu prolećne sadnje, gde su biljke iz generativne propagacije imale statistički veoma značajno više ($\bar{x} = 4,0$ u 2009. i $\bar{x} = 8,3$

u 2010. godini) cvetnih izdanaka od vegetativno razmnoženih varijanti ($\bar{x} = 1,5$ u 2009. i $\bar{x} = 2,8$ u 2010. godini) (Grafik 19). Biljke jesenjeg plota sadnje su imale najviše formiranih cvetnih izdanaka u 2010. godini. U ovom delu ogleda vegetativno razmnožene varijante su formirale veći broj cvetnih izdanaka ($\bar{x} = 10,3$) u odnosu na varijante generativne propagacije ($\bar{x} = 9,4$), ali razlike između ovih varijanti nisu ocenjene statističkom značajnošću.



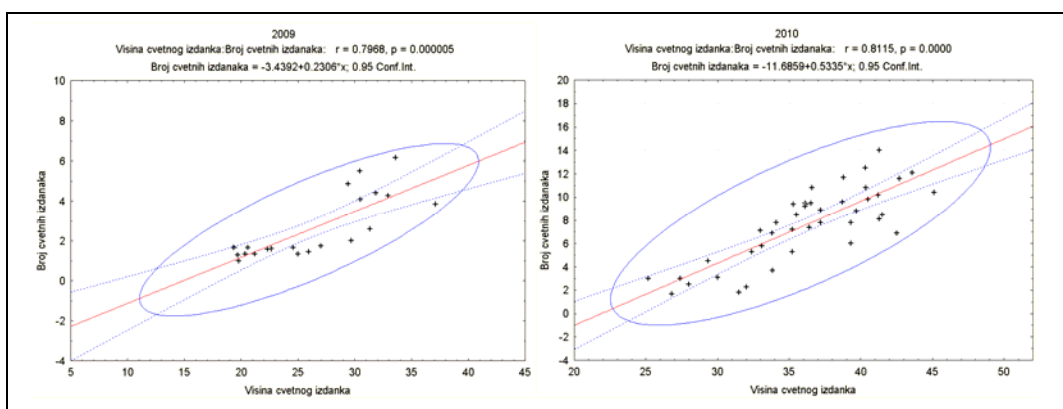
Grafik 19. Uticaj vrste sadnica na broj cvetnih izdanaka u 2009. i 2010. godini

Jačina zavisnosti parametra broja cvetnih izdanaka od prečnika rozete i visine cvetnog izdanka ocenjena je u obe posmatrane godine kao statistički veoma značajna ($p < 0,01$). Tako je pozitivni korelacioni odnos broja stabljika i prečnika rozete okarakterisan koeficijentom korelacije $r = 0,91$ u 2009. godini, odnosno $r = 0,88$ u 2010. godini (Grafik 20).



Grafik 20. Odnosi prečnika rozete i broja cvetnih izdanaka

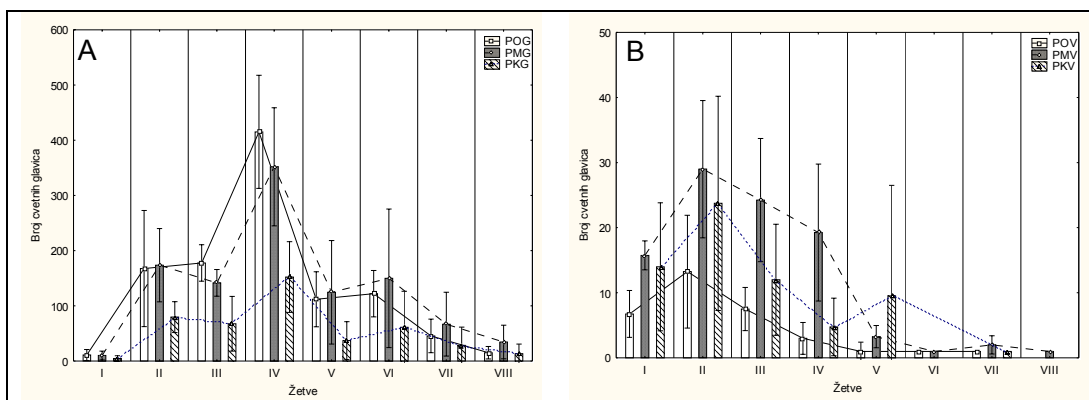
Takođe se pokazalo da je veza broja cvetnih izdanaka sa visinom cvetnog izdanka u obe posmatrane godine ima prirodu pozitivne korelacije ($r=0,80$ u 2009.; $r=0,81$ u 2010. godini) (Grafik 23).



Grafik 21. Odnosi visine cvetnog izdanka i broja cvetnih izdanaka

Broj cvetnih glavica po biljci

U 2009. godini ukupan period branja cveta bio je 26 dana u toku kojih je urađeno osam žetvi. Raspored broja ubranih cvetnih glavica arnike na ogledu u 2009. godini dat je Grafiku 22. i u Tabeli 13. Iz prikazanih podataka može se zaključiti da su biljke iz vegetativne propagacije nešto ranije ušle u fazu tehnološke zrelosti za berbu, tako da je glavna žetva (31 – 41% od ukupno ubranog cveta) vegetativno razmnoženih varijanti bila druga žetva (25. maj), a najveći broj cvetnih glavica na varijantama generativno razmnoženim ubrano je u četvrtoj žetvi (3. jun).

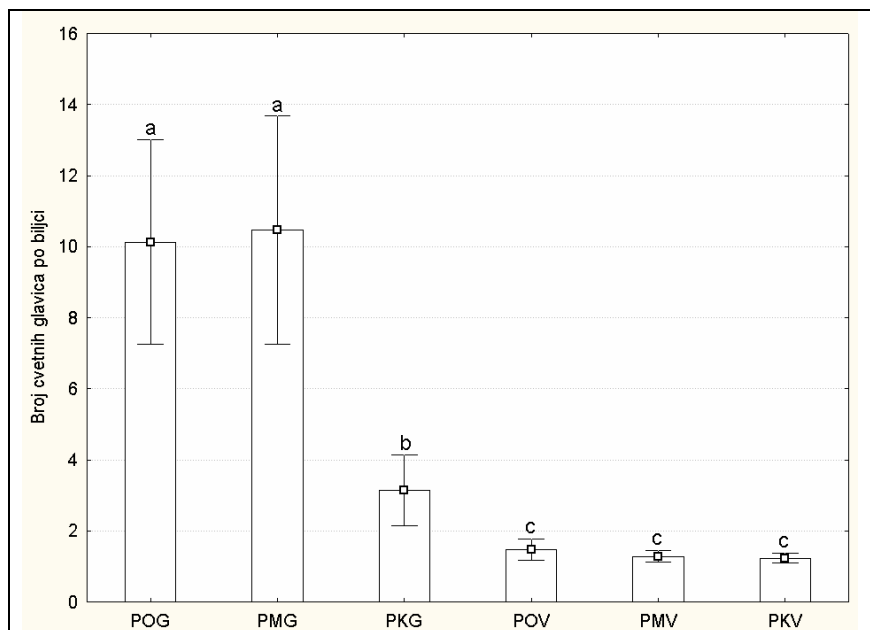


Grafik 22. Broj cvetnih glavica u 2009. godini po berbama na prolećnom delu ogleda sa generativnim (A) i vegetativnim (B) sadnicama;

Tabela 13. Broj cvetnih glavica [%] po žetvama u 2009. godini

	21. maj I	25. maj II	27. maj III	3. jun IV	5. jun V	8. jun VI	10. jun VII	15. jun VIII
POG	1.04	15.89	16.84	39.34	10.61	11.58	3.24	1.44
PMG	0.97	16.48	13.45	33.39	11.83	14.23	6.36	3.30
PKG	1.07	17.90	15.21	34.18	8.36	13.80	6.45	3.03
POV	20.93	41.09	23.26	9.30	3.10	1.55	0.78	0.00
PMV	16.89	31.10	26.01	20.64	3.49	0.27	1.07	0.54
PKV	21.79	36.96	18.68	7.39	14.79	0.00	0.39	0.00

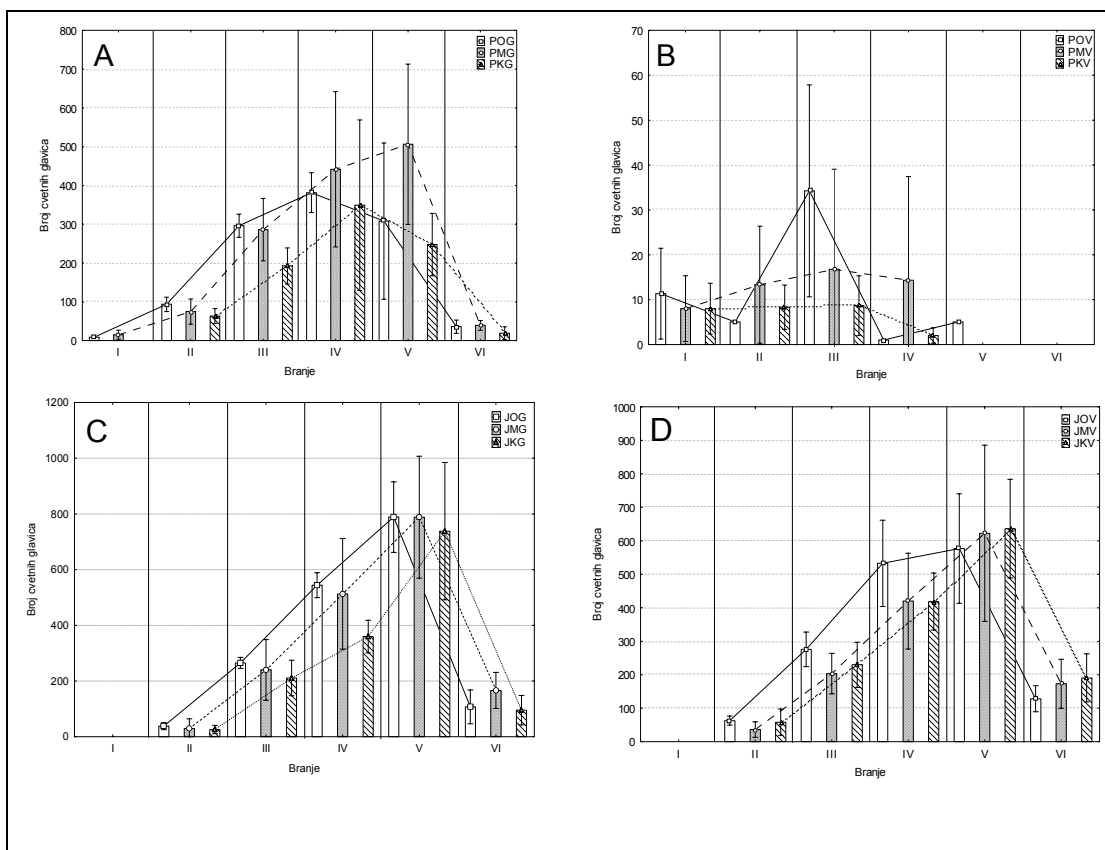
Prosečan broj cvetnih glavica po biljci na ogledu gajenja arnike u 2009. godini se kretao od 1,2 – 10,5 (Grafik 23). Veći broj cvetnih glavica po biljci su formirale biljke iz generativnih varijanti razmnožavanja, gde su se i đubrene varijante (stajnjak $\bar{x} = 10,1$; NPK $\bar{x} = 10,5$) statistički značajno razlikovale od kontrole ($\bar{x} = 3,1$), ali ne i međusobno. Varijante iz vegetativne propagacije su formirale od 1,2 – 1,5 cvetne glavice po biljci što je okarakterisano statistički značajnom razlikom u odnosu na varijante iz generativne propagacije.



Grafik 23. Prosečan broj cvetnih glavica po biljci na ogledu arnike u 2009. godini

U 2010. godini ukupan period branja cveta bio je 23 dana u toku kojih je urađeno šest žetvi (Grafik 24), a . Najmasovnija žetva kod biljaka prolećnog dela ogleda razmnoženih generativno bila je 8. juna, dok je kod biljaka koje su razmnožene vegetativno period branja najvećeg broja cvetnih glavica, slično kao i prethodne godine, bio pomen devet dana unapred (31. maj), osim kod neđubrene varijante koja je imala približno ujednačenu disperziju branja u prve tri žetve (Tabela 14). Biljke jesenjeg dela ogleda su kasnile sa cvetanjem tako da je berba na ovim varijantama počela tek u drugoj žetvi. Nezavisno od tipa sadnica imale su svoj maksimum branja u petoj žetvi (11. jun), dok je prethodna, četvrta, žetva po masovnosti bila odmah iza pete, tako da ove dve žetve zajedno predstavljaju u masi u proseku 73.4% svih ubranih cvetnih glavica. Disperzija branja i količine ubranih cvetnih glavica data je na Grafiku 24, gde se može videti da se u ovoj godini broj cvetnih glavica prolećnog dela ogleda u varijantama generativnog razmnožavanja kreće u maksimalnim žetvama u rangu 300 – 500 cvetnih glavica po parcelici (Grafik 24A), dok se kod varijanti vegetativnog razmnožavanja taj broj kreće u rangu od 10 do 30 cvetnih glavica po parcelici (Grafik 24B). Na jesenjem plotu ogleda obe varijante tipa sadnica su imale prilično ujednačen raspored branja po žetvama. U slučaju generativnih sadnica prosečan broj cvetnih glavica po parcelici se

kretao oko 800 cvetnih glavica (Grafik 24C), a kod vegetativno razmnoženih varijanti oko 600 cvetnih glavica (Grafik 24D).

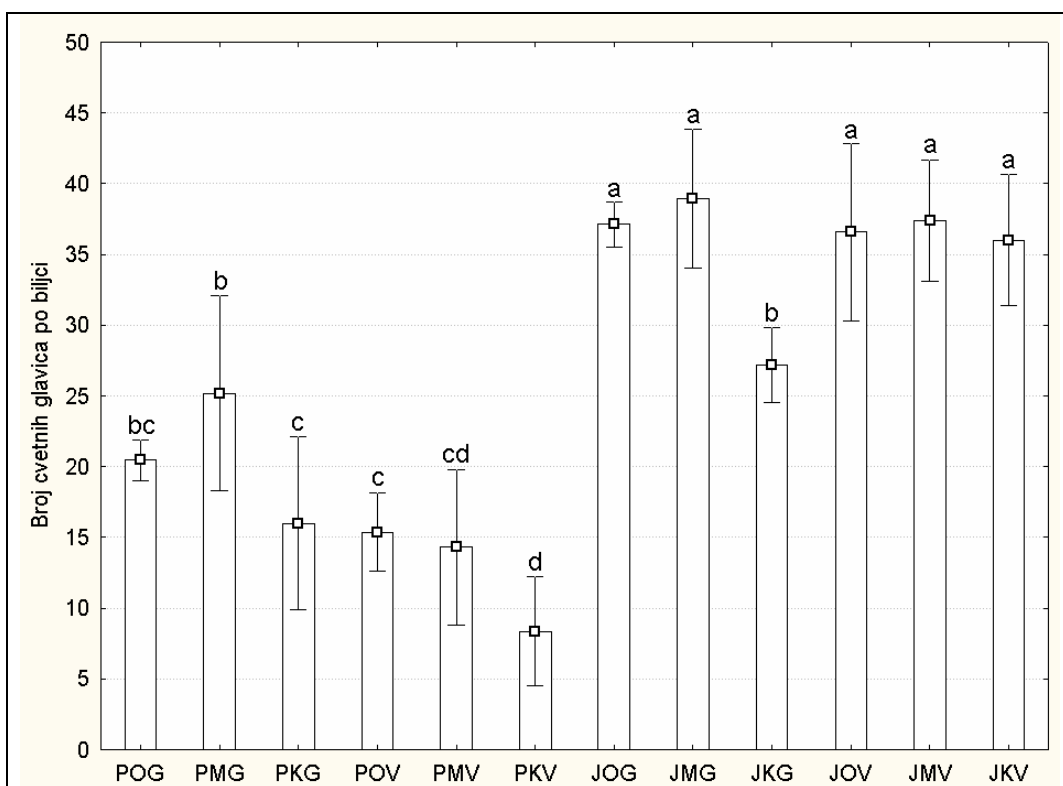


Grafik 24. Broj cvetnih glavica u 2010. godini po berbama na prolećnom delu ogleda sa generativnim (A) i vegetativnim (B) sadnicama; na jesenjem delu ogleda sa generativnim (C) i vegetativnim (D) sadnicama.

Tabela 14. Broj cvetnih glavica [%] po žetvama u 2010. godini

	24. maj	28. maj	31. maj	8. jun	11. jun	15. jun
	I	II	III	IV	V	VI
POG	0.2	8.4	26.5	34.1	27.6	3.2
PMG	0.9	5.6	21.2	32.7	37.5	2.2
PKG	0.0	7.7	17.5	42.4	30.1	2.3
POV	18.2	5.3	73.3	0.5	2.7	0.0
PMV	17.6	22.0	36.8	23.6	0.0	0.0
PKV	36.0	28.1	29.2	6.7	0.0	0.0
JOG	0.0	2.2	15.2	31.2	45.2	6.2
JMG	0.0	1.7	13.8	29.5	45.4	9.6
JKG	0.0	2.2	13.5	15.3	62.9	6.1
JOV	0.0	4.0	17.5	33.8	36.6	8.1
JMV	0.0	2.5	14.0	28.9	42.8	11.9
JKV	0.0	3.8	15.0	27.3	41.5	12.4

Raspored prosečnog broja cvetnih glavica po biljci u 2010. godini na ogledu gajenja arnike po varijantama dat je na Grafiku 25. Iz prikazanih podataka se može zaključiti da su se vrednosti kretale od 8,4 – 38,9 i da su biljke iz jesenjeg plotu sadnje formirale veći broj cvetnih glavica po biljci (27,2 – 37,4 cvetnih glavica), u odnosu na biljke prolećnog plotu sadnje (8,4 – 25,2 cvetnih glavica), ali i da je faktor đubrenja imao uticaj samo na biljke koje su generativno razmnožene, gde se đubrene varijante nisu međusobno statistički značajno razlikovale. Faktor đubrenja nije imao nikakav uticaj na vegetativno razmnožene biljke arnike u plotu jesenje sadnje.

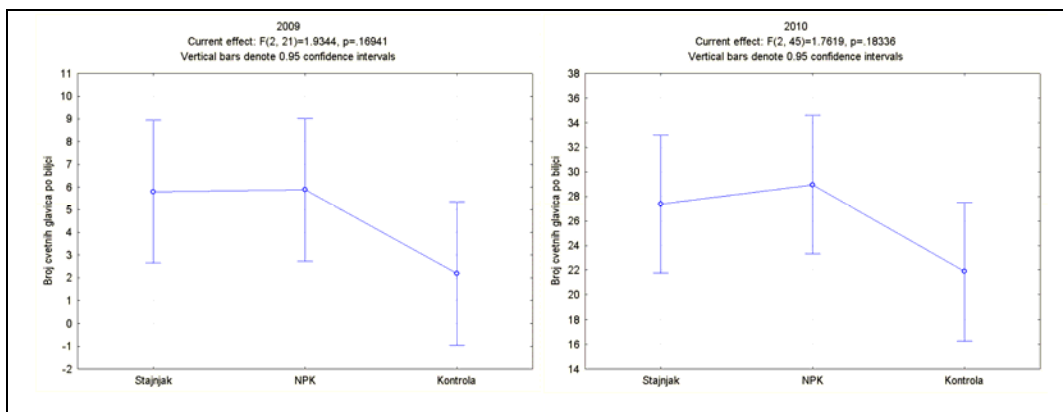


Grafik 25. Prosečan broj cvetnih glavica po biljci arnike na ogledu u 2010. godini

Na prolećnom plotu sadnje uticaj faktora đubrenja je bio značajan u varijanti mineralnog đubrenja kod generativno razmnoženih biljaka i u varijanti đubrenja stajnjakom kod vegetativno razmnoženih varijanti. U isto vreme razlike između varijanti različitog tipa đubrenja nisu bile statistički značajne ni u jednoj varijanti tipa sadnica.

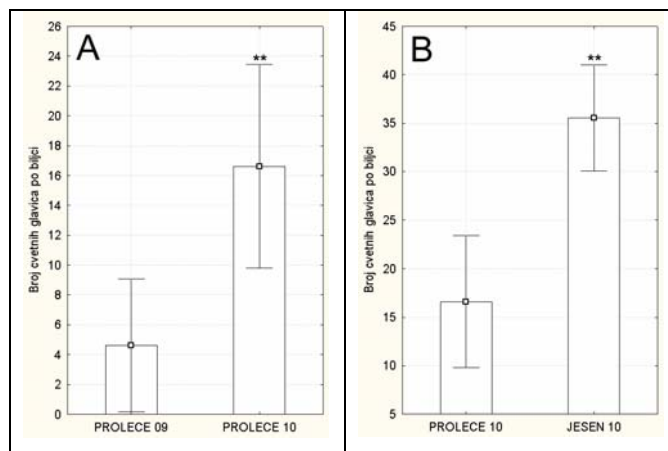
Uprkos pojedinačnim značajnim razlikama između đubrenih i kontrolnih varijanti, uticaj faktora đubrenja na celom ogledu nije bio statistički značajan ni u jednoj

posmatranoj godini (Grafik 26). Đubrene varijante su u obe godine imale više prosečne vrednosti, ali su mogućnosti prihvatanja hipoteza o jednakosti aritmetičkih sredina posmatranih populacija osnovnih skupova ocenjene sa verovatnoćama $p=0,17$ u 2009. godini i $p=0,18$ u 2010. godini.



Grafik 26. Uticaj đubrenja na broj cvetnih glavica na ogledu arnike u 2009. i 2010. godini

Broj cvetnih glavica po biljci je u 2010. godini na prolećnom plotu sadnje očekivano bio statistički veoma značajno veći ($\bar{x} = 16,6$) nego u 2009. godini ($\bar{x} = 4,6$) (Grafik 27A).

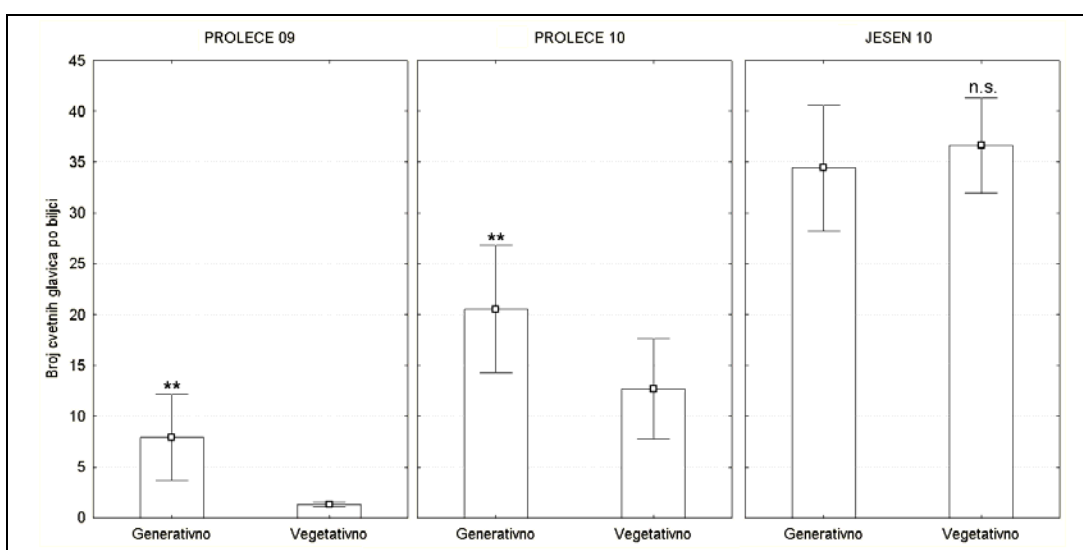


Grafik 27. Uticaj starenja biljaka (A), vremena zasnivanja (B) na broj cvetnih glavica po biljci

Uticaj faktora vremena zasnivanja na plantaži arnike u pogledu broja cvetnih glavica po biljci se pokazao statistički veoma značajnim (Grafik 27B). Tako su biljke iz

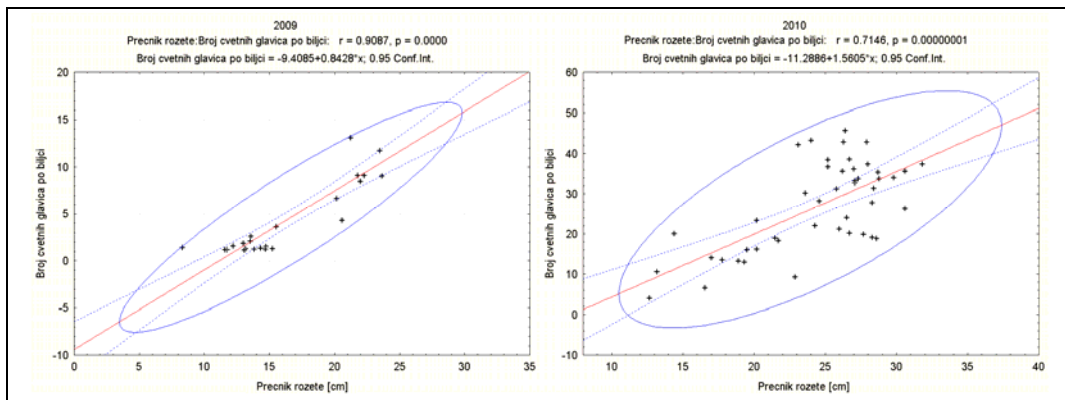
prolećnog plota sadnje formirale statistički veoma značajno manji broj cvetnih glavica po biljci ($\bar{x} = 16,6$) u poređenju sa biljkama iz jesenjeg plota sadnje ($\bar{x} = 35,5$).

Uticaj faktora vrste sadnica na broj cvetnih glavica po biljci je bio značajan samo na plotu prolećne sadnje, gde su biljke iz generativne propagacije formirale veći broj cvetnih glavica ($\bar{x} = 7,9$ u 2009.; $\bar{x} = 20,6$ u 2010. god.) u odnosu na biljke iz vegetativne propagacije ($\bar{x} = 1,3$ u 2009.; $\bar{x} = 12,7$ u 2010. god.) (Grafik 28) (Prilog 4 E i F). Kod biljaka iz jesenjeg plota sadnje uticaj faktora vrste sadnica nije bio statistički značajan.

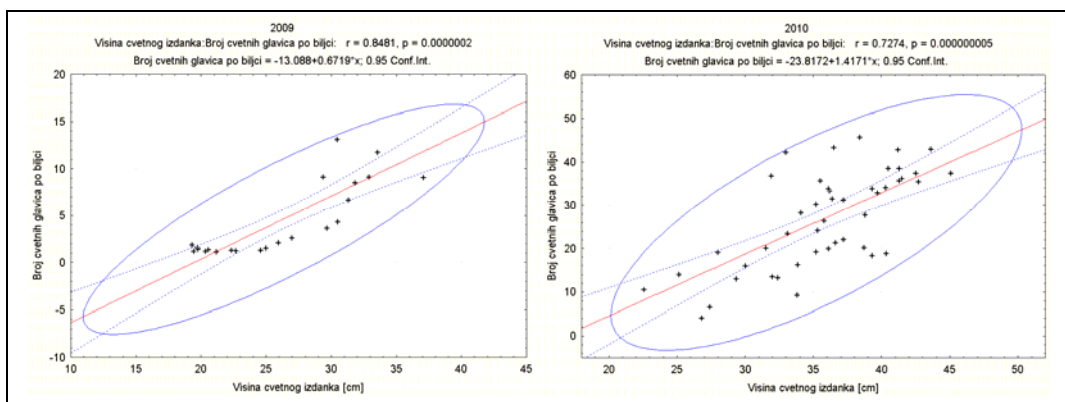


Grafik 28. Uticaj vrste sadnica na broj cvetnih glavica po biljci na ogledu arnike u 2009. i 2010. godini

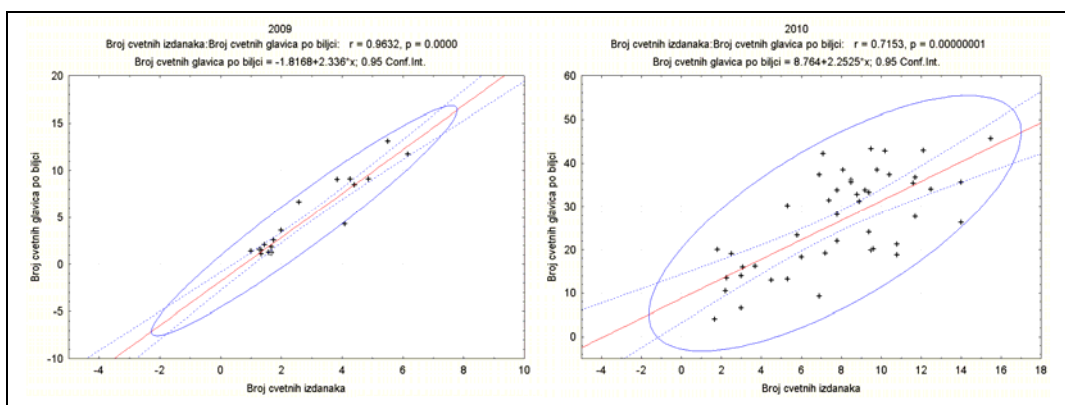
Od veza sa prethodno obrađenim morfološkim osobinama, parametar broj cvetnih glavica po biljci gradi statistički veoma značajne pozitivne korelacije odnose ($p < 0,01$) u obe posmatrane godine sa: prečnikom rozete, $r = 0,91$ u 2009. godini (odnosno $r = 0,71$ u 2010. godini), visinom cvetnog izdanka, $r = 0,85$ ($r = 0,83$), i brojem cvetnih izdanaka, $r = 0,96$ ($r = 0,71$) (Grafici 29, 30 i 31).



Grafik 29. Odnos prečnika rozete i broja cvetnih glavica po biljci u 2009. i 2010. godini



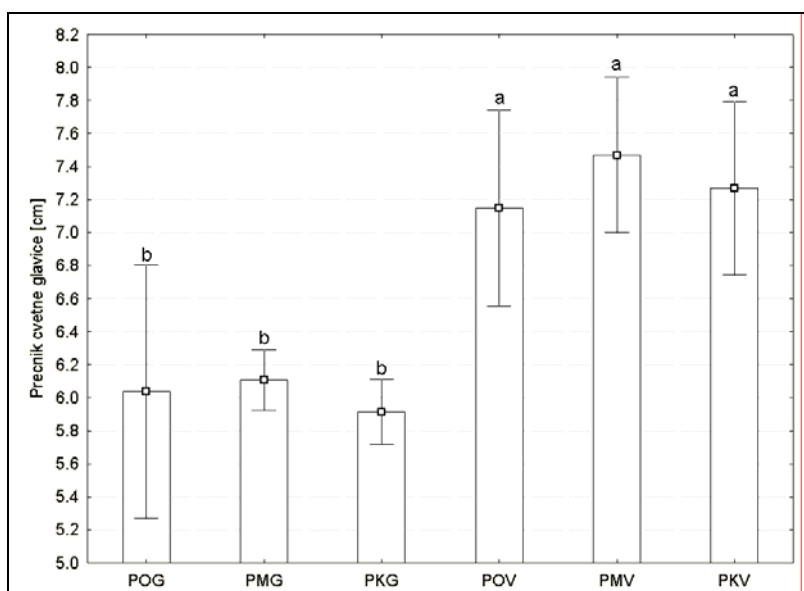
Grafik 30. Odnos visine cvetnog izdanaka i broja cvetnih glavica po biljci u 2009. i 2010. godini



Grafik 31. Odnos broja cvetnih izdanaka i broja cvetnih glavica po biljci u 2009. i 2010. godini

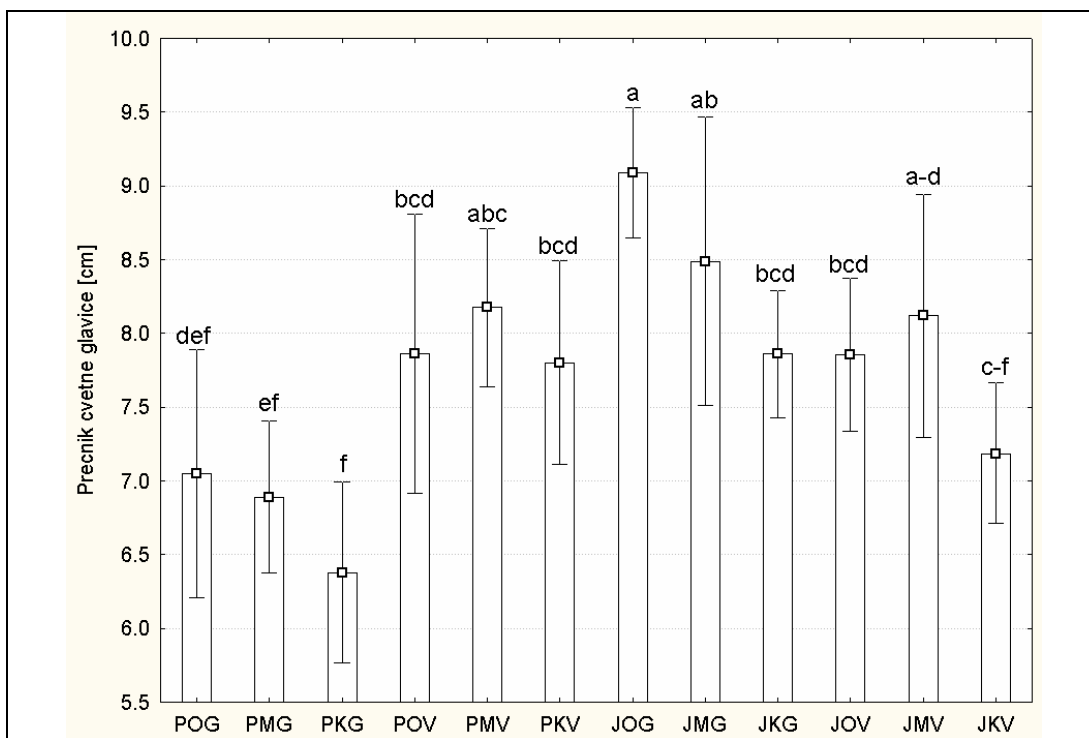
Prečnik cvetne glavice

U 2009. godini na ogledu gajenja arnike prečnik cvetne glavice se kretao od 5,9 – 7,5 cm (Grafik 32). Iz prikazanog se može zaključiti da su u ovoj godini biljke iz vegetativne propagacije formirale statistički veoma značajno veće prečnike cvetnih glavica u odnosu na biljke iz generativne propagacije. Varijante đubrenja nije uticalo na formiranje značajno većih prečnika u odnosu na kontrolnu varijantu ni u jednom tipu sadnica.



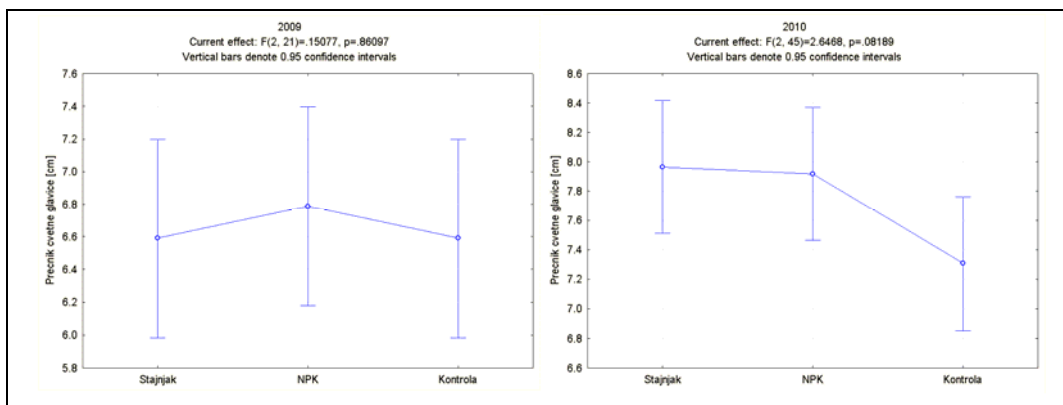
Grafik 32. Prosečan prečnik cvetne glavice arnike na ogledu u 2009. godini

U 2010. godini prečnici cvetnih glavica na ogledu su se kretali od 6,4 – 9,1 cm (Grafik 33). Najveći prosečni prečnik cvetne glavice zabeležen je na varijanti generativnih sadnica u bloku đubrenja stajnjakom na jesenjem plotu sadnje ($\bar{x} = 9.1$ cm), a najmanji na prolećnom plotu sadnje kod varijante generativnih sadnica bez primene đubriva ($\bar{x} = 6,4$ cm). Uopšteno gledajući podatke iz 2010. godine, najmanje prečnike cvetnih glavica su imale varijante generativnog razmnožavanja na prolećnom plotu sadnje, dok su ostale varijante sa manjim ili većim razlikama bile prilično ujednačene po ovom parametru.



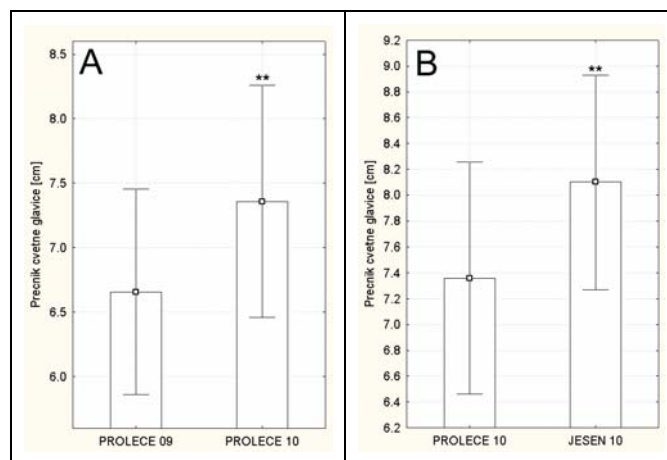
Grafik 33. Prosečan prečnik cvetne glavice arnike na ogledu u 2010. godini

Iako su u 2010. godini đubrene varijante u oba plotu sadnje i kod oba tipa sadnica u proseku dale veće vrednosti prečnika cvetnih glavica, ukupan uticaj faktora đubrenja na posmatranu osobinu ni u jednoj posmatranoj godini nije bio statistički značajan (Grafik 34). Prihvatanje hipoteza o jednakosti aritmetičkih sredina osnovnih skupova blokova đubrenja, u dve posmatrane godine, ocenjene su sa verovatnoćama od 86%, u 2009 godini, i 8% u 2010. godini.



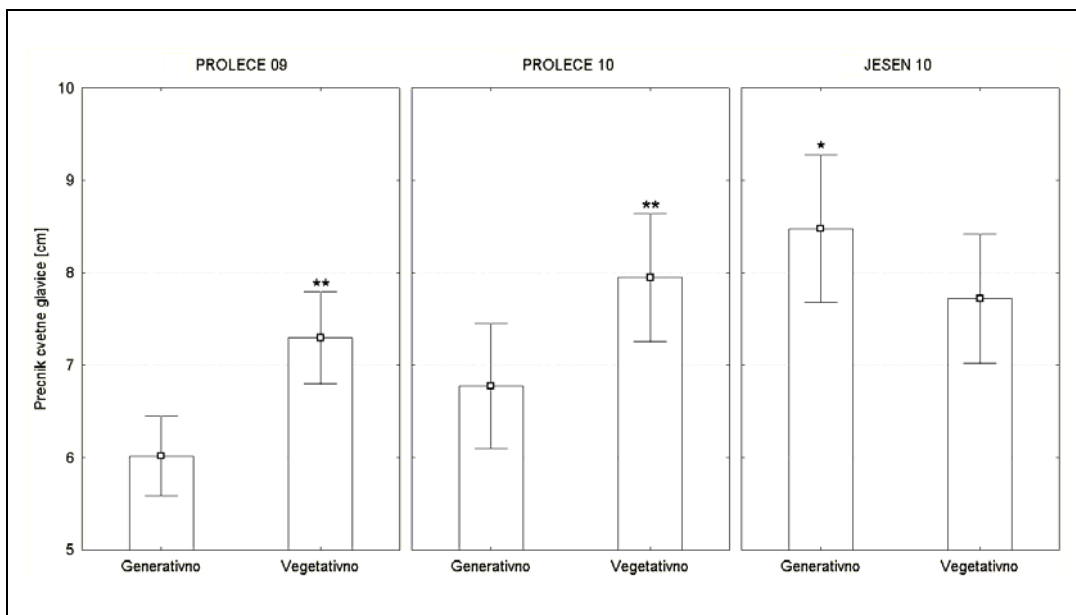
Grafik 34. Uticaj faktora đubrenja na prečnik cvetne glavice arnike u 2009. i 2010. godini.

Na delu ogleada sađenog na proleće u 2009. godini je prečnik cvetne glavice bio statistički značajno manji ($\bar{x} = 6,7$ cm) nego u 2010. godini ($\bar{x} = 7,4$ cm) (Grafik 35A). Uticaj faktora vremena zasnivanja je u 2010. godini bio u pogledu vrednosti prečnika cvetne glavice statistički veoma značajan, gde su biljke iz jesenjeg roka sadnje razvile veće prečnike cvetnih glavica ($\bar{x} = 8,1$ cm) u odnosu na biljke iz prolećnjeg roka sadnje ($\bar{x} = 7,4$ cm) (Grafik 35B).



Grafik 35. Uticaj starenja (A) i vremena zasnivanja ogleada (B) na prečnik cvetne glavice

Uticaj faktora vrste sadnica na prečnike cvetnih glavica arnike je bio statistički veoma značajan na prolećnom plotu sadnje, gde su vegetativne sadnice u obe godine razvile veće prečnike cvetnih glavica ($\bar{x} = 7,3$ cm, u 2009.; $\bar{x} = 7,9$ cm, u 2010.) u odnosu na biljke iz generativne propagacije ($\bar{x} = 6,0$ cm, u 2009.; $\bar{x} = 6,8$ cm, u 2010.) (Grafik 36) (Prilog 4 E i F). Kod biljaka iz jesenjeg plotu sadnje je bila obrnuta situacija. U ovom roku sadnje su biljke iz generativnih varijanti razmnožavanja razvile statistički značajno veće prečnike cvetnih glavica ($\bar{x} = 8,5$ cm) u odnosu na biljke iz vegetativne propagacije ($\bar{x} = 7,7$ cm).



Grafik 36. Uticaj vrste sadnica na prečnik cvetne glavice na ogledu arnike u 2009. i 2010. godini

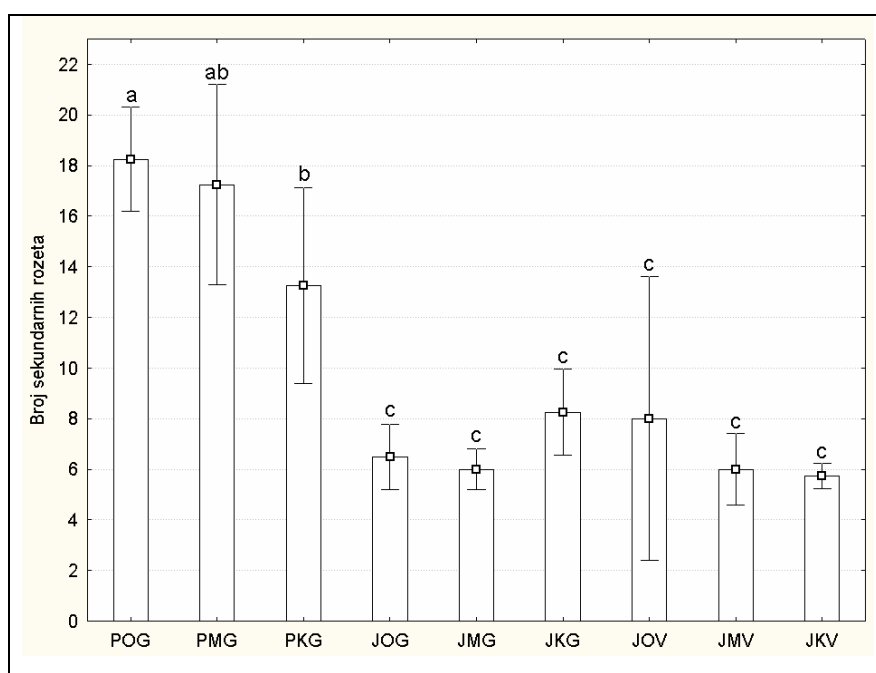
Svojestvo prečnika cvetne glavice je u 2009. godini pokazalo statistički veoma značajne negativne korelacione odnose sa prečnikom rozete, visinom cvetnog izdanka i brojem cvetnih glavica po biljci (Tabela 15). Međutim, u 2010. godini, takvi odnosi prestaju da važe.

Tabela 15. Odnosi prečnika cvetne glavice na ogledu arnike sa prethodno obrađenim morfološkim parametrima u 2009. i 2010. godini

	2009	2010
	r	r
Prečnik rozete	-0.5501 p=0.005	-0.0074 p=0.960
Visina cvetnog izdanka	-0.6232 p=0.001	0.0530 p=0.721
Broj cvetnih izdanaka	-0.5165 p=0.010	-0.0050 p=0.973
Broj cvetnih glavica po biljci	-0.5321 p=0.007	0.2355 p=0.107

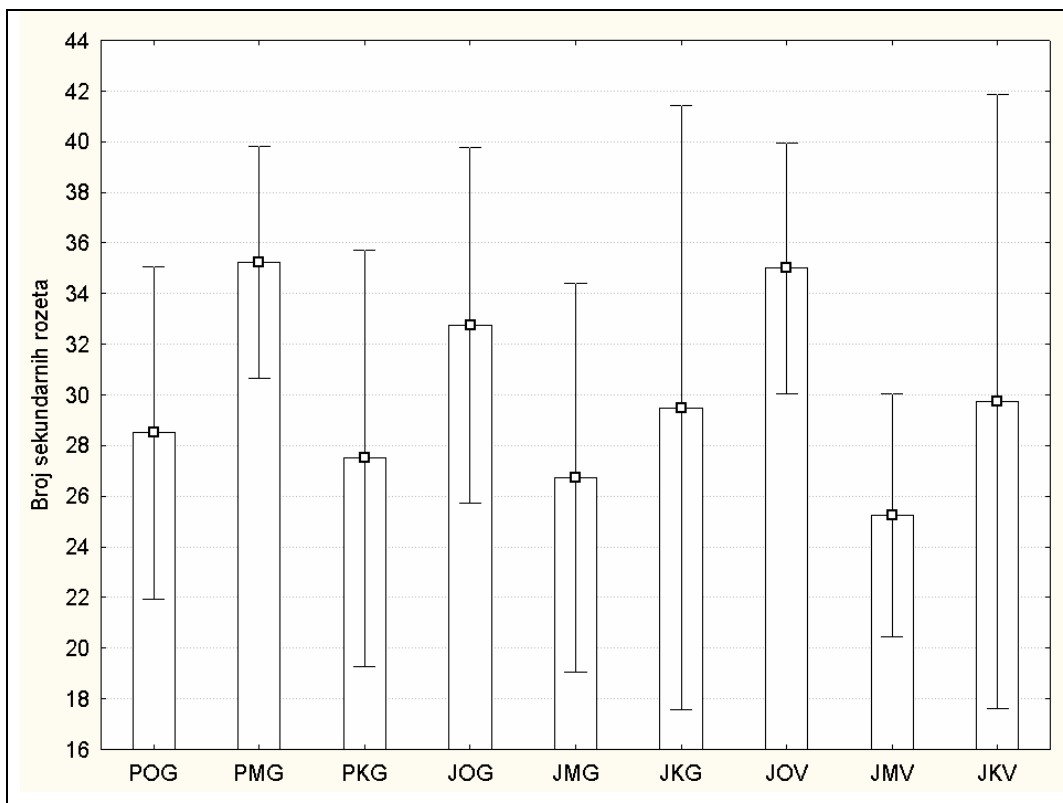
Broj sekundarnih rozeta

Prosečan broj sekundarnih rozeta na ogledu arnike u 2009. godini kretao se od 5,7 – 18,3 (Grafik 37). Najveći broj sekundarnih rozeta formirale su biljke iz prolećnog plota sadnje (13,3 – 18,3), a najmanje biljke iz jesenjeg plota sadnje (5,7 – 8,3). Uticaj faktora đubrenja je bio statistički značajan samo u slučaju vatijante generativnog razmnožavanja u bloku đubrenja stajnjakom na prolećnom plotu sadnje u odnosu na kontrolnu varijantu.



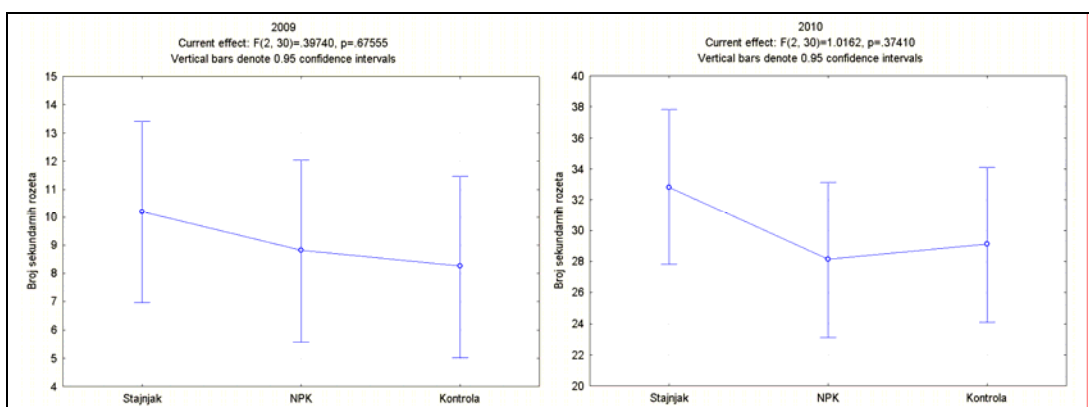
Grafik 37. Prosečan broj sekundarnih rozeta na ogledu arnike u 2009. godini

U 2010. godini broj sekundarnih rozeta na ogledu se kretao od 25,3 – 35,0 (Grafik 38). Nisu uočene statistički značajne razlike između posmatranih varijanti, ali se može reći da je na prolećnom plotu sadnje varijanta đubrenja mineralnim đubrivom formirala najveći broj sekundarnih rozeta, dok su nasuprot ovome varijante mineralnog đubrenja na jesenjem plotu sadnje formirale najmanji broj sekundarnih rozeta. Takođe varijante đubrene stajskim đubrivom su, u ovoj godini, na jesenjem plotu sadnje formirale najveći broj sekundarnih rozeta.



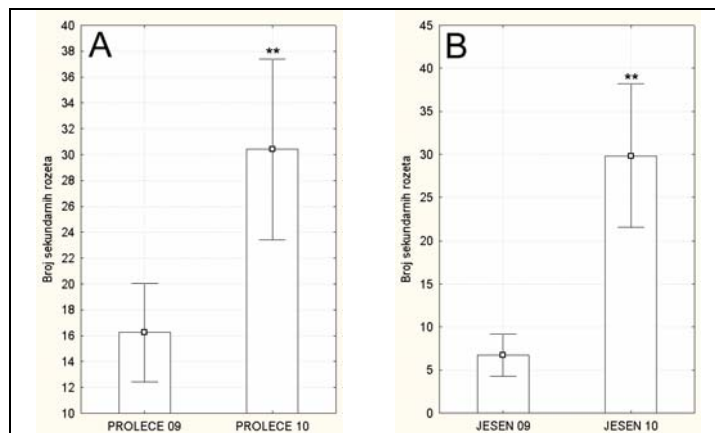
Grafik 38. Prosečan broj sekundarnih rozeta na ogledu arnike u 2009. godini

Uticaj faktora đubrenja na broj sekundarnih rozeta, posmatrajući variranje vrednosti ovog parametra na celom ogledu, nije bio statistički značajan ni u jednoj od posmatranih godina (Grafik 39). Verovatnoće prihvatanja nulte hipoteze o jednakosti aritmetičkih sredina osnovnih skupova blokova đubrenja ocenjene su verovatnoćom $p=0,37$ u 2009., odnosno $p=0,34$ u 2010. godini.



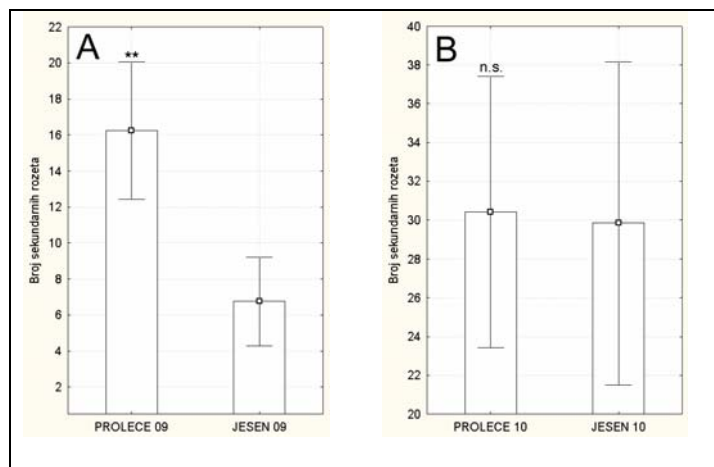
Grafik 39. Uticaj faktora đubrenja na broj sekundarnih rozeta arnike u 2009. i 2010. godini.

Broj rozeta je na oba plota sadnje bio statistički veoma značajno viši u 2010. godini u odnosu na 2009. godinu (Grafik 40). Tako su se vrednosti ovog parametra na prolećnom plotu sadnje kretale oko 16,2 rozete, u 2009. godini, i oko 30,4 rozete, u 2010. godini (Grafik 40A). Isto tako su se vrednosti ovog parametra na jesenjem plotu sadnje kretale oko 6,7 rozete, u 2009. godini, i oko 29,8 rozete u 2010. godini (Grafik 40B).



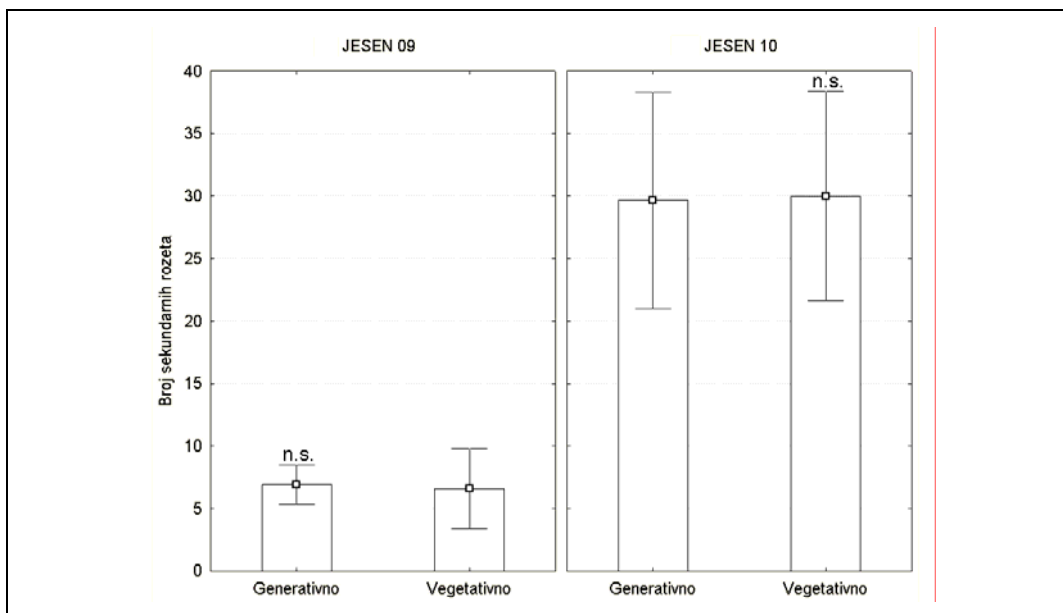
Grafik 40. Uticaj starenja na broj sekundarnih rozeta arnike na prolećnom (A) i jesenjem (B) plotu sadnje

Uticaj vremena zasnivanja na broj sekundarnih rozeta na ogledu arnike bio je statistički veoma značajan samo u 2009. godini (Grafik 41), gde su biljke sadene na proleće formirale veći broj sekundarnih rozeta ($\bar{x} = 16,3$ cm) u odnosu na biljke sadene na jesen ($\bar{x} = 6,7$ cm) (Grafik 41A). Broj formiranih sekundarnih rozeta se u 2010. godini na oba plota sadnje ujednačava (oko 30 rozeta na oba plota sadnje), pa razlike između sredina testiranih skupova nisu statistički značajne (Grafik 41B).



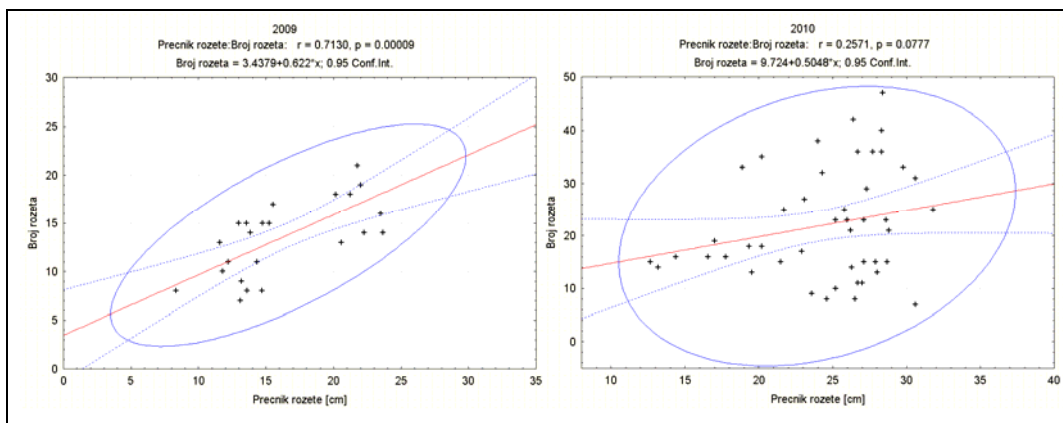
Grafik 41. Uticaj vremena zasnivanja na broj sekundarnih rozeta arnike u 2009. (A) i 2010. (B) godini

Uticaj vrste sadnica na broj sekundarnih rozeta na jesenjem plotu sadnje u obe posmatrane godine nije bio statistički značajan (Grafik 42).



Grafik 42. Uticaj vrste sadnica na broj sekundarnih rozeta na jesenjem plotu sadnje u 2009. i 2010. godini

Parametar broj sekundarnih rozeta je bio u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji ($r=0,71$) sa prečnikom rozete samo u 2009. godini (Grafik 43).



Grafik 43. Odnosi prečnika rozete i broja sekundarnih rozeta na ogledu arnike u 2009. i 2010. godini

Isto tako značajne pozitivne korelacije broj sekundarnih rozeta ostvaruje u 2009. godini sa većinom prethodno obrađivanih morfoloških osobina (Tabela 16), dok sa prečnikom cvetne glavice gradi negativno korelisanu vezu ($r = -0,46$).

U 2010. godini gubi se jačina i statistička značajnost korelacionih odnosa posmatranog parametra sa visinom cvetnog izdanka i brojem cvetnih glavica po biljci, dok jačina ostalih veza slabi.

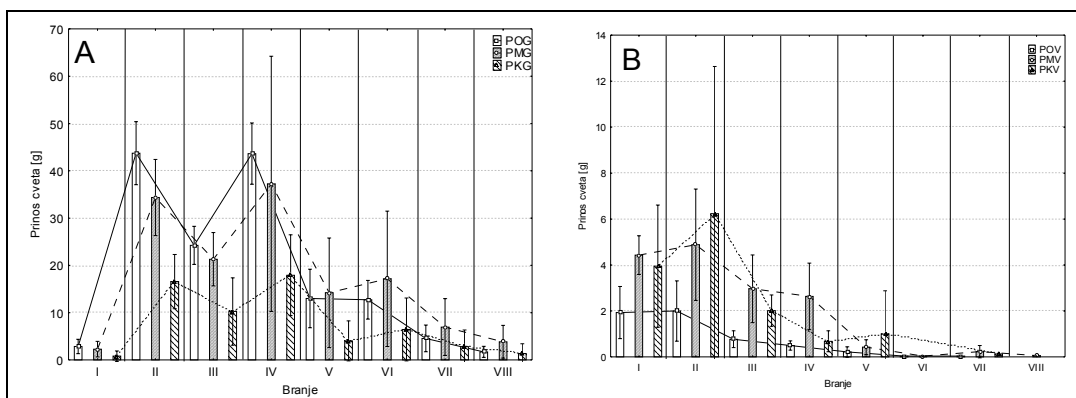
Tabela 16. Odnosi parametra broj sekundarnih rozeta arnike sa prethodno proučavanim osobinama

	2009	2010
	r	r
Visina cvetnog izdanka	.6460 p=.001	.1894 p=.197
Broj cvetnih izdanaka	.6914 p=.000	.2959 p=.041
Broj cvetnih glavica po biljci	.7160 p=.000	.1425 p=.334
Precnik cvetne glavice	-.4566 p=.025	-.3784 p=.008

6.2. Prinosi

Prinos cvetnih glavica

U 2009. godini obavljeno je osam žetvi cvetnih glavica arnike samo na prolećnom plotu sadnje. Najveće mase ubranog cveta (15,5 – 30,2%) bile su u drugoj, trećoj i četvrtoj žetvi kod biljaka iz generativne propagacije (Grafik 44A), odnosno u prvoj, drugoj i trećoj (11,4 – 47,1%) kod biljaka razmnoženih deobom bokora (Grafik 44B) (Tabela 17).



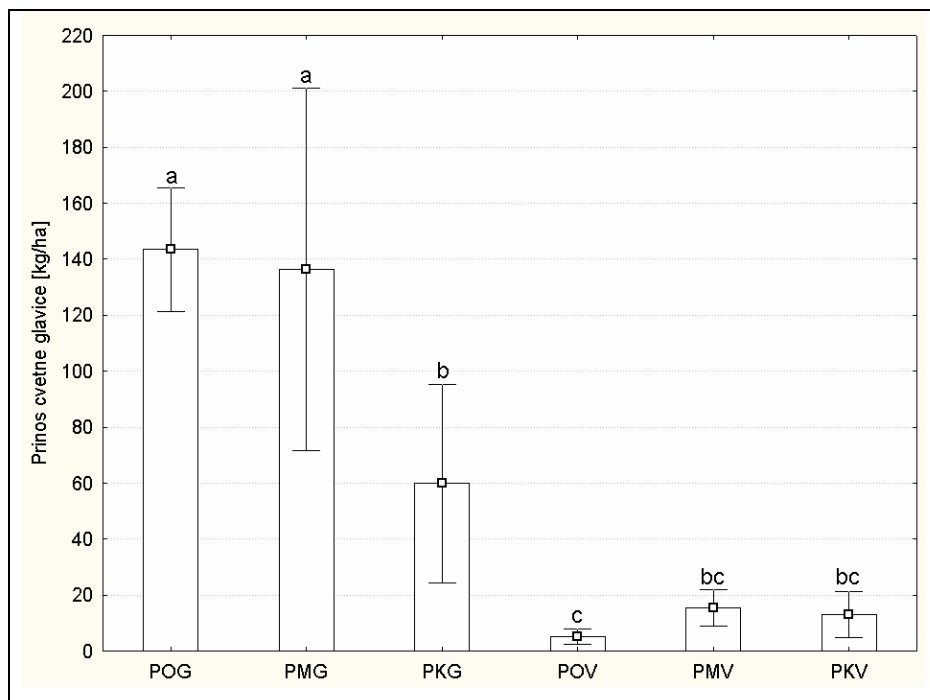
Grafik 44. Prinosi cveta u 2009. godini po berbama na prolećnom delu ogleda sa generativnim (A) i vegetativnim (B) sadnicama

Tabela 17. Prinosi cvetnih glavica [%] u svakoj pojedinačnoj žetvi u 2009. godini

	21. maj	25. maj	27. maj	3. jun	5. jun	8. jun	10. jun	15. jun
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
POG	1.5	30.2	16.8	30.2	9.0	8.8	2.4	1.2
PMG	1.7	25.0	15.5	27.1	10.3	12.5	5.1	2.8
PKG	1.4	27.5	17.0	29.7	6.7	10.7	4.7	2.3
POV	37.0	38.3	14.8	7.2	2.1	0.4	0.2	0.0
PMV	28.6	31.5	19.1	17.0	2.8	0.1	0.7	0.2
PKV	29.9	47.1	11.4	3.9	7.5	0.0	0.2	0.0

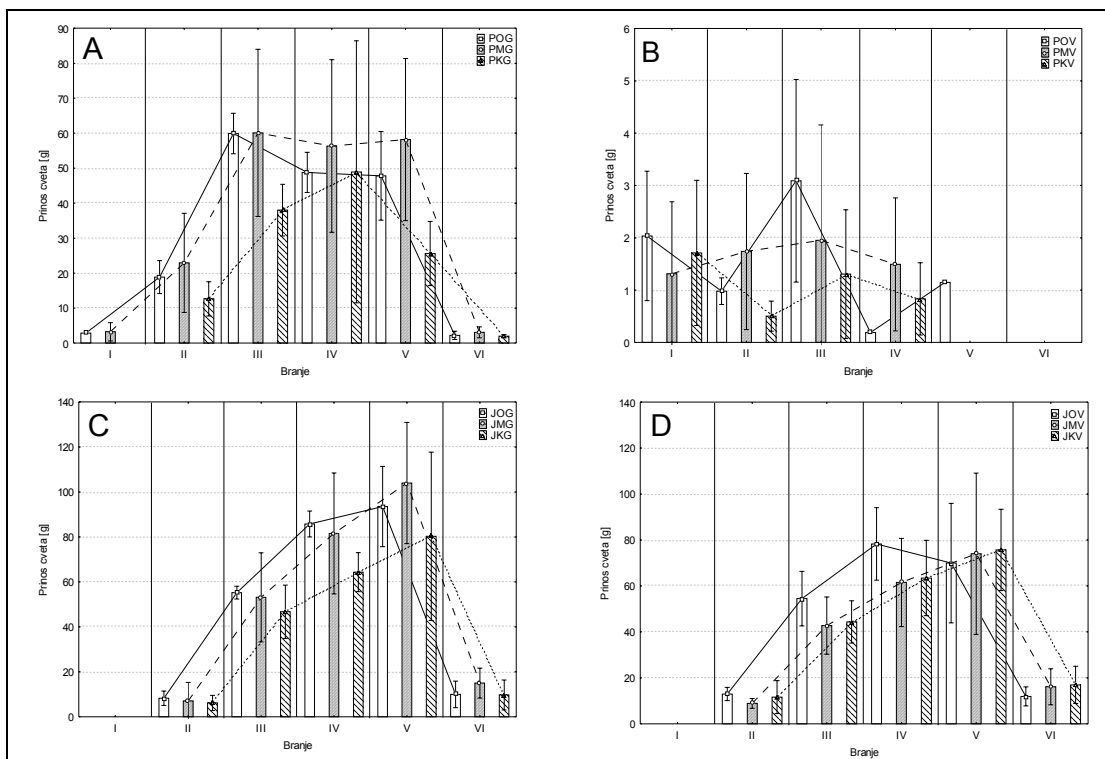
Prinosi cvetnih glavica u 2009. godini su se kretali od 5.2 – 143.6 kg/ha (Grafik 45). Iz prikazanih podataka se može videti da su biljke iz generativnih varijanti razmnožavanja imale znatno veće prinose cvetnih glavica od biljaka iz vegetativne propagacije. Takođe se može zaključiti da je uticaj đubrenja bio statistički značajan samo na varijantama generativnog razmnožavanja, gde su đubrene varijante dale veće

prinose ($\bar{x} = 143,6$ kg/ha, varijanta đubrena stajnjakom, i 136,4 kg/ha, varijanta đubrena NPK) od kontrolne varijante ($\bar{x} = 59,8$ kg/ha). Prinosi na delu ogleda razmnoženim deljenjem bokora su bili znatno skromniji i kretali su se od 5,2 – 15,4 kg/ha.



Grafik 45. Prosečni prinosi cvetnih glavica arnike u 2009. godini

U 2010. godini obavljene su šest žetvi cvetnih glavica arnike. Dinamika žetvi u ovoj godini je bila slična kao u 2009. godini. Preko 70% ubranog cveta raspoređeno je u tri žetve i to u trećoj, četvrtoj i petoj, u svim varijantama osim u varijantama vegetativnog razmnožavanja na prolećno sađenom plotu, gde su najmasovnije bile prve tri žetve (Grafik 46ABCD i Tabela 18).



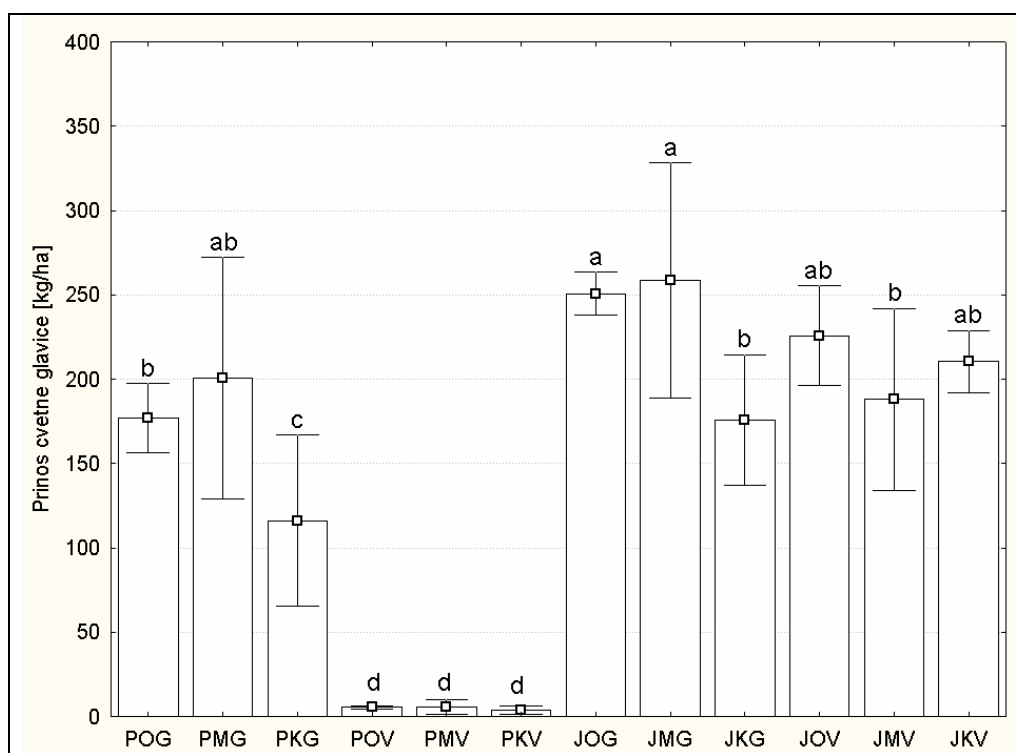
Grafik 46. Prinosi cveta u 2010. godini po berbama na prolećnom delu ogleda sa generativnim (A) i vegetativnim (B) sadnicama; na jesenjem delu ogleda sa generativnim (C) i vegetativnim (D) sadnicama.

Tabela 18. Prinosi cvetnih glavica [%] u svakoj pojedinačnoj žetvi u 2010. godini

	24. maj	28. maj	31. maj	8. jun	11. jun	15. jun
	I	II	III	IV	V	VI
POG	0.4	10.6	33.6	27.4	26.8	1.2
PMG	1.2	11.3	29.7	27.9	28.8	1.1
PKG	0.0	10.8	24.3	41.8	21.8	1.3
POV	11.4	3.6	82.5	0.4	2.1	0.0
PMV	22.8	22.7	34.0	20.4	0.0	0.0
PKV	46.3	10.2	26.5	16.9	0.0	0.0
JOG	0.0	3.3	21.9	33.9	37.0	4.0
JMG	0.0	2.7	20.4	31.3	39.9	5.8
JKG	0.0	3.5	19.8	27.2	45.3	4.1
JOV	0.0	5.7	23.9	34.4	30.7	5.2
JMV	0.0	4.7	22.6	25.1	39.1	8.5
JKV	0.0	5.5	20.9	29.9	35.7	8.0

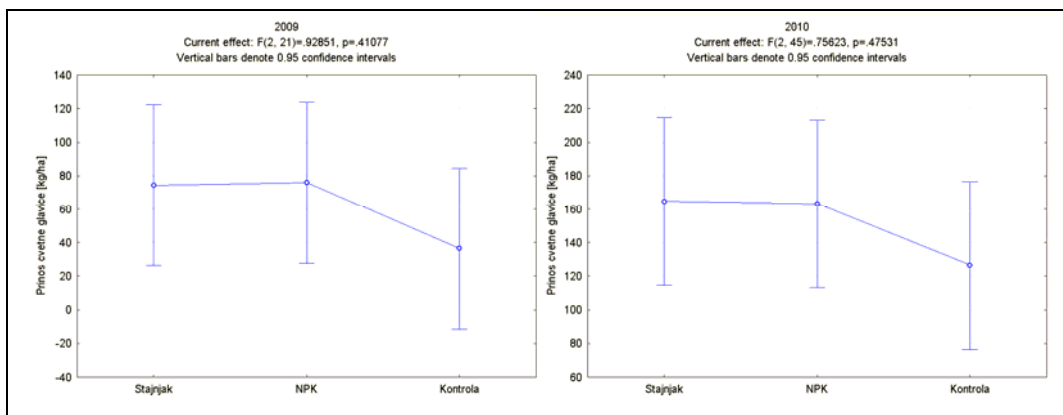
Prinosi cvetnih glavica u 2010. godini su se kretali od 3,7 – 258,7 kg/ha (Grafik 47). Na plotu prolećne sadnje biljke iz generativne propagacije su dale statistički značajno više prinose cvetnih glavica od biljaka razmnoženih vegetativnim putem. Kod biljaka iz generativne propagacije ovog plotu je, takođe je bio uočljiv i uticaj đubrenja

koji se ogledao u višim prinosima đubrenih varijanti ($\bar{x} = 176,9$ kg/ha, varijanta đubrena stajnjakom, i 200,4 kg/ha, varijanta đubrena NPK) u odnosu na kontrolu ($\bar{x} = 116,2$ kg/ha). Varijante vegetativnog razmnožavanja na prolećnom plotu sadnje su dale izuzetno niske prinose cvetnih glavica koji su se kretali od 3,7 – 5,6 kg/ha. Biljke jesenjeg plota sadnje su dale najveće prinose cvetnih glavica (od 175,7 – 258,7 kg/ha), ali je samo na generativno razmnoženim varijantama uticaj đubrenja bio statistički značajan. Ovde su đubrene varijante dale viši prinos cvetnih glavica ($\bar{x} = 250,9$ kg/ha, varijanta đubrena stajnjakom, i 258,7 kg/ha, varijanta đubrena NPK) u poređenju sa kontrolom ($\bar{x} = 175,8$ kg/ha).



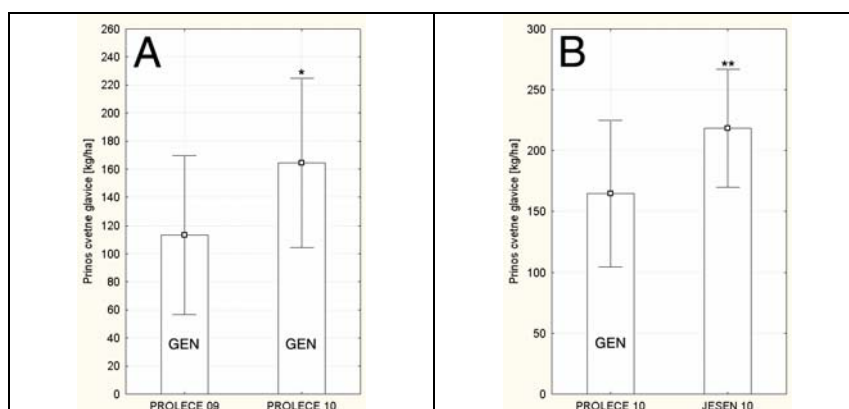
Grafik 47. Prosečni prinosi cvetnih glavica arnike u 2010. godini

Uprkos statistički značajnom uticaju faktora đubrenja na prinos cvetnih glavica u varijantama generativnog razmnožavanja, u oba plota sadnje, ukupan uticaj faktora đubrenja na ogledu arnike nije bio statistički značajan ni u jednoj godini posmatranja (Grafik 48). Prihvatanje nultih hipoteza o jednakosti aritmetičkih sredina osnovnih skupova blokova đubrenja u 2009. i 2010. godini, ocenjeno je sa verovatnoćama $p=0.41$ i $p=0.47$, respektivno.



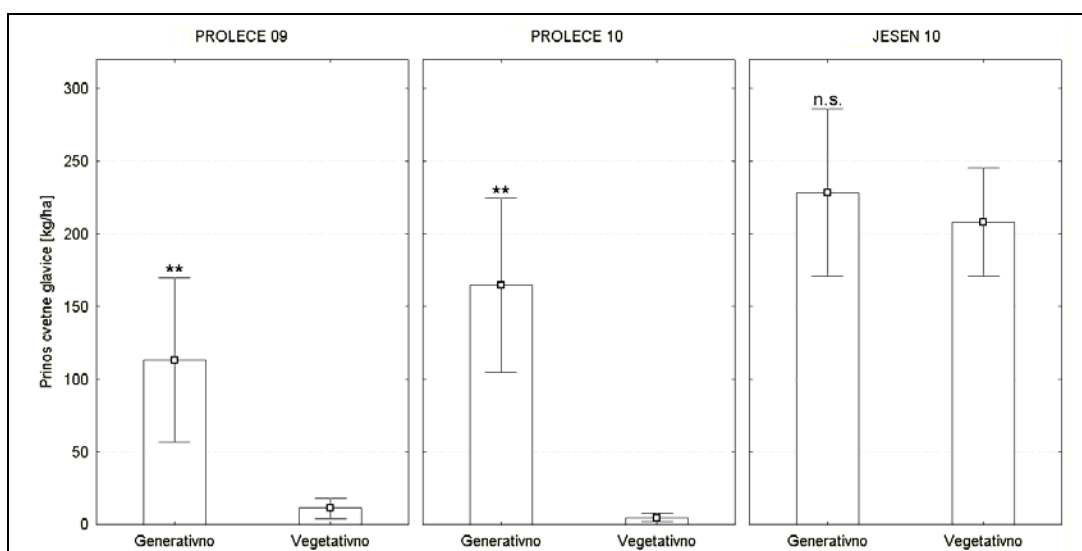
Grafik 48. Uticaj faktora vrste đubrenja na prinos cvetnih glavica arnike u 2009. i 2010. godini

Za testiranje uticaja faktora starenja biljaka i vremena sadnje sa prolećno sađenog plotu uzimane su u razmatranje samo biljke iz generativne propagacije (GEN)(Grafik 49), pošto se uključivanjem vegetativno razmnoženih varijanti ukupna varijansa značajno povećavala čime se prikrivala statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina osnovnih skupova vrednosti prinosa cvetne glavice u dve uzastopne godine. Isti princip posmatranja primenjen je i u narednom testu radi uniformnosti prikaza. Prinos cvetne glavice na prolećnom plotu sadnje u 2010. godini bio je očekivano statistički značajno viši od prinosa u 2009. godini, ali samo u slučaju izolovanog posmatranja generativno razmnoženih biljaka (Grafik 49A). U 2010. godini razlika između aritmetičkih sredina nivoa pronosa cvetne glavice na prolećnom i jesenjem plotu bila je statistički veoma značajna (Grafik 49B), gde su biljke iz jesenjeg dale više prinose ($\bar{x} = 218,3$ kg/ha) od biljaka iz prolećnog plotu sadnje ($\bar{x} = 84,8$ kg/ha).



Grafik 49. Uticaj starenja generativno razmnoženih biljaka (A) i vremena zasnivanja ogleđa (B) na prinos cvetnih glavica arnike

Uticaj faktora vrste sadnica je bio značajan samo na prolećnom plotu sadnje i to u obe posmatrane godine (Grafik 50). Na delu ogleda sađenom na proleće biljke iz generativne propagacije su u 2009. (odnosno 2010.) godini dale više prinose cvetnih glavica ($\bar{x} = 113,3$ kg/ha, odnosno $\bar{x} = 164,6$ kg/ha) od vegetativno razmnoženih varijanti ($\bar{x} = 11,2$ kg/ha, odnosno $\bar{x} = 4,9$ kg/ha). Na jesenjem plotu ogleda biljke iz generativne su takođe dale više prinose ($\bar{x} = 228,4$ kg/ha) u odnosu na one iz vegetativne propagacije ($\bar{x} = 208,1$ kg/ha), ali razlike njihovih aritmetičkih sredina nisu bile statistički značajne (Prilog 4 B).



Grafik 50. Uticaj vrste sadnica na prinos cvetne glavice arnike u 2009. i 2010. godini

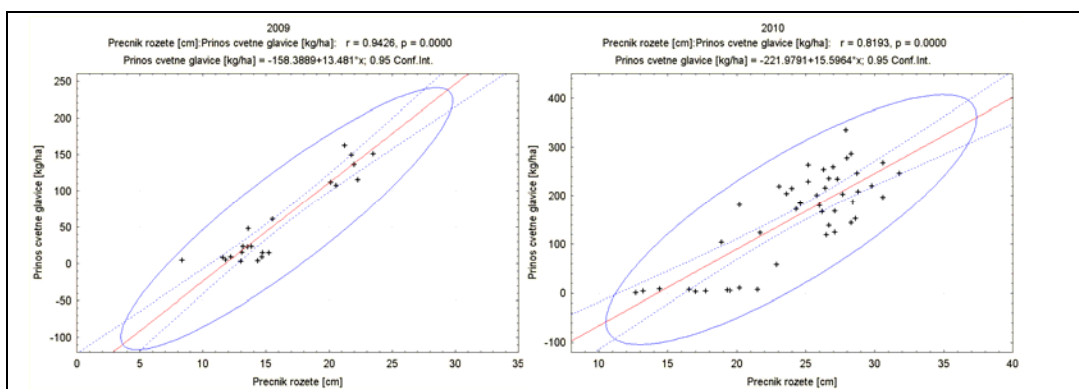
U Tabeli 19. dat je pregled dve preračunate osobine na osnovu broja prisutnih biljaka na parcelici u trenutku žetve. Na osnovu ovog prikaza se može sagledati kakav bi bio prinostni potencijal pojedinih varijanti da nije bilo propadanja biljaka, odnosno da je na ogledu očuvan teoretski pun sklop od 71428 biljaka/ha (raspored 70 x 20 cm). Iz ove tabele se može zaključiti da bi u 2009. godini najviše prinose dale đubrene varijante generativnog tipa razmnožavanja, a najniže varijante vegetativnog razmnožavanja. Takođe na ovom plotu slična situacija se ponavlja i u 2010. godini, dok se na jesenjem plotu sadnje kao najprinosnija izdvaja varijanta generativnog razmnožavanja đubrena mineralnim đubrivom. Sve ostale varijante su po teoretskim prinosima vrlo ujednačene i bliske najboljoj varijanti, osim kontrolne varijante đubrenja kod generativnog tipa sadnica koja se statistički značajno razlikuje od ove grupe.

Tabela 19. Preračunati prinosi cveta po biljci i u teoretskom sklopu (71428 biljaka/ha)

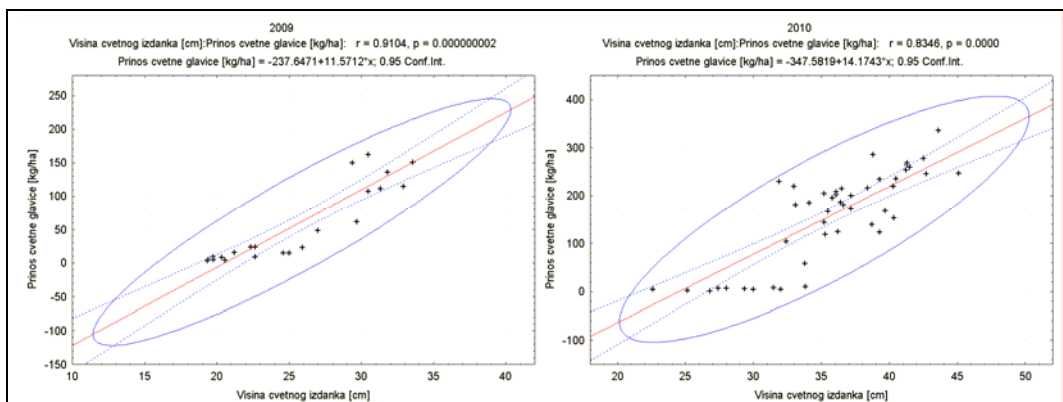
Varijanta	Prinos cveta po biljci [g] ^a	Teoretski prinos cveta [kg/ha]
2009		
POG	2.21 ± 0.42 a	158.14 ± 29.91 a
PMG	2.11 ± 0.93 a	150.83 ± 66.73 a
PKG	0.98 ± 0.52 b	69.67 ± 36.99 b
POV	0.86 ± 0.39 b	31.07 ± 2.25 b
PMV	0.67 ± 0.10 b	47.59 ± 7.30 b
PKV	0.43 ± 0.03 b	61.24 ± 28.18 b
2010		
POG	3.31 ± 0.64 de	236.20 ± 45.78 de
PMG	3.75 ± 1.20 cd	267.75 ± 85.84 cd
PKG	2.28 ± 1.05 e	163.08 ± 74.97 e
POV	1.90 ± 0.51 e	135.55 ± 36.29 e
PMV	2.04 ± 0.27 e	145.56 ± 19.45 e
PKV	1.40 ± 0.51 e	99.82 ± 36.49 e
JOG	5.39 ± 0.21 ab	384.90 ± 14.75 ab
JMG	5.84 ± 0.92 a	417.09 ± 65.44 a
JKG	4.20 ± 1.04 bcd	299.72 ± 74.44 bcd
JOV	5.26 ± 0.76 ab	375.49 ± 54.24 ab
JMV	4.87 ± 1.24 abc	347.69 ± 88.41 abc
JKV	4.98 ± 0.55 abc	355.56 ± 39.33 abc

^a Razlicita slova označavaju statisticku znacajnost Dankanovog testa na nivou $p < 0.05$

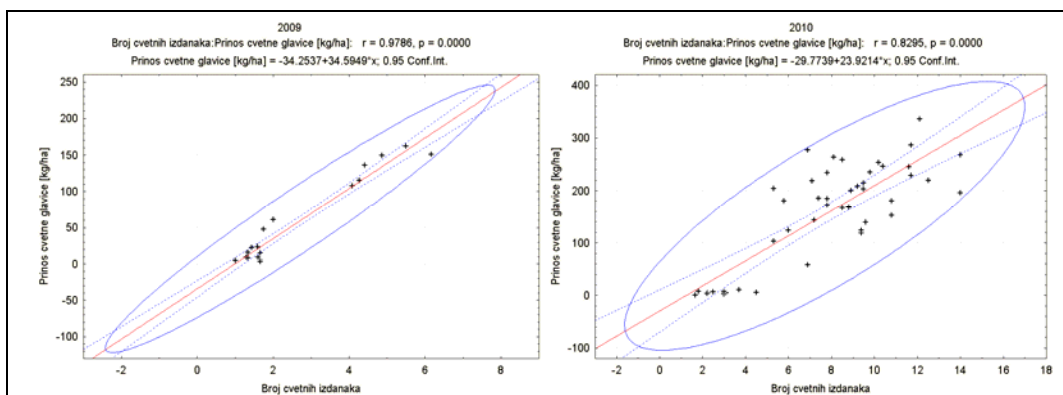
Prinos cvetne glavice u obe posmatrane godine gradi pozitivne korelacione odnose sa određenim brojem morfoloških parametara kako što su: prečnik rozete ($r=0,94$ u 2009, i $r=0,82$ u 2010. godini) (Grafik 51), visina cvetnog izdanaka ($r=0,91$ i $r=0,83$) (Grafik 52), broj cvetnih izdanaka ($r=0,91$ i $r=0,83$) (Grafik 53) i broj cvetnih glavica po biljci ($r=0,95$ i $r=0,86$) (Grafik 54).



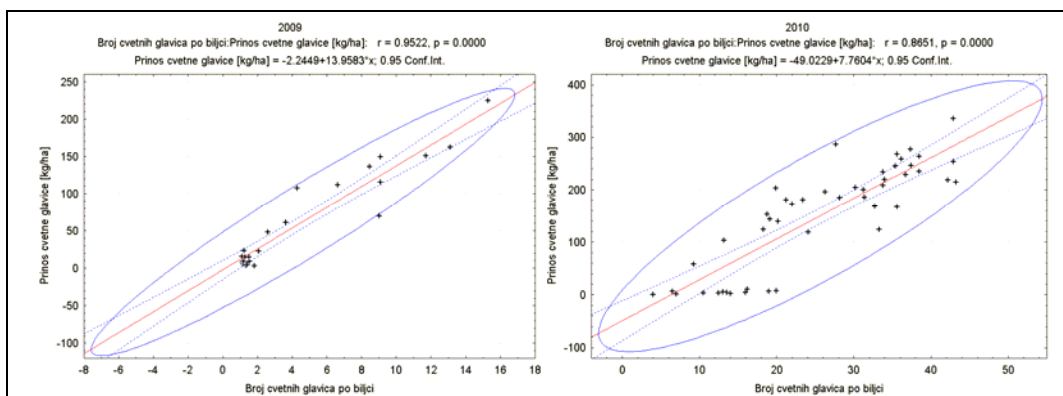
Grafik 51. Odnosi prečnika rozeta sa prinisom cvetne glavice na ogledu arnike u 2009. i 2010. godini



Grafik 52. Odnosi visina cvetnih izdanaka sa prinosom cvetne glavice na ogledu arnike u 2009. i 2010. godini



Grafik 53. Odnosi broja cvetnih izdanaka sa prinosom cvetne glavice na ogledu arnike u 2009. i 2010. godini



Grafik 54. Odnosi broja cvetnih glavica po biljci sa prinosom cvetne glavice na ogledu arnike u 2009. i 2010. godini

Izmereni prečnici cvetnih glavica su ostvarili statistički značajan negativno korelisan odnos sa prinosom cvetne glavice u 2009. godini ($r = -0,60$), ali se taj odnos nije zadržao i u 2010. godini (Tabela 14). Takođe broj formiranih sekundarnih rozeta u

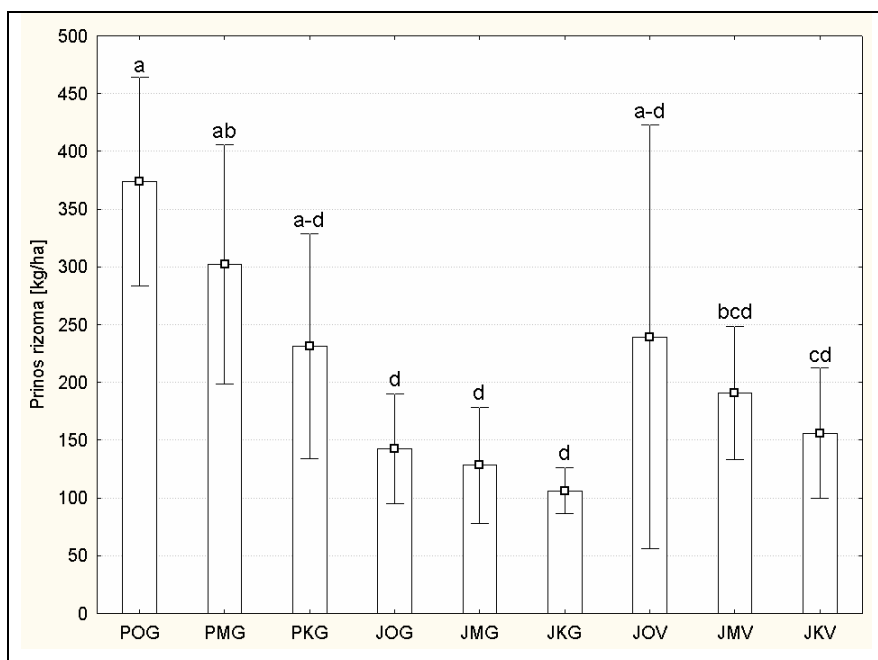
2009. godini ostvaruje pozitivno korelisan odnos ocenjen statistički veoma značajno ($r=0,74$), koji se gubi u narednoj godini (Tabela 20).

Tabela 20. Korelacioni odnosi prinosa cvetne glavice sa prečnikom cvetne glavice i brojem sekundarnih rozeta

	Prinos cvetne glavice [kg/ha]	
	2009	2010
	r	r
Precnik cvetne glavice [cm]	-0.6048 p=.002	.0656 p=.658
Broj sekundarnih rozeta	.7467 p=.000	.2328 p=.111

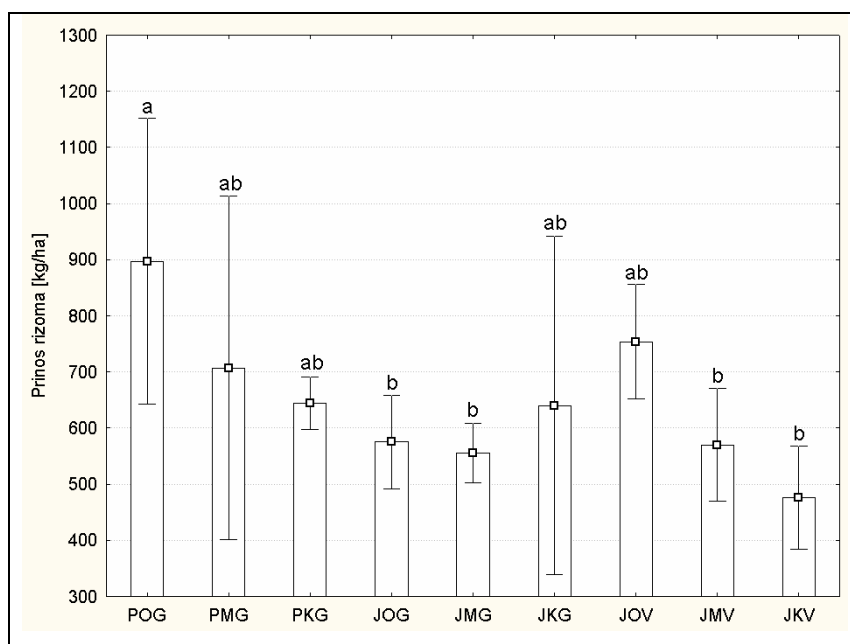
Prinos rizoma

U 2009. godini prinosi rizoma su se kretali od 106,3 – 373,7 kg/ha, gde je najveći prinos izmeren na prolećnom plotu sadnje kod varijante generativnog razmnožavanja u bloku đubrenja stajskim đubrivom ($\bar{x} = 373,7$ kg/ha), a najniže prinose rizoma imale su varijante generativnog razmnožavanja na jesenjem plotu sadnje (od 106,3 – 142,5 kg/ha) (Grafik 55) (Prilog 5 A, D i E). Uticaj đubrenja u ovoj godini nije bio statistički značajan ni u jednoj od posmatranih varijanti tipa sadnica.

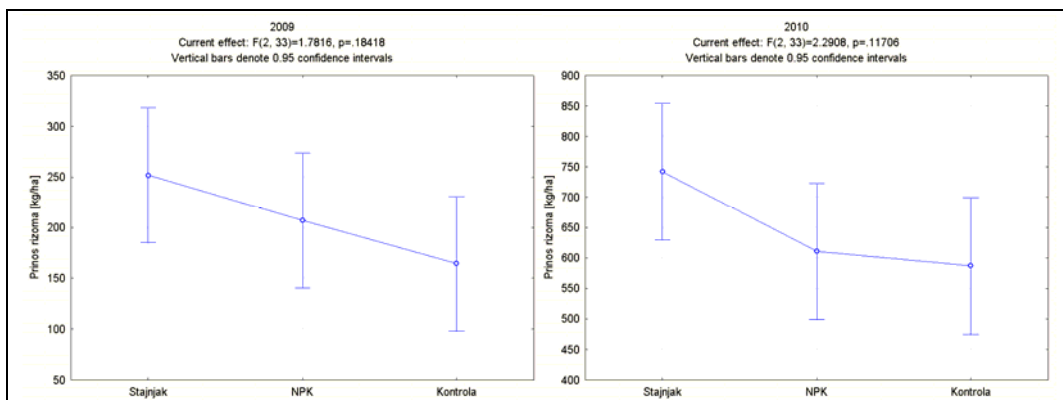


Grafik 55. Prosečni prinosi rizoma na ogledu arnike u 2009. godini

U 2010. godini prinosi rizoma su se kretali od 475,9 – 897,5 kg/ha (Grafik 56). Prinosi rizoma su na celom ogledu po svim varijantama bili prilično ujednačeni, a uticaj đubrenja, kao u prethodnoj godini nije bio statistički značajan.

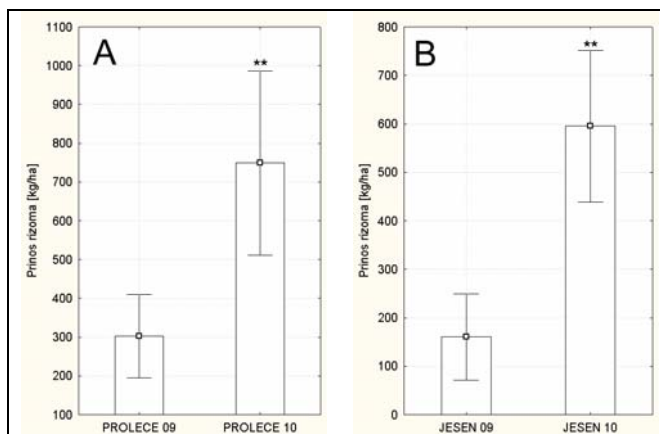
**Grafik 56.** Prosečni prinosi rizoma na ogledu arnike u 2010. godini

Skroman uticaj faktora vrste đubrenja po varijantama se istim takvim pokazao i na celom ogledu, gde razlike između tretmana ni u jednoj posmatranoj godini nisu bile statistički značajne (Grafik 57). Hipoteze o jednakosti aritmetičkih sredina skupova su ocenjene verovatnoćama $p=0,18$ u 2009. godini, i $p=0,11$ u 2010. godini.



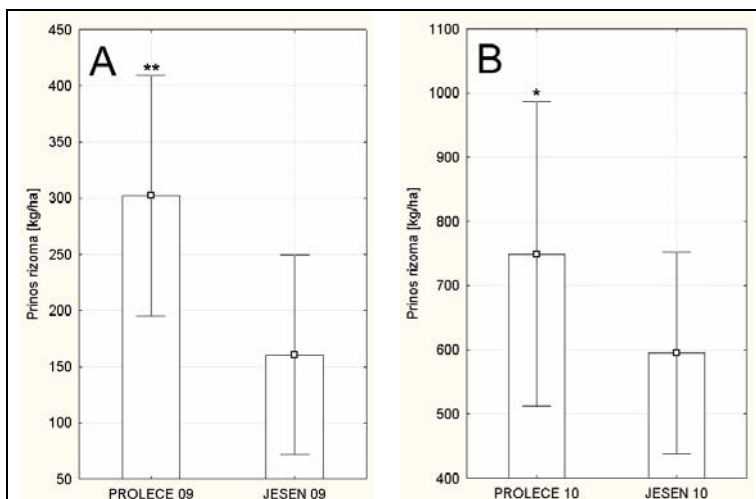
Grafik 57. Uticaj vrste đubrenja na prinos rizoma u 2009. i 2010. godini

Prinos rizoma je na oba plotu sadnje u 2010. godini bio statistički značajno viši nego u 2009. godini (Grafik 58A i B).



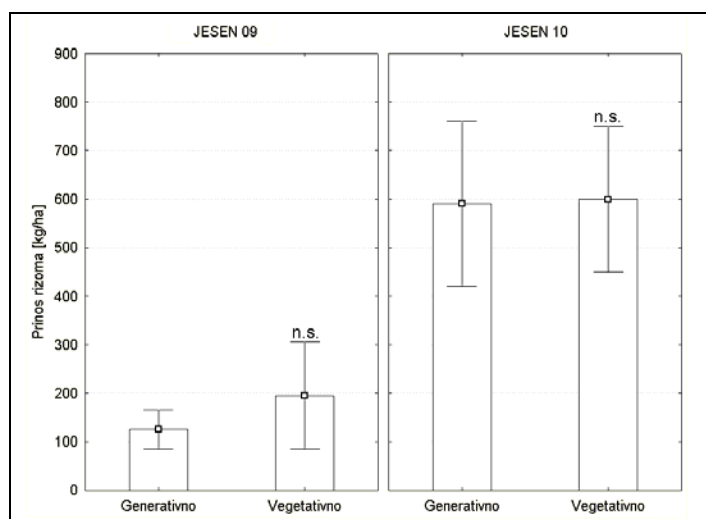
Grafik 58. Uticaj starenja na prinos rizoma brđake na prolećnom (A) i jesenjem (B) plotu sadnje

Biljke sa prolećnog plotu sadnje su dale u obe posmatrane godine stitistički značajno veće prinose u odnosu na biljke sa jesenjeg plotu sadnje (Grafik 59 A i B).



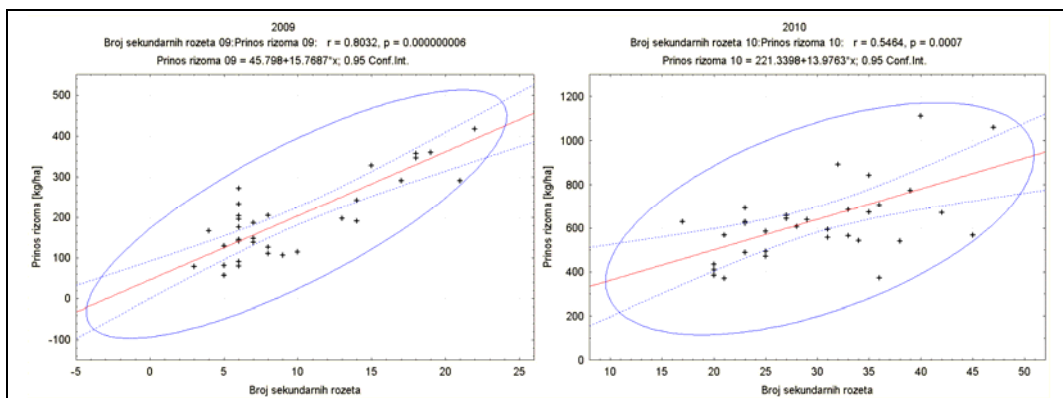
Grafik 59. Uticaj faktora vremena zasnivanja na prinos rizoma brđake u 2009. (A) i 2010. (B) godini

Uticaj faktora vrste sadnica na prinos rizoma ni u jednoj od posmatranih godina na jesenjem plotu sadnje nije bio značajan (Grafik 60).



Grafik 60. Uticaj faktora vrste sadnica na prinos rizoma arnike u 2009. i 2010. godini na jesenjem plotu sadnje

Jačina veze između broja sekundarnih rozeta i prinosa rizoma okarakterisana je statistički značajnim pozitivnim korelacijama, pa se može reći da je veza između ove dve osobine u 2009. godini bila jaka ($r = 0,80$), a u 2010. godini osrednja ($r = 0,54$) (Grafik 61).



Grafik 61. Jačina zavisnosti prinosa rizoma od broja sekundarnih rozeti

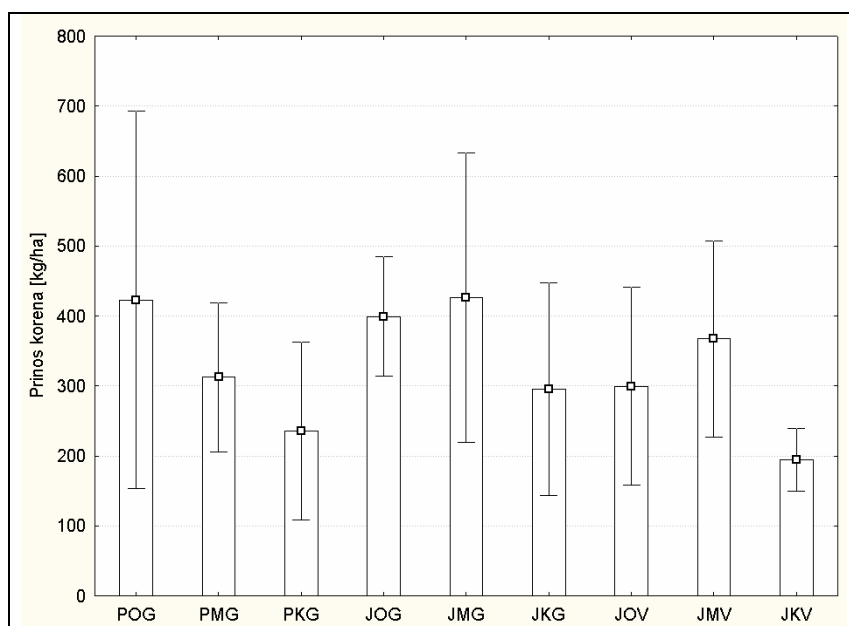
Veze sa ostalim posmatranim osobinama nisu bile statistički značajne osim veze sa brojem cvetnih glavica po biljci, koja je u 2009. godini okarakterisana kao osrednja pozitivna korelacija ($r = 0,59$), a u 2010. godini kao slaba negativna korelacija ($r = -0,39$) (Tabela 21).

Tabela 21. Korelacioni odnosi prinosa rizoma sa ostalim posmatranim osobinama

	Prinos rizoma [kg/ha]	
	2009	2010
	r	r
Precnik rozete [cm]	.4478 p=.144	-.0507 p=.772
Visina cvetnog izdanaka [cm]	.3121 p=.323	-.1624 p=.351
Broj cvetnih izdanaka	.5613 p=.058	-.0393 p=.823
Broj cvetnih glavica po biljci	.5934 p=.042	-.3931 p=.019
Precnik cvetne glavice	.4301 p=.163	-.1584 p=.363
Prinos cvetne glavice [kg/ha]	.5632 p=.057	-.2833 p=.099

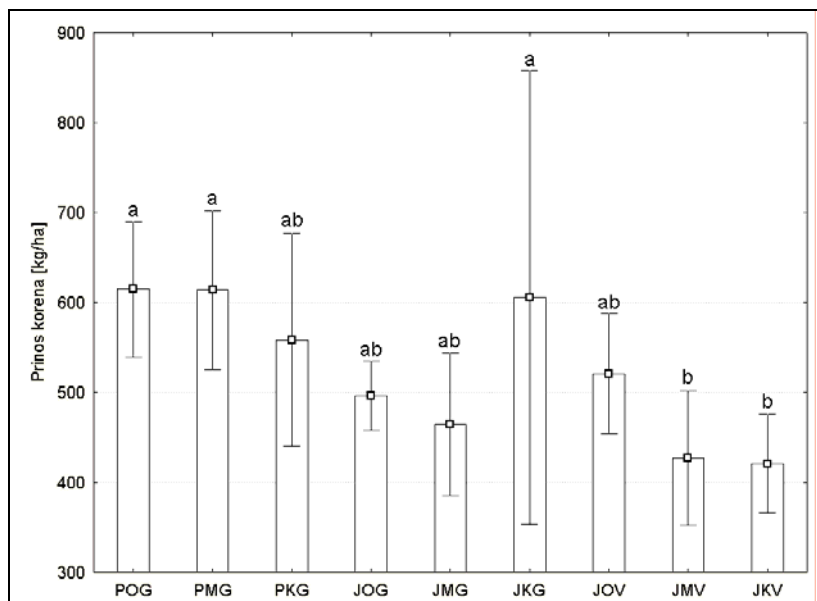
Prinos korena

Prosečne vrednosti prinosa korena u 2009. godini na ogledu arnike su se kretale od 194,3 – 426,4 kg/ha (Grafik 62) (Prilog 5 A, B i C). Iako su đubrene varijante, po svakom tipu sadnica, na oba plota sadnje, bile priniosnije od kontrolnih varijanti, između aritmetičkih sredina svih varijanti na ogledu nisu uočene statistički značajne razlike ($F_{8, 27}=1,1240$, $p=0,3790$).



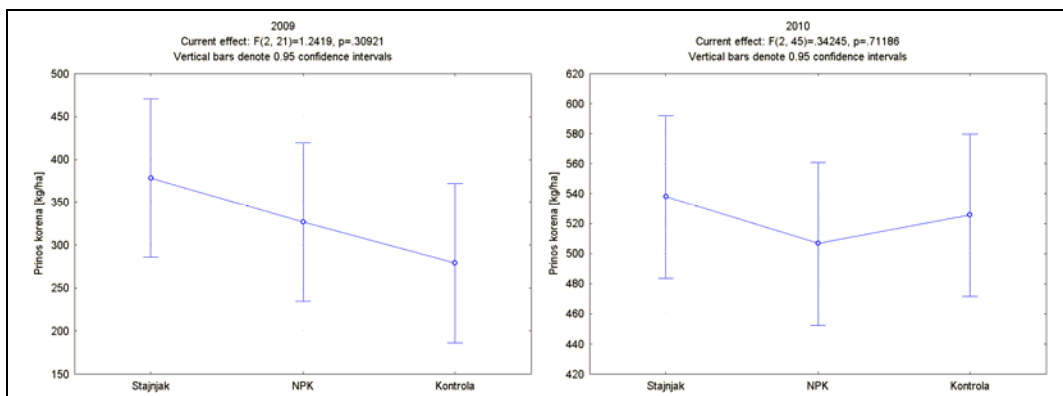
Grafik 62. Prinosi korena arnike u 2009. godini

U 2010. godini prinosi korena su se kretali od 420,7 – 614,7 kg/ha (Grafik 63). Najveće prinose su postigle đubrene varijante generativno razmnoženih biljaka na prolećnom plotu sadnje i kontrolna varijanta generativnog razmnožavanja na jesenjm plotu sadnje (605,5 – 614,7 kg/ha). Statistički značajno najniže prinose korena su imale varijante vegetativnog razmnožavanja u bloku mineralnog đubrenja i kontrole na jesenjm plotu sadnje (427,5 kg/ha i 420,7 kg/ha, respektivno).



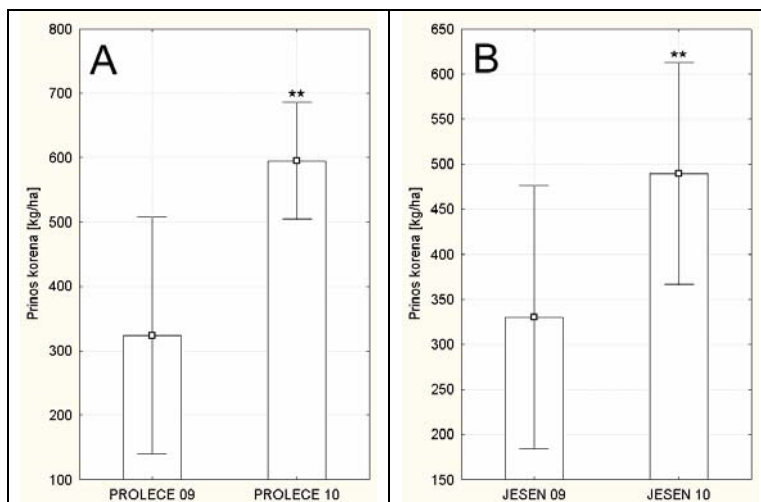
Grafik 63. Prinosi korena arnike u 2010. godini

Uticaj faktora vrste đubrenja u obe posmatrane godine nije uzrokovao variranje prinosa korena arnike na ogledu da bi se razlike između blokova đubrenja mogle oceniti kao statistički značajne (Grafik 64).



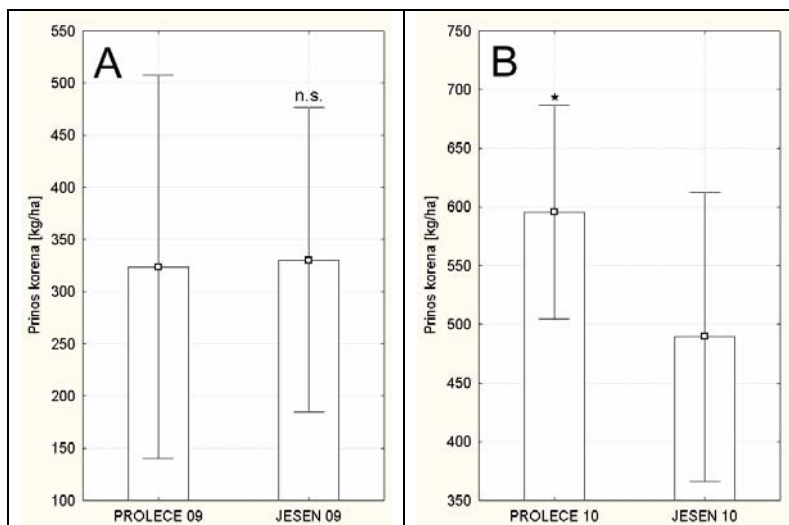
Grafik 64. Uticaj đubrenja na prinos korena arnike u 2009. i 2010. godini

Prinosi korena u 2010. godini su na oba plota sadnje po visini nadmašili prinose iz 2009. godine (Grafik 65). Uticaj starenja u pogledu prinosa korena je ocenjen kao statistički veoma značajan.



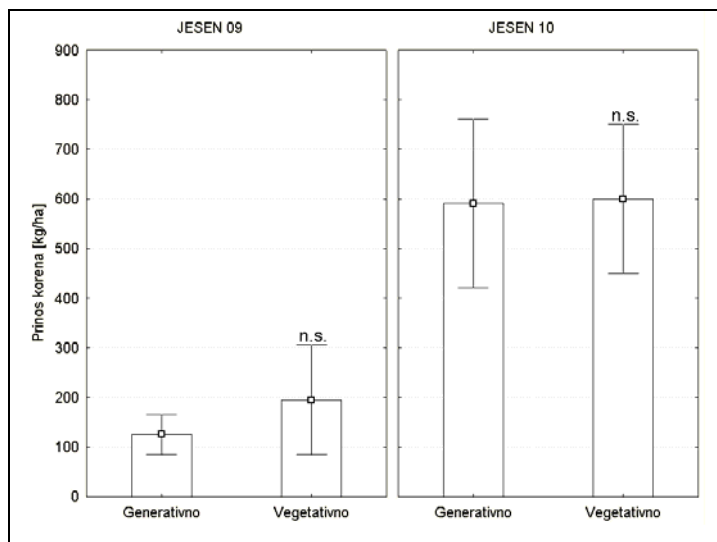
Grafik 65. Uticaj starenja na prinos korena na prolećnom (A) i jesenjem plotu (B) sadnje

Uticaj vremena sadnje je samo u drugoj posmatranoj godini (2010.) ocenjen statističkom značajnošću ($p < 0,05$) dok u prvoj godini (2009.) razlika između aritmetičkih sredina dva plotu sadnje nije bila statistički značajna (Grafik 66).



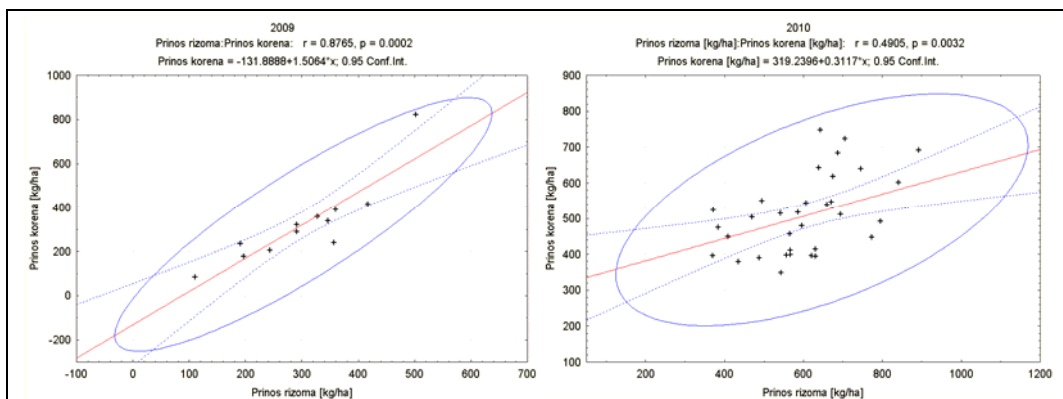
Grafik 66. Uticaj vremena sadnje na prinos korena u 2009. (A) i 2010. (B) godini

Uticaj faktora vrste sadnica na prinos korena nije bio statistički značajan ni u jednoj posmatranoj godini na jesenjem plotu sadnje (Grafik 67).



Grafik 67. Uticaj vrste sadnica na prinos korena arnike na jesenjem plotu sadnje

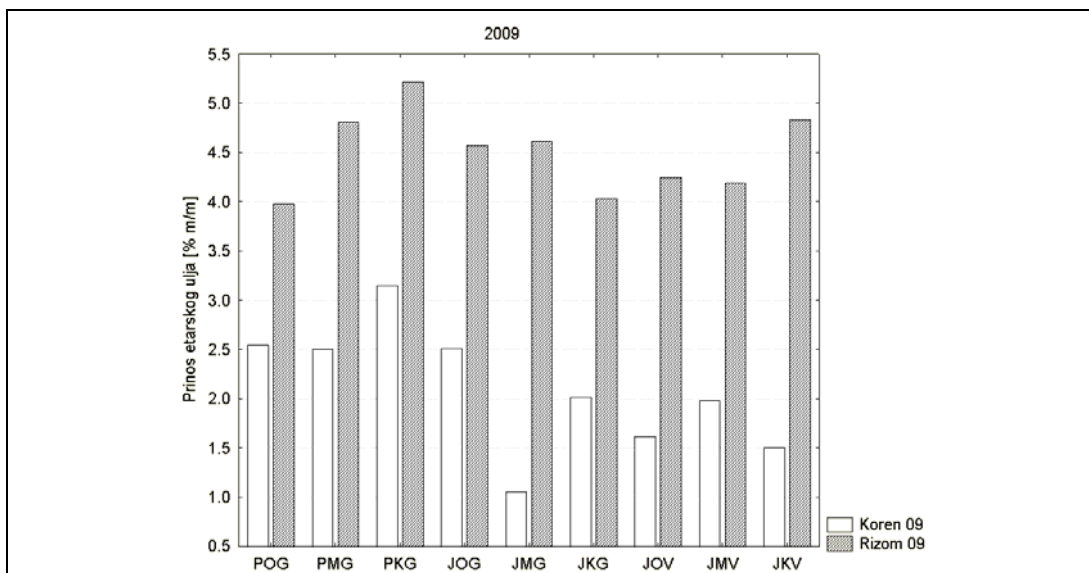
Prinos korena je u obe posmatrane godine pokazao statistički značajnu pozitivnu korelisanost da prinosom rizoma (Grafik 68). Tako je jačina veze ova dva svojstva u 2009. godini ocenjena kao jaka koeficijentom korelacije $r=0,88$, dok je u 2010. godini ocenjena kao osrednja koeficijentom $r=0,49$. Od veza sa ostalim osobinama prinos korena arnike u prvoj posmatranoj godini nije imao značajnih korelacija, dok je u drugoj godini ostvario slabu negativnu korelaciju sa osobinom broj cvetnih glavica po biljci koja je ocenjena koeficijentom $r = - 0,31$ i verovatnoćom $p=0,029$.



Grafik 68. Odnosi između prinosa rizoma i prinosa korena arnike u 2009. i 2010. godini.

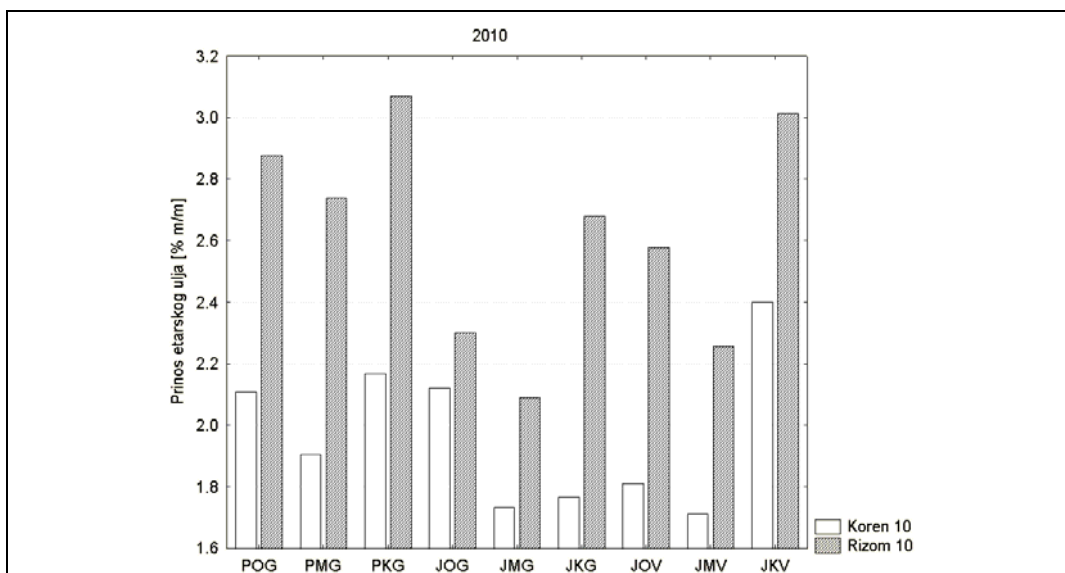
Prinos etarskog ulja korena i rizoma

Prinos etarskog ulja korena u 2009. godini kretao se od 1,05 – 3,15%, dok se prinos etarskog ulja rizoma kretao od 3,98 – 4,83% (Grafik 69).



Grafik 69. Procenat etarskog ulja u korenu i rizomu u 2009. godini po varijantama

U narednoj, 2010. godini, prinosi ova dva organa su se ujednačili, pa se prinos etarskog ulja u korenu kretao od 1,7 – 2,4 %, a u rizomu od 2,1 – 3,1% (Grafik 70).



Grafik 70. Procenat etarskog ulja u korenu i rizomu u 2010. godini po varijantama

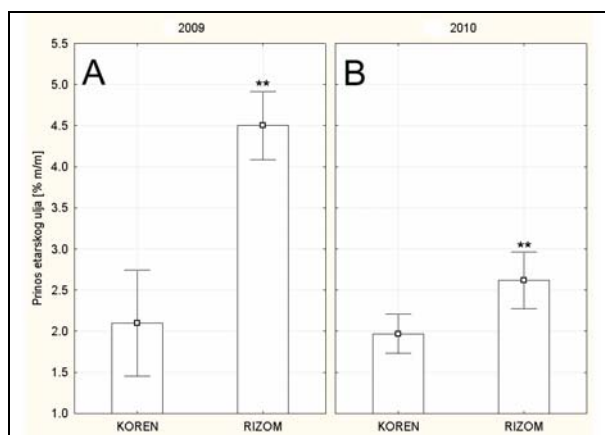
U Tabeli 22. dat je pregled verovatnoća prihvatanja nulte hipoteze o jednakosti aritmetičkih sredina prinosa etarskog ulja posmatranih blokova đubrenja. Iz prikazanog se može zaključiti da ni jedna predstavljena verovatnoća nije bila manja od 0,05, odnosno da uticaj faktora vrste đubrenja ni u jednoj posmatranoj godini nije imao statistički značajan uticaj na prinos etarskih ulja korena i rizoma.

Tabela 22. Uticaj faktora vrste đubrenja na prinos etarskog ulja korena i rizoma

		Vrsta đubrenja ^a
		p
2009		
Koren		0.7653
Rizom		0.5097
2010		
Koren		0.2489
Rizom		0.1288

^a Date p vrednosti predstavljaju verovatnoće prihvatanja nulte hipoteze

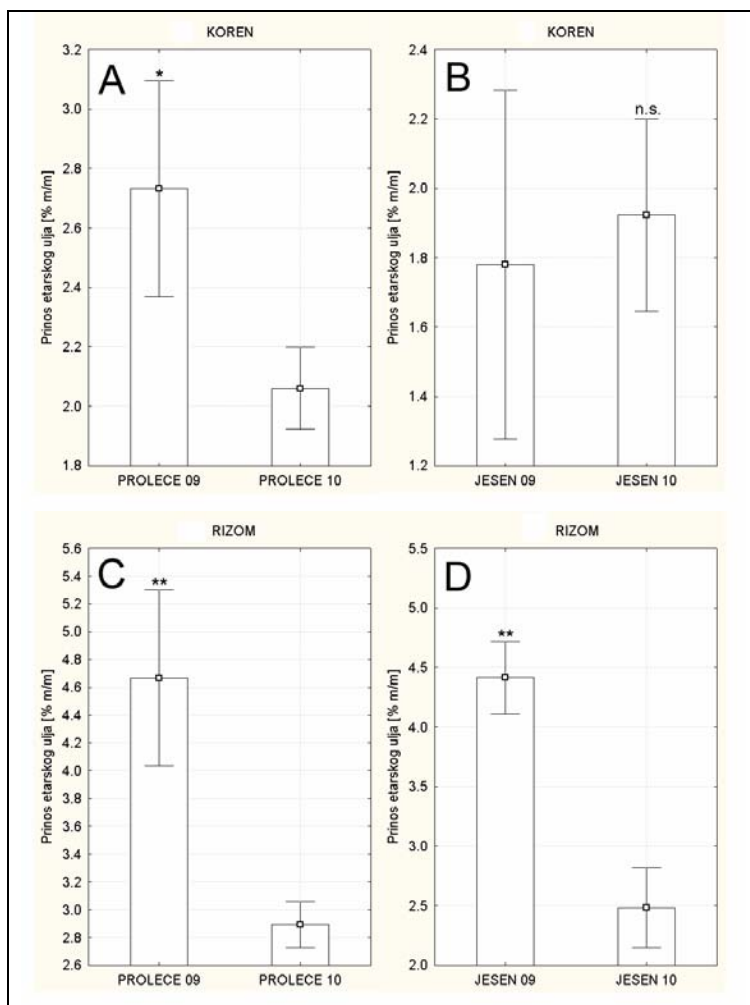
Prinos etarskog ulja (%) je u obe godine bio statistički veoma značajno viši u rizomu nego u korenu (Grafik 71 A i B)



Grafik 71. Prinosi etarskog ulja (%) u korenu i rizomu u 2009. (A) i 2010. (B) godini

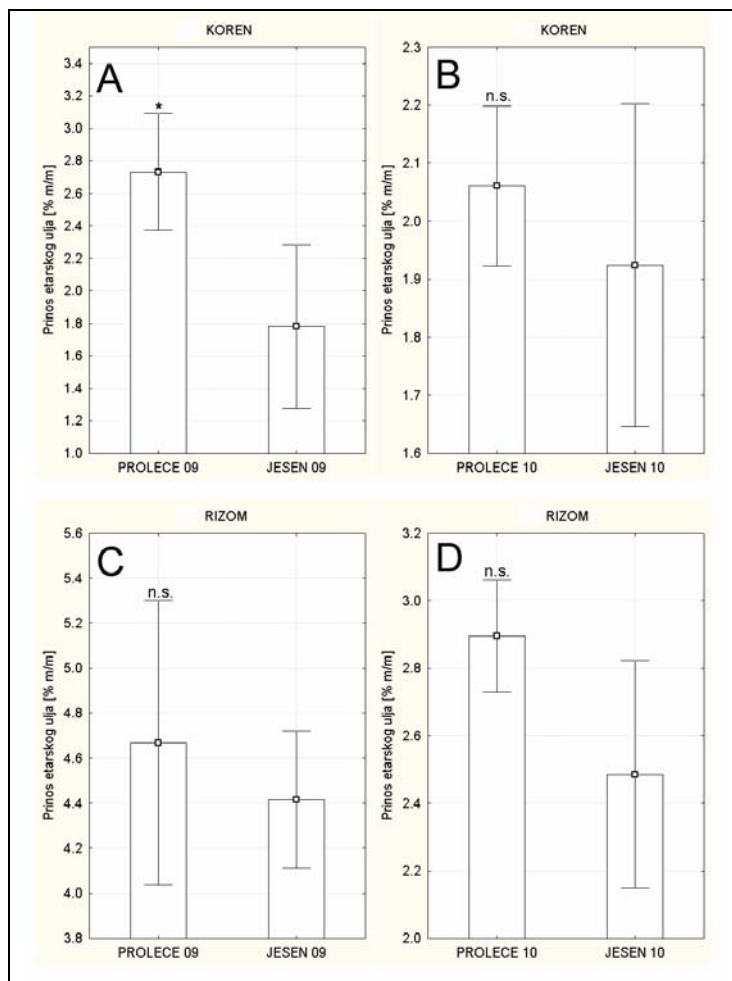
Uticaj starenja na prinos etarskog ulja u korenu je bio statistički značajan samo kod biljaka sa prolećnog plota sadnje (Grafik 72A i B), gde je procenat ulja u 2009. godini bio viši ($\bar{x} = 2,7\%$) u odnosu na 2010. godinu ($\bar{x} = 2,1\%$). Prinosi etarskog ulja u rizomu su na oba posmatrana plota bili statistički veoma značajno viši ($\bar{x} = 4,7\%$, na

prolećnom plotu i $\bar{x} = 4,4\%$, na jesenjem plotu) u 2009. godini u odnosu na 2010. godinu ($\bar{x} = 2,9\%$ na prolećnom plotu i $\bar{x} = 2,5\%$, na jesenjem plotu) (Grafik 72C i D).



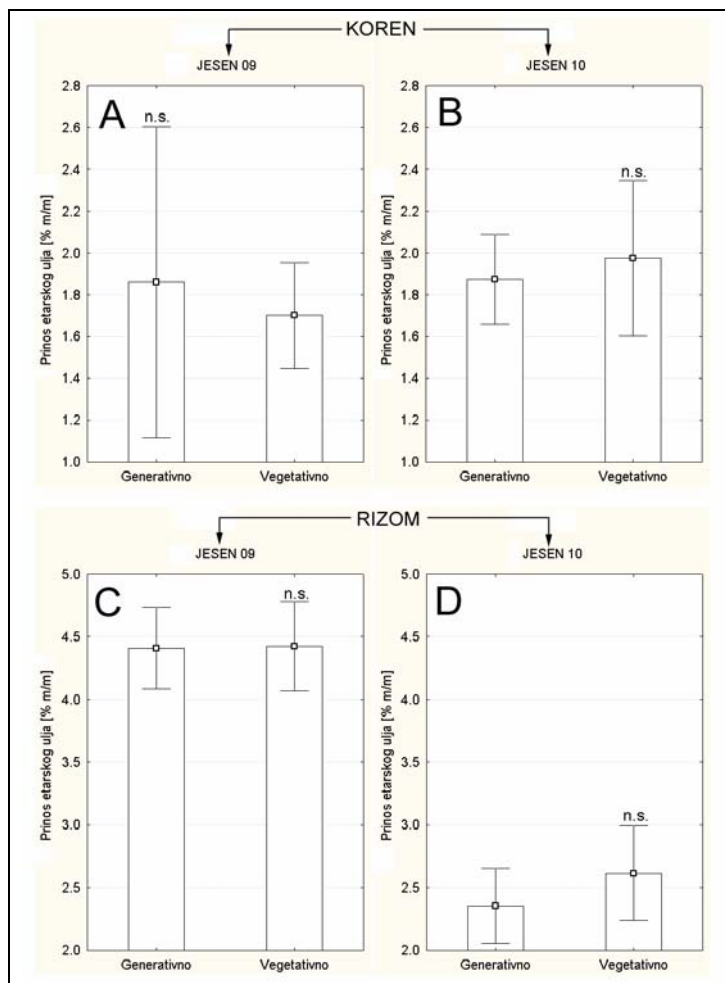
Grafik 72. Uticaj starenja na prinos etarskog ulja korena na prolećnom (A) i jesenjem (B) plotu sadnje i etarskog ulja rizoma na prolećnom (C) i jesenjem (D) plotu sadnje

Uticaj faktora vremena zasnivanja plantaže je ocenjen kao statistički značajan samo u slučaju prinosa etarskog ulja korena u 2009. godini (Grafik 73A). Aritmetičke sredine prinosa ulja u korenu, u drugoj, i rizomu, u obe posmatrane godine, nisu se razlikovale između plotova sadnje (Grafik 73B, C i D).



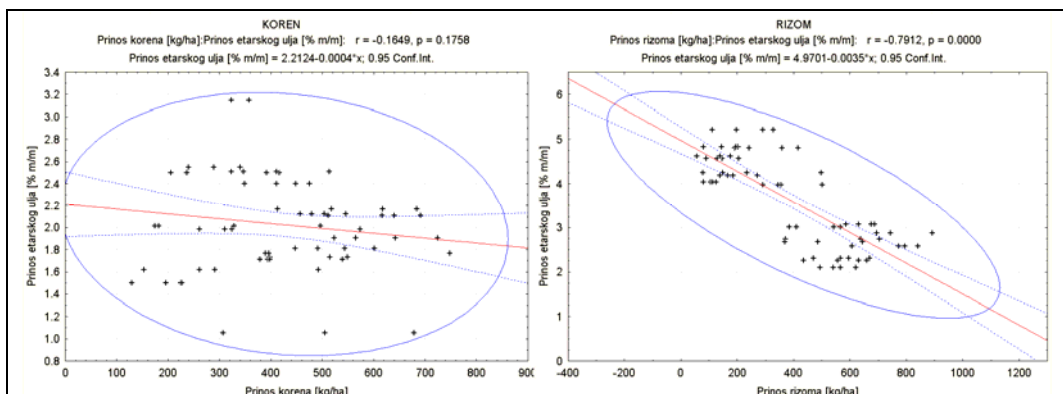
Grafik 73. Uticaj vremena zasnivanja na prinos etarskog ulja korena u 2009. (A) i 2010. (B) godini i etarskog ulja rizoma u 2009. (C) i 2010. (D) godini

Uticaj faktora vrste sadnica na prinos etarskog ulja, u obe posmatrane godine, na jesenjem plotu sadnje, nije bio statistički značajan ni u jednom od posmatranih podzemnih organa (Grafik 74A, B, C i D)



Grafik 74. Uticaj vrste sadnica na prinos etarskog ulja korena u 2009. (A) i 2010. (B) godini i etarskog ulja rizoma u 2009. (C) i 2010. (D) godini, na jesenjem plotu sadnje.

Prinosi etarskog ulja korena nisu u obe posmatrane godine pokazali statistički značajnu vezu sa prinosom korena ($r = -0,16$), dok su prinosi etarskog ulja rizoma pokazali statistički jaku negativnu korelisanost sa prinosom rizoma ($r = -0,79$) (Grafik 75).



Grafik 75. Odnosi prinosa etarskih ulja korena i rizoma sa prinosisima biomase podzemnih organa

Uticaj faktora na variranje morfoloških parametara i prinosa

U Prilogu 3 dat je tabelarni pregled aritmetičkih sredina svih proučavanih morfoloških parametara i prinosa zajedno sa označenim statističkim značajnostima između varijanti, a na Tabeli 23 je predstavljen pojedinačni uticaj faktora na svaku posmatranu osobinu zajedno sa međusobnom interakcijom faktora. Iz prikazonog se može zaključiti da su svi indukovani faktori imali uticaj na variranje vrednosti nadzemnog dela arnike, ali da su u pogledu formiranja sekundarnih rozeta i prinosu podzemnih organa imali skroman doprinos. Takođe je prisutan i veliki broj interakcija između faktora koje su u velikom broju slučajeva prikrivale statističku značajnost faktora vrste đubrenja (Grafici 6, 11, 17, 26 i 48).

Tabela 23. Pregled uticaja faktora na variranje morfoloških parametara i prinosa i interakcija između faktora

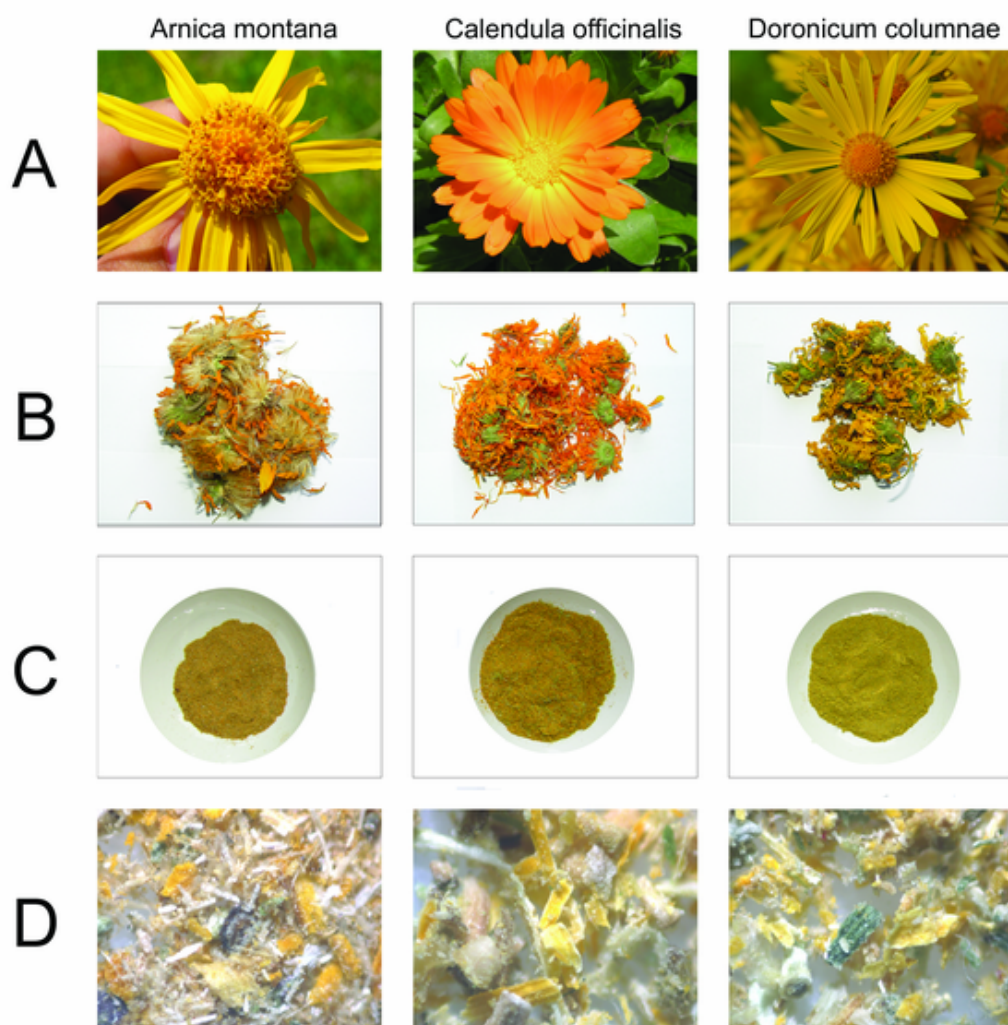
Izvor varijacije	Broj									
	Prečnik rozete ^a	Visina cvetnog izdanka	Broj cvetnih izdanaka	cvetnih glavica po biljci	Prečnik cvetne glavice	Prinos cvetne glavice	Broj sekundarnih rozeta	Prinos rizoma	Prinos korena	
2009	p	p	p	p	p	p	p	p	p	
Vrsta sadnica (B)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.7340	0.1258	0.8701	
Vrsta đubrenja (C)	0.0014	0.0011	0.0289	0.0008	0.6689	0.0380	0.6756	0.2197	0.3301	
B x C	0.0209	0.0353	0.0521	0.0012	0.8533	0.0230	0.9617	0.2854	0.4020	
2010										
Vreme sadnje (A)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008	0.0000	0.1240	0.0398	0.0468	
Vrsta sadnica (B)	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000	0.3682	0.0000	0.2680	0.1701	0.5362	
Vrsta đubrenja (C)	0.0003	0.0000	0.0130	0.0082	0.0177	0.0224	0.1832	0.1098	0.6830	
A x B	0.0000	0.0002	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.1181	0.8626	
A x C	0.0178	0.5077	0.5942	0.5160	0.5761	0.6441	0.2974	0.9608	0.4213	
B x C	0.3163	0.9076	0.5619	0.0077	0.3814	0.0127	0.2108	0.8509	0.5681	
A x B x C	0.5457	0.5582	0.0825	0.7510	0.9114	0.8988	0.7932	0.0460	0.1745	

^a p vrednosti u tabeli predstavljaju verovatnoće prihvatanja nulte hipoteze

6.3. Mikroskopska i hromatografska karakterizacija droga

Makroskopski pregled

Na slici 25. prikazan je makroskopski pregled droga *Arnicae* i *Calendulae flos*, kao i cveta *Doronicum columnae* od slike otvorenog cveta (A), preko osušenih (B) i samlevenih (C) cvetnih glavica do slike praška pod lupom (D).

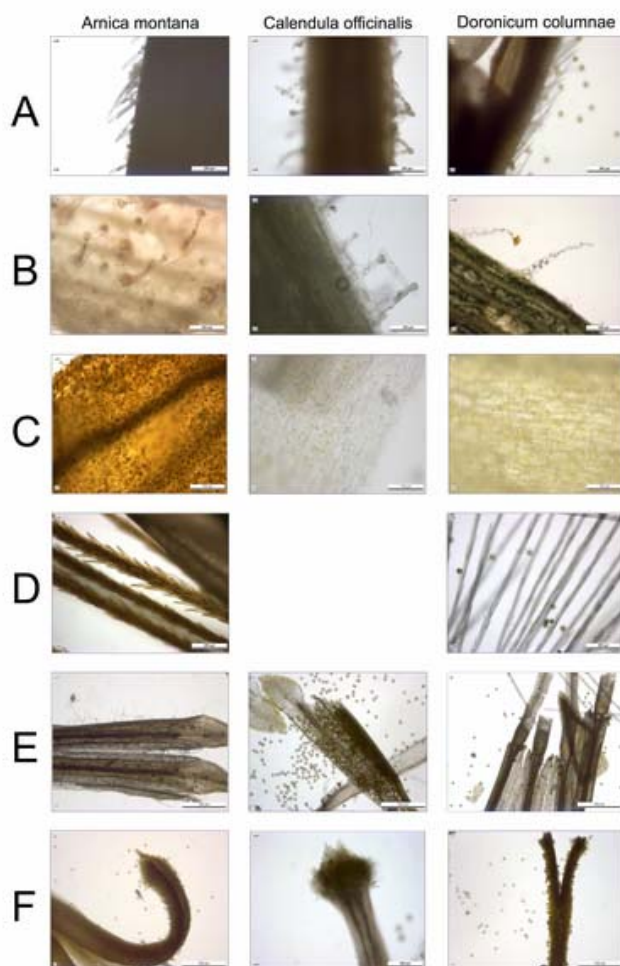


Slika 25. Makroskopski prikaz droga *Arnicae flos*, *Calendulae flos* i cveta *Doronicum columnae*; A – cvetne glavice u punom cvetnoj glavici; B – osušene cvetne glavice; C – samlevene cvetne glavice; D – sprášeni cvet pod lupom (x40)

Na ovom pregledu se može uočiti kako je u fazi punog cveta najlakše razlikovati ove tri biljne vrste, ali da se uočljive razlike polako gube već na nivou osušenih glavica, dok su na nivou samlevenih glavica jedva uočljive. Prilikom pregleda pod lupom (pod uveličanjem x40) veoma je teško razlikovati sprašene delove cveta posmatrane tri biljne vrste.

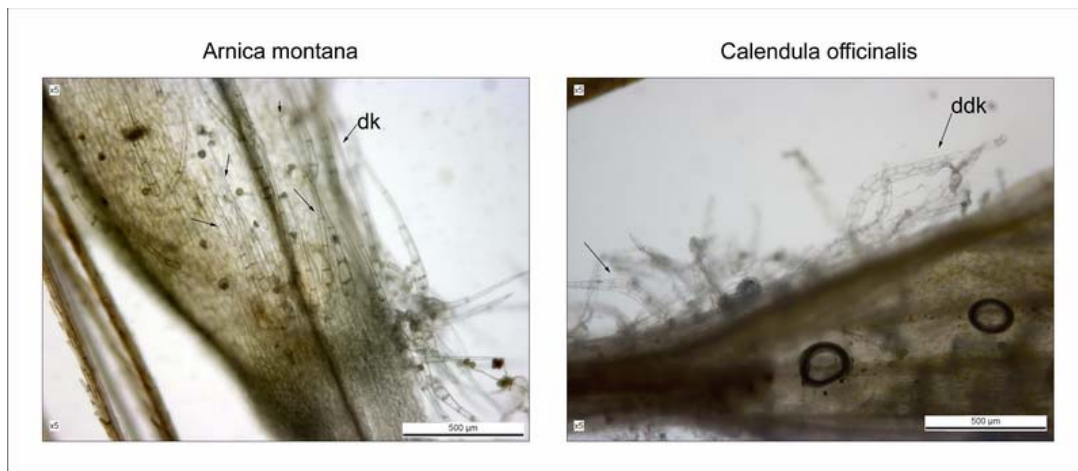
Mikroskopska analiza

Na Slici 26 predstavljen je uporedni pregled delova cvetne glavice arnike sa dva pretpostavljena falsifikata.



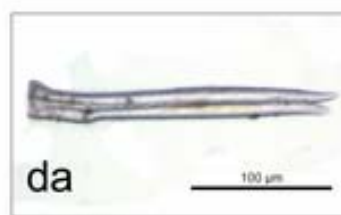
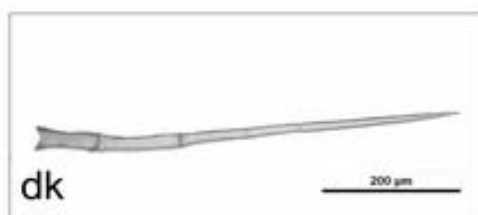
Slika 26. Mikroskopski prikaz delova droga *Arnicae flos*, *Calendulae flos* i cveta *Doronicum columnae*; A – dlake na aheniji; B – žlezdane dlake na involukrumu; C – uljane kapljice u krunicama jezičastih cvetova; D – papus; E – prašnici; F – žig tučka

Slika 27. pokazuje razlike u dlakama koje su prisutne u bazi krunice cevastih cvetova vrsta *A. montana* i *C. officinalis*. Kod *A. montana* se vide dugačke jednostruke višecelijske dlake (Slika 27 - dk), dok su kod *C. officinalis* jasno uočljive višecelijske dlake sastavljene od dva reda ćelija (Slika 27 - ddk).



Slika 27. Mikroskopski prikaz dlaka u baznom delu krunice cevastih cvetova kod *A. montana* i *C. officinalis*; dk - duge višecelijske dlake; ddk – dvostruke duge višecelijske dlake.

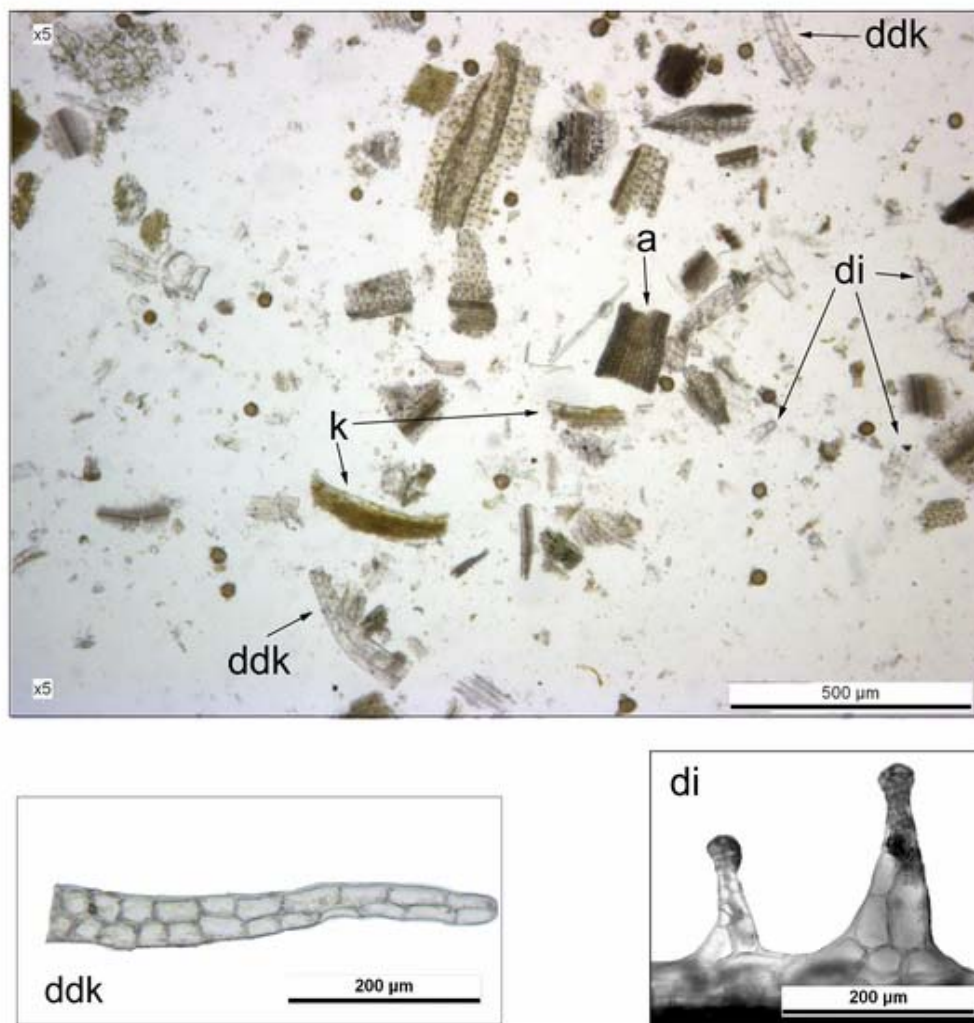
Na Slici 28. predstavljena je sprašena droga *Arnicae flos* gde se pod mikroskopskim uveličanjem x5 mogu uočiti dvostruke dlake sa površine ahenija (da), jednostruke višecelijske dlake sa baze krunice cevastih cvetova (dk), deo krunice cevastih cvetova (k), površina dela epidermisa ahenije prekrivena rđastim mrljama i delovi papusa dijametra ca. 70 µm.



Slika 28. Sprašena droga *Arnicae flos* pod mikroskopskim uveličanjem x5; dk – duge višćelijske dlake sa baze krunice cevastih cvetova; da – dvostruke dlake sa površine ahenije; p – papus dijametra ca. 70 µm; ah – površina ahenije prektivena rđavim mrljama; k – deo krunice cveta.

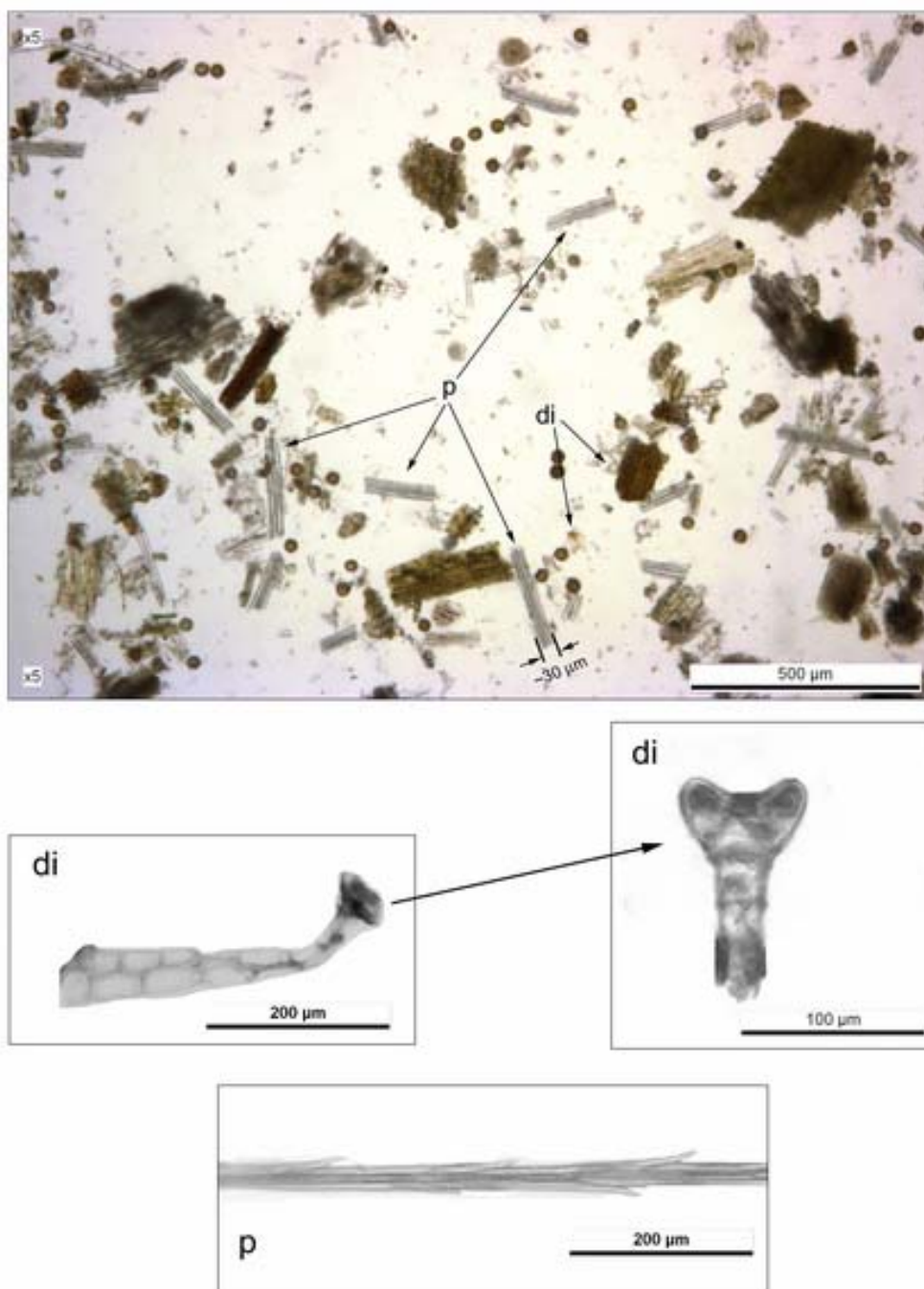
Na Slici 29. prikazan je mikroskopski pregled praha cvetne glavice *C. officinalis* (x5) gde se mogu uočiti dvostruke dlake poreklom sa baze krunice cevastih cvetova

(ddk), deo prašnika (a), delovi krunice cvetova (k) i delovi žlezdanih dlaka poreklom sa involukruma (di). Važna karakteristika prilikom identifikacije je da u prahu cvetnih glavica *C. officinalis* nisu prisutni ostaci papusa.



Slika 29. Sprašena droga *Calendulae flos* pod mikroskopskim uveličanjem x5; ddk – dvostruke višćelijske dlake sa baze krunice cevastih cvetova; di – višćelijske žlezdane dlake sa površine involukruma; a – deo prašnika (antere); k – deo krunice cveta.

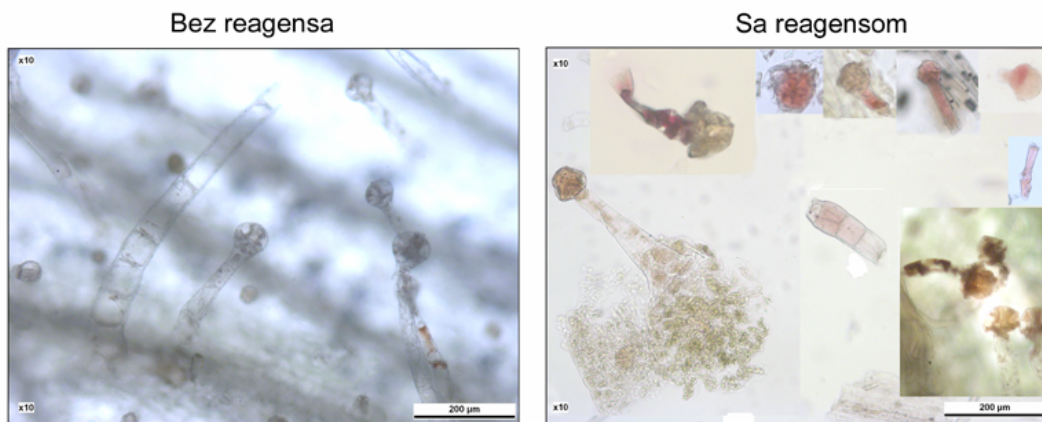
Prah vrste *D. columnae* pod mikroskopskim uveličanjem predstavljen je na Slici 30. Na slici se mogu uočiti srcasti krajevi žlezdanih dlaka poreklom sa involukruma i delovi papusa dijametra ca. 30 µm.



Slika 30. Sprašeni cvet *D. columnae* pod mikroskopskim uveličanjem x5; di – višćelijske žlezdane dlake sa površine involukruma (srcaste glave); p – papus dijametra ca. 30 µm;

Radi lakše identifikacije vrsta i lokalizacije sekundarnih metabolita upotrebljen je Opšti reaktiv (Tabela 10), ali se bojena reakcija ispoljila samo na žlezdanim dlakama

brakteja vrste *A. montana* (Slika 31). Ovakva bojena reakcija kod svih vrsta nije bila očekivana i na osnovu prezentovanog se ne može pouzdano tvrditi da u različitim fazama razvića preostale dve biljne vrste ne bi došlo do ispoljavanja bojene reakcije. Stoga se ova metoda ne može preporučiti kao pouzdan način za identifikaciju vrsta.



Slika 31. Bojena reakcija žezdanih dlaka na braktejama *A. montana* usled primene prirodnog reagensa

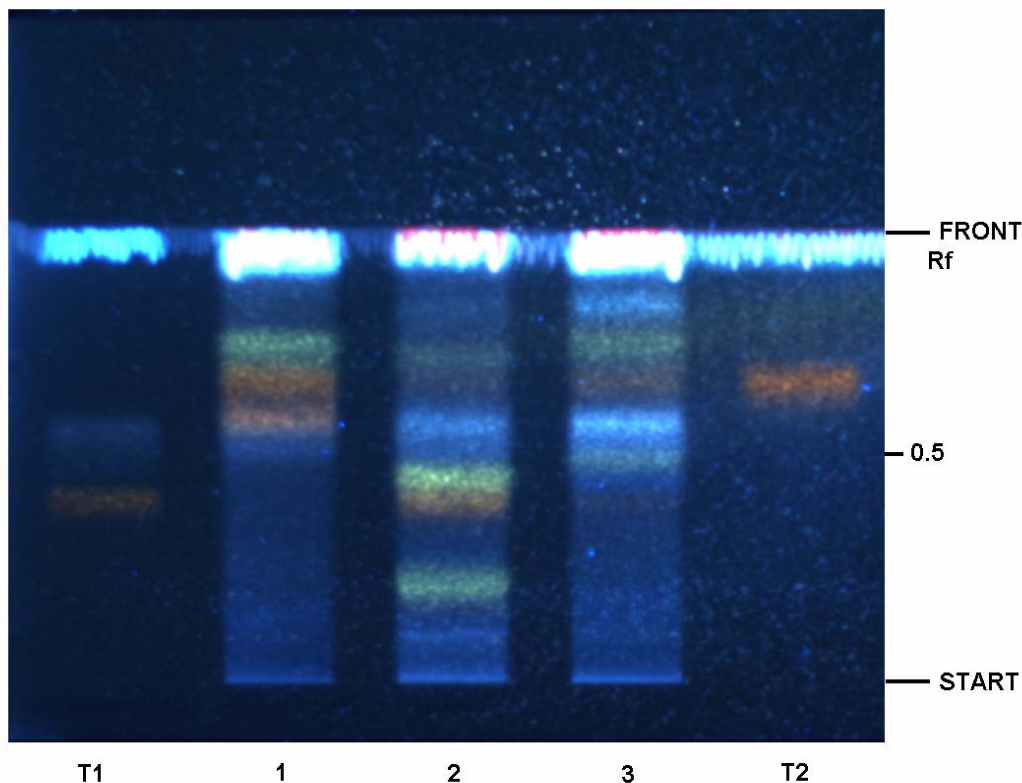
Sumirane razlike u delovima sprašenih cvetnih glavica sve tri vrste posmatranih pod mikroskopom, prezentovane su u Tabeli 24.

Tabela 24. Razlike u delovima cvetnih glavica uočljivih pod mikroskopom

	Vrsta		
Deo cvetne glavice	<i>Arnica montana</i>	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Doronicum columnae</i>
Dlake na aheniji	Dvostruke, providne bez glavice	Jednostruke sa glavicom	Dvostruke, providne bez glavice
Dlake na involukrumu	Kratke, u obliku dobošarske palice	Piramidalno višćelijske sa glavicom na vrhu	Dvoredno višćelijske sa srcastom glavicom
Papus	Uočljiv, debljine 69 ± 16 mm	Nije uočljiv	Uočljiv, debljine 30 ± 7 mm
Dlake u bazi krunice cevastih cvetova	Višćelijske duge jednostruke	Višćelijske duge dvostruke	Višćelijske duge jednostruke
Bojena reakcija prirodnim reagensom	Prisutna u žezdanim dlakama brakteja	Nije prisutna	Nije prisutna

Ukratko samo na bazi prisustva i dimenzija papusa može se pouzdano tvrditi o kojoj biljnoj vrsti, od tri ispitivane, je reč.

Tankoslojna hromatografija



Slika 32. HPTLC identifikacija biljne droge *Arnicae flos* pod UV svetlošću (365 nm); T1 – smeša standarda (rutin, hlorogenska kiselina, kafena kiselina), 1 – *Arnica montana*, 2 – *Calendula officinalis*, 3 – *Doronicum columnnae*, T2 – standard izokvercitina.

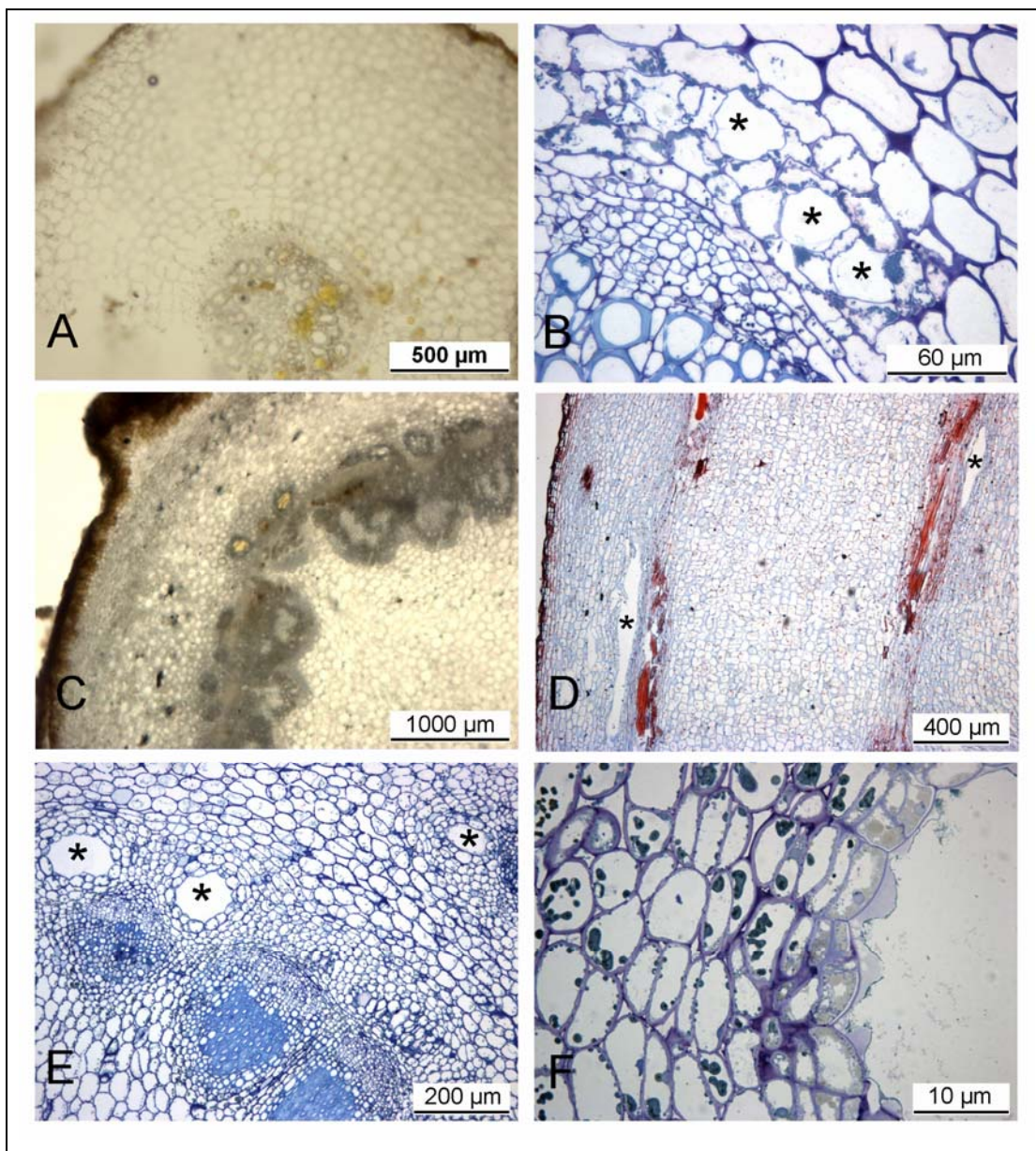
Na sredini HPTLC hromatograma ($R_f \sim 0,55$) uočava se zona koja daje plavu fluorescenciju (Slika 32), a koja po položaju odgovara hlorogenoj kiselini u smeši standarda (T1). Ta zona ima najjaču fluorescenciju u uzorku *D. columnnae*, malo slabiju kod *C. officinalis*, a najslabiju u uzorku cveta *A. montana*. Ispod te zone nalazi se zona koja ima narandžastu fluorescenciju ($R_f \sim 0,4$), a koja je jasno izražena u uzorku *C. officinalis*, potpuno odsutna u uzorku cveta *A. montana*, dok u uzorku *D. columnnae* postoji nagoveštaj ove zone. Ta narandžasta zona po položaju odgovara rutinu u smeši standarda (T1). Sledeća narandžasto fluorescentna zona može se uočiti na $R_f \sim 0,65$ koja je jasno vidljiva jedino u uzorku *A. montana*, potpuno odsutna u uzorku *C. officinalis* i jedva primetna u uzorku *D. columnnae*. Ova zona po položaju i fluorescenciji odgovara standardu izokvercitina (T2). Zona koja u smeši standarda predstavlja standard kafeine nalazi se na vrhu hromatograma ($R_f \sim 0,9$) i podjednako je zasupljena u svim

ispitivanim uzorcima. U uzorku *A. montana* na $R_f \sim 0,6$ (između izokvercitina i hlorogenske kiseline) nalazi se bledo-narandžasta zona koja gasi fluorescenciju hlorogenske kiseline, kao i zona sa žućkastom fluorescencijom na $R_f \sim 0,7$ koja je za razliku od prethodne zastupljena u svim uzorcima. U uzorku *C. officinalis* se u donjem delu hromatograma, pored opisanih zona, nalaze dve zone sa jasnom žutom fluorescencijom. Jedna se nalazi odmah iznad rutina na $R_f \sim 0,45$, a druga znatno bliže početku hromatograma na $R_f \sim 0,2$. Ove zone su zastupljene samo u uzorku *C. officinalis*. U gornjem delu hromatograma uzorka *D. columnae* nalazi se zona plave fluorescencije ($R_f \sim 0,8$) koja je zastupljena samo u ovom uzorku.

Lokalizacija etarskog ulja u rizomu i korenu

Svetlosna mikroskopija

Brojne ćelije kortikalnog parenhima koje sadrže amorfne, žućkasto obojene kapljice čiste supstance, prečnika od 3-70 μm (prosečno $18 \pm 14 \mu\text{m}$) su uočene koristeći nebojene ručne poprečne preseke korena potopljenog u vodu (Slika 33A). U kortikalnom regionu korena su prisutni intercelulari naslonjeni na sprovodne snopiće (Slika 33B), ali specijalizovane sekretorne epitelijalne ćelije koje okružuju ove intercelulare nisu uočene. Na uzdužnom preseku ovi intercelulari su izduženi, prečnika 12-77 μm i dužine ponekad i preko 400 μm .



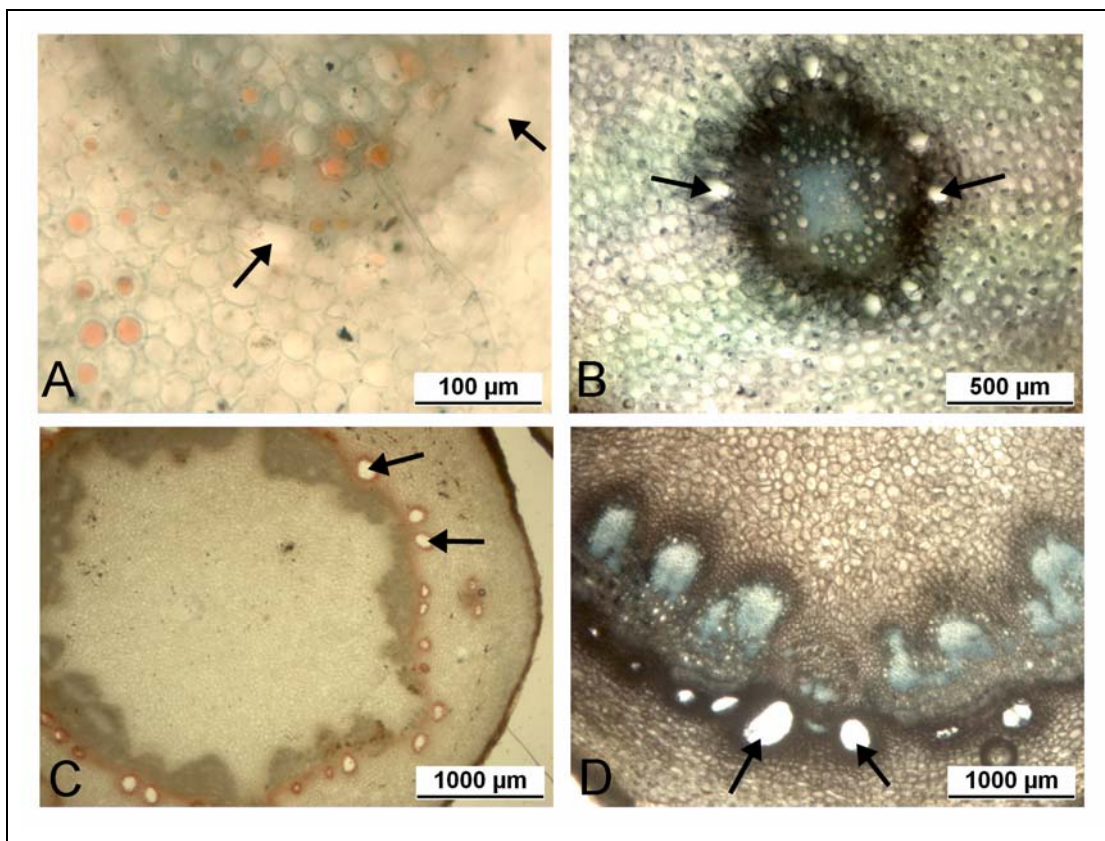
Slika 33. Poprečni preseki korena i rizoma *Arnica montana*

A – Nebojeni ručni poprečni presek korena potopljenog u vodi na kome se vide uskladištene kapljice ulja u ćelijama kortikarnog parenhima i intercelularima kao žućkaste tačke **B** – Polutanki poprečni presek na kome se vide mali intercelulari u kori korena blizu sprovodnih sudova (obeleženo zvezdicama) **C** – Nebojeni ručni poprečni presek rizoma potopljenog u vodu na kome se vide žućkasta skladišta uljanih kapljica u intercelularima kore **D** – Uzdužni parafinski presek na kome se vidi izduženi intercelular u blizini sprovodnih sudova (obeleženo zvezdicama) **E** – Polutanki presek mladog rizoma (d=5mm) na kome se vide intercelulati u kori (obeleženo zvezdicama) **F** – Polutanki presek starijeg rizoma (d = 25 mm) na kome se vidi veliki intercelular i sekretorne ćelije manjih dimenzija koje okružuju šupljinu.

Kod rizoma su uočeni veliki intercelulari od kojih se većina nalazi u primarnoj kori zajedno sa floemom (Slika 33C). Ove šupljine su različitih dimenzija i kreću se od 19 μm do 550 μm u prečniku. Takođe njihov broj varira od 30-50 po preseku, zavisno od prečnika rizoma. Kada se pogleda uzdužni presek šupljine su izodijametrične i manje ili više izdužene (Slika 33D) sa dužinom 102-1845 μm (prosečno $516,7 \pm 443,6 \mu\text{m}$). Ove šupljine sadrže žute amorfne kapljice jasno vidljive na nebojenim svežim ručnim preseccima potopljenim u vodi (Slika 33C). Sadržaj šupljina i ćelija koje ih okružuju se može smatrati lipofilnim obzirom na žućkastu boju, viskoznost i zaokruženost u sferične kapljice nerastvorljive u vodi. U mladom rizomu (precnika 5 mm) primećuju se mnoge deobe parenhimskih ćelija kore, što najverovatnije ima za cilj formiranje novih sekretornih šupljina za skladištenje etarskog ulja. Lumen šupljine je okružen epitelijalnim ćelijama odgovornim za sintezu ulja i sekreciju u šupljinu (Slike 33 E i F). Epitelijalne ćelije kod starijeg rizoma se povećavaju i izdužuju, gde neke od njih nastavljaju sa deobom na račun čega se povećavaju šupljine. Prosečna veličina epitelijalne ćelije je $19,8 \pm 11,4 \mu\text{m}$, a kreće se u opsegu od 4,4 to 69,4 μm .

Histohemijska analiza

Histohemijski testovi koji su obavljani na korenu i rizomu *A. montana* sa Sudan bojama ukazuju na lipidnu prirodu kapljica (Slika 34), dok je usvajanje boje upotrebom drugih testova bilo negativno (Prilog 2). Bojenje sadržaja intercelulara u korenu i rizomu Sudan bojama nije bilo očigledno, zbog lakog rastvaranja uljanih kapljica u rastvoru boje, obzirom da je rastvor bio etanolni.



Slika 34. Bojenje za lipide kod korena i rizoma *A. montana*

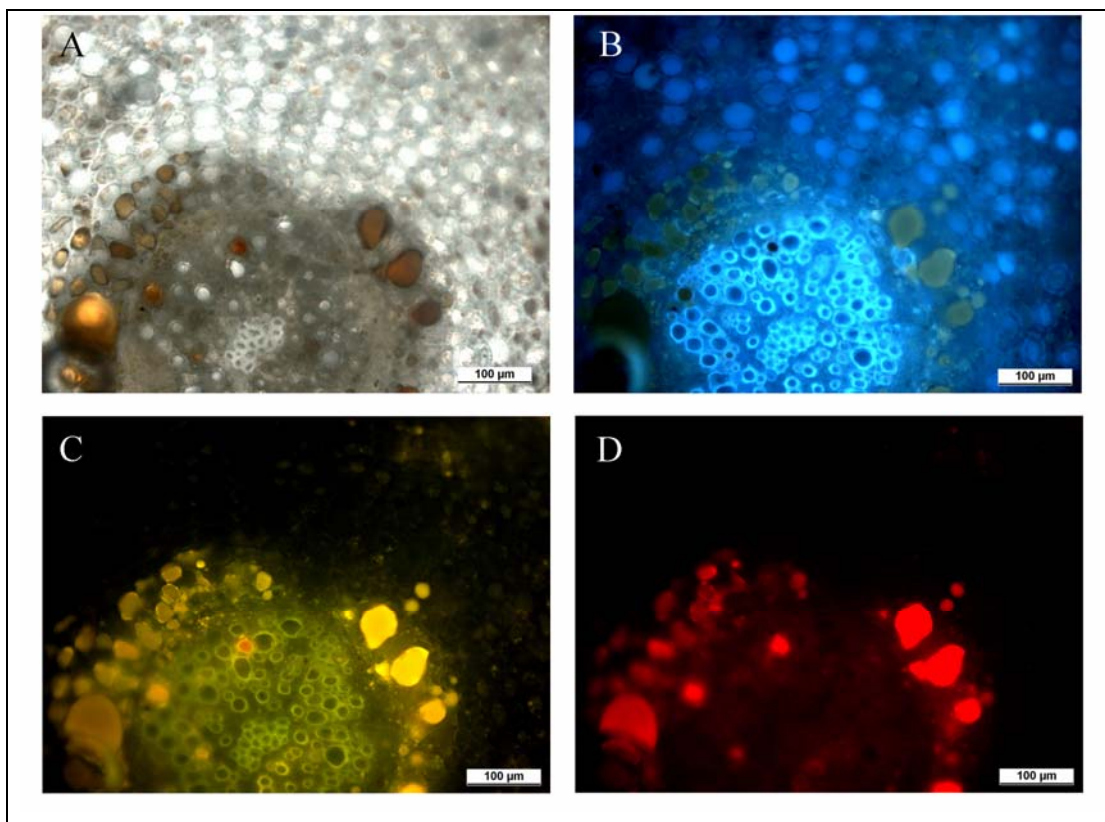
A-B – Uljane kapljice u ćelijama kore korena i centralnom delu korena obojene narandžasto sa Sudan III (**A**) i crno sa Sudan Black (**B**).

C-D – Uljana skladišta u kortikalnom sekretornom regionu rizoma obojena narandžasto sa Sudan III (**C**) i crno sa Sudan Black (**D**).

Zabeleženo je najintenzivnije bojenje jednoslojnog epitelijuma i odsustvo boje u intercelularima (obeleženo strelicama), najverovatnije zbog toga što se ulje u intercelularima rastvorilo u rastavaču boje (70% etanol)

Fluorescentna mikroskopija

Uljana skladišta svežih preseka korena potopljenog u vodi ispitivanih sa fluorescentnim mikroskopom emitovale su slabu svetlo-žutu auto-fluorescenciju pod UV ekscitacijom (BP 340-380 nm). Intenzivnija fluorescencija je dobijena posmatranjem pod dve ostale talasne dužine (BP 450-490 nm i 515-580 nm) (Slika 35). Autofluorescencija pod UV ukazuje na prisustvo fenolnih jedinjenja (Ruzin, 1999). Najveća skladišta ulja u korenu su lokalizovana u kortikalnom regionu, u intercelularima koji se nalaze u blizini sprovodnih snopića.

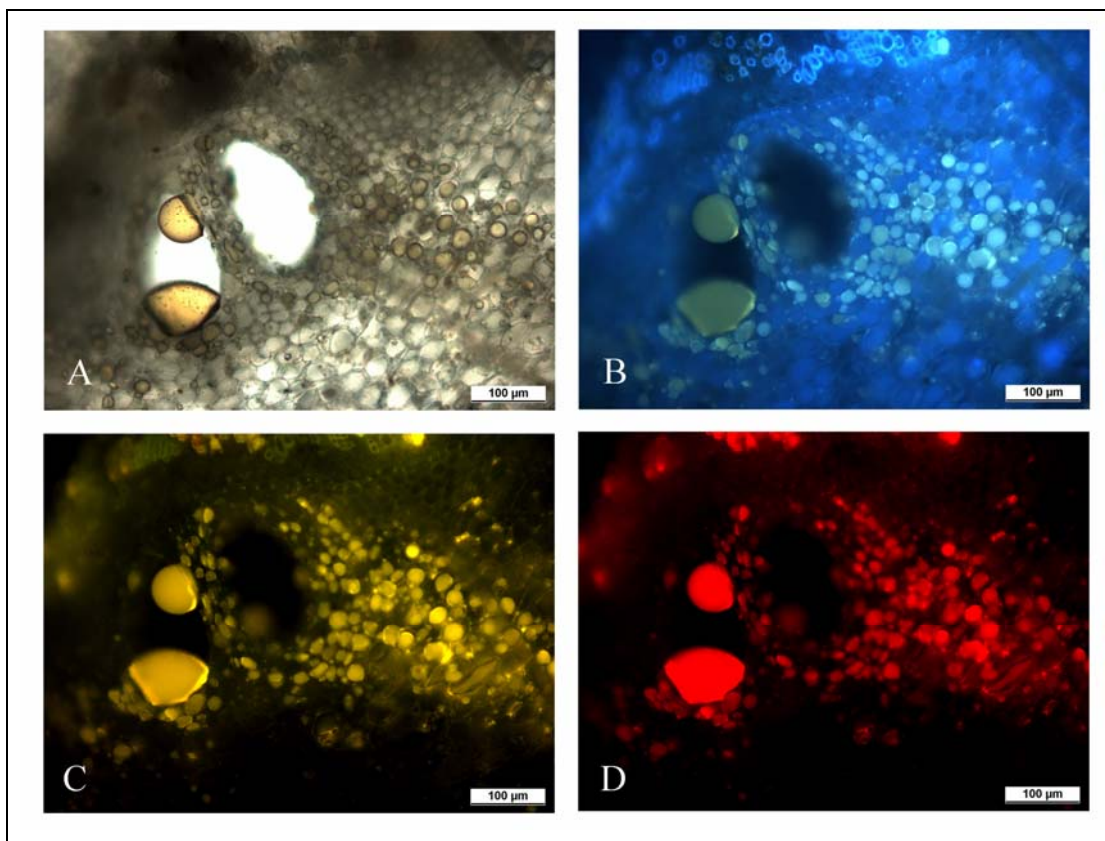


Slika 35. Nebojeni poprečni ručni presek korena *Arnica montana* potopljenog u vodi i posmatranog u svetlom polju (A) i fluorescentnoj mikroskopiji (B-D)

A – Žute uljane kapljice u kortikalnim ćelijama i u lumenu intercelulara

B-D – Uljane kapi u intercelularima i u idioblastu ćelija sekretornog parenhima su vidljive kao žučkaste tačke sa slabom fluorescencijom pod UV (B) i intenzivna autofluorescencija pod filterima I3 (C) i N2.1. (D).

Sveži poprečni preseći rizoma pod fluorescentnim mikroskopom su pokazali da uljane kapljice koje ispunjavaju lumen šupljina imaju slabo žutu autofluorescenciju pod UV, ali takođe i jaku žutu i crvenu autofluorescenciju na ostale dve talasne dužine, respektivno (Slika 36). Uljane kapljice nađene u epitelijalnim ćelijama i stalim ćelijama kore u blizini šupljina pokazivale su autofluorescenciji na sličan način. Iz prisustva uljanih kapljica u sekretornim šupljinama i u epitelijalnoj zoni može se izvesti pretpostavka da se etarsko ulje sintetiše u epitelijalnim ćelijama grupisanim u nekoliko slojeva oko šupljina u koje ga sekrecijom izlučuju.



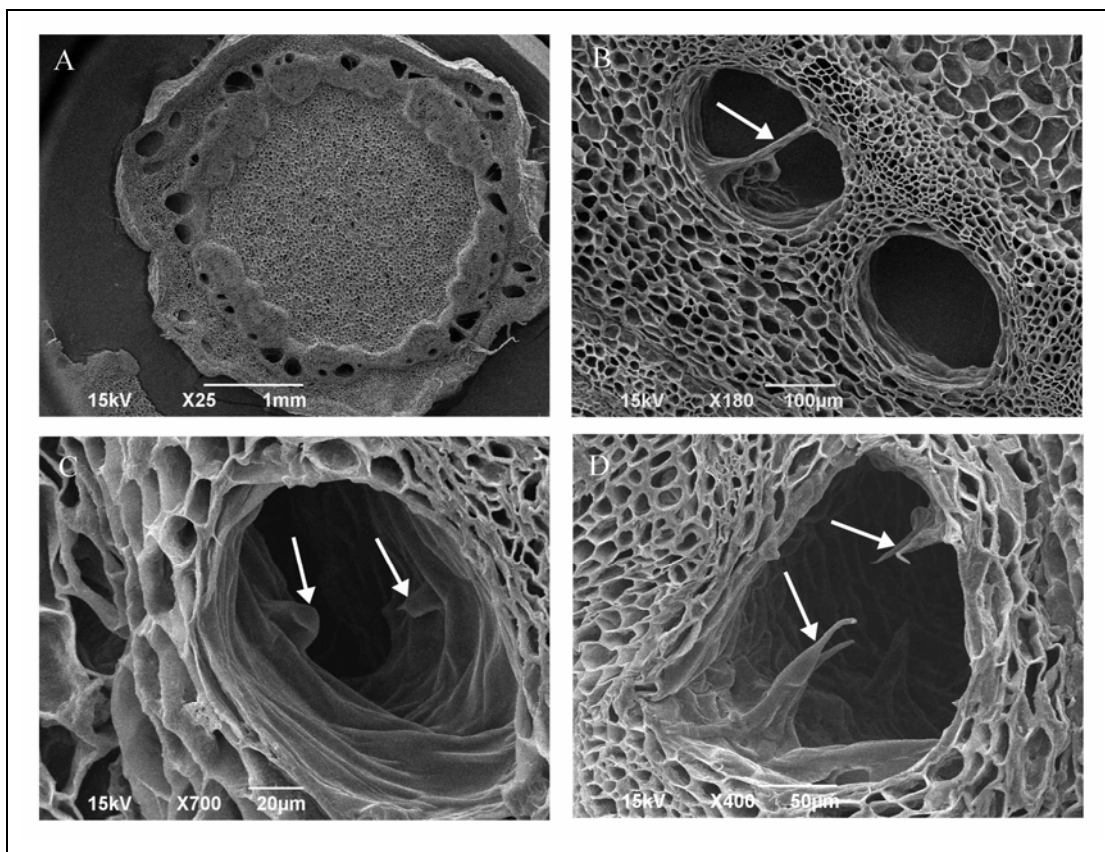
Slika 36. Nebojeni poprečni ručni presek rizoma *Arnica montana* potopljenog u vodi i posmatranog u svetlom polju (A) i fluorescentnoj mikroskopiji (B-D)

A – Lumen sekretornih šupljina ispunjen žutim kapima ulja.

B-D – Uljane kapi vidljive kao žućkaste tačke sa slabom fuorescijom pod UV (B) i intenzivna autofluorescencija pod filterima I3 (C) i N2.1. (D).

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

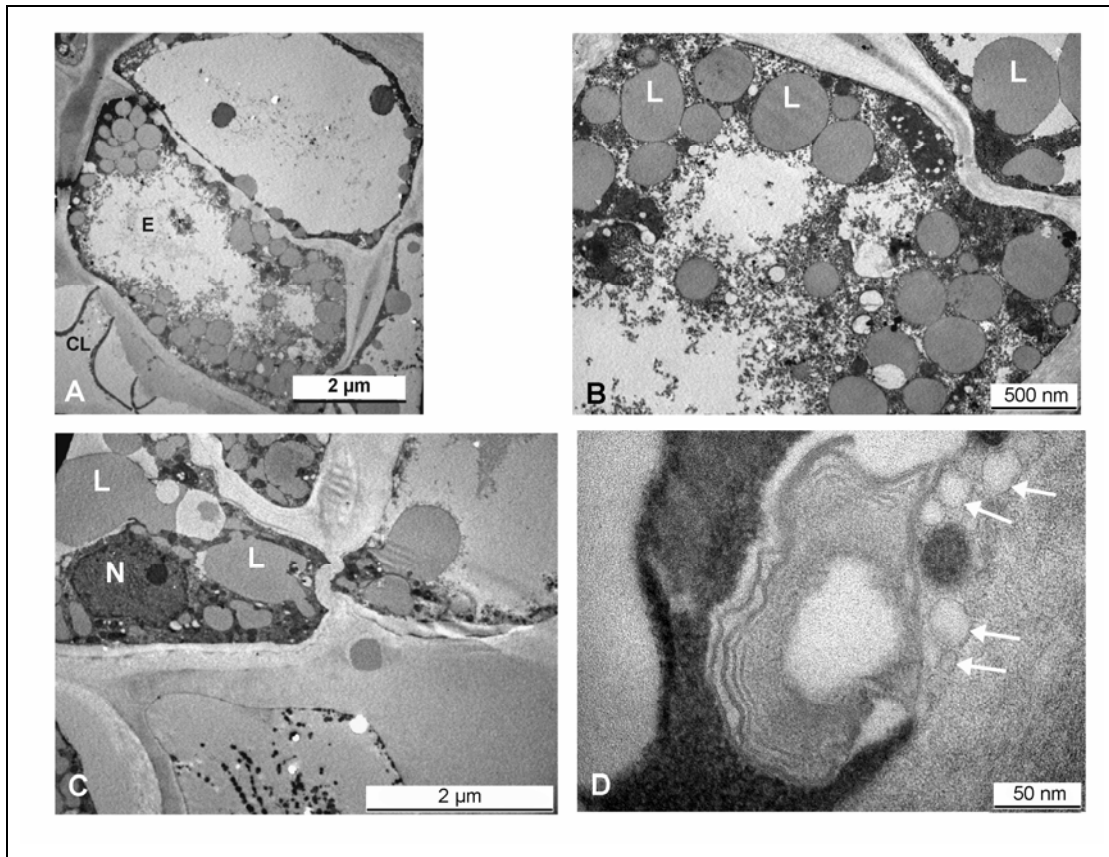
Upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije rizoma *A. montana* potvrđeno je prisustvo velikih intercelulara (Slika 37A i B) koji služe ka mesto skladištenja ulja. Septa između šupljina isunjenih uljem su u nekim slučajevima nasilno prekinute porastom šupljina, što sjedinjuje susedne šupljine i povećava njihovu dužinu od otprilike 0,3 mm do 0,8 mm, ponekad i više. U lumenu šupljina, čak i na poprečnom preseku moguće je videti zaostale delove pokidanih septi (Slika 37C i D).



Slika 37. Skenirajuće elektronske mikrografije poprečnih preseka rizoma *A. montana*
A – primećuju se veliki subepidermalni sekretorni rezervoari u kori
B – septa između dva intercelulara (obeleženo strelicom)
C-D – zaostali delovi pokidane septe u lumenu šupljine (obeleženo strelicom)

Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

TEM mikrografije epitelijalnih ćelija prikazuju gusto obojenu perifernu citoplazmu sa jedrom većim od okolnih ćelija i velikim brojem uljanih kapljica (Slika 38ABC). Diktiozomi sa njihovim sekretornim vezikulama su takođe vidljivi u epitelijalnim ćelijama (Slika 38D), jasno ukazujući na sintezu i sekreciju etarskog ulja.



Slika 38. Transmisiona elektronska mikroskopija ćelija u sekretornom regionu rizoma *A. montana*.

A – Učestalost uljanih kapljica posmatrana u epitelijalnim ćelijama (E). Lumen šupljine (CL)

B – Epitelijalna ćelija pokazuje elektron-gustu perifernu citoplazmu. Uljane kapljice (L)

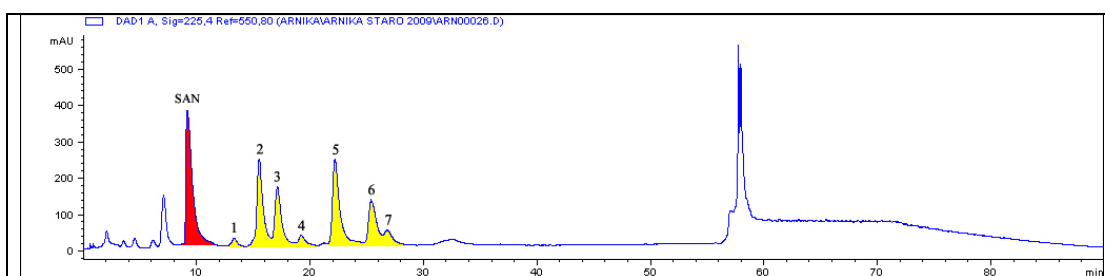
C – Detalj epitelijalne ćelije gde je prikazano jedro (N) i uljane kapljice (L)

D - Detalj epitelijalne ćelije gde su prikazane sekretorne vezikule diktiozoma (obeleženo strelicama).

6.4. Hemijska analiza droga

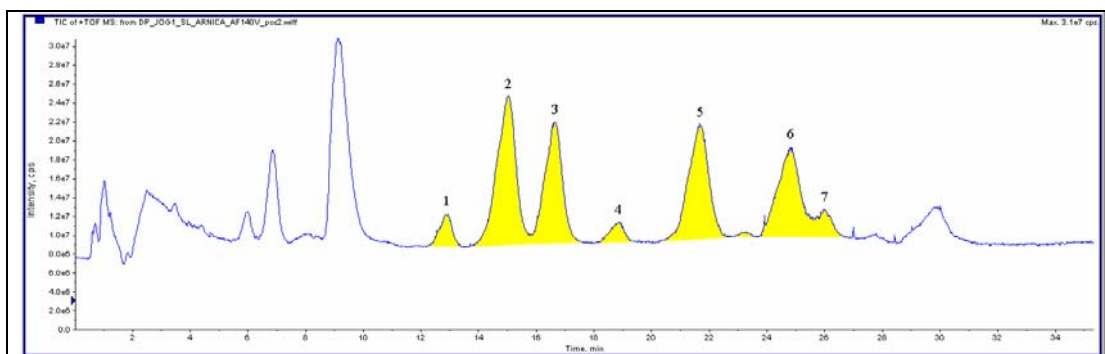
Sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona

Kvantifikacija ukupnih seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici arnike izvršena snimanjem ekstrakta tečnom hromatografijom na 225 nm. Karakteristični DAD hromatogram dat je na Slici 39, gde se može uočiti crveno obojeni pik internog standarda (santonina) i žuto obojeni pikovi koji po UV-spektru odgovaraju seskviterpenskim laktonima.



Slika 39. HPLC hromatogram kvantitativnog određivanja sadržaja seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici *A. montana*

Identifikacija seskviterpenskih laktona u ekstraktu cvetne glavice arnike urađena na osnovu kombinacije LC/MS tehnika čiji je karakteristični hromatogram prikazan na Slici 40.



Slika 40. LC-MS hromatogram kvalitativnog određivanja sadržaja seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici *A. montana*

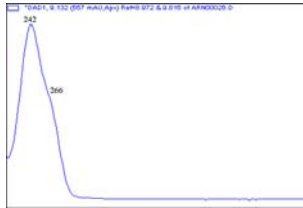
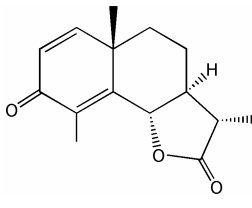
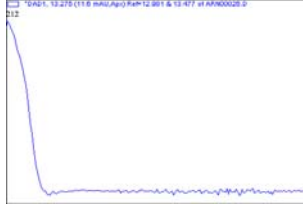
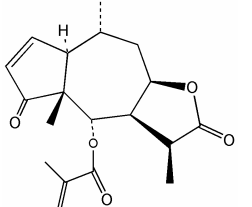

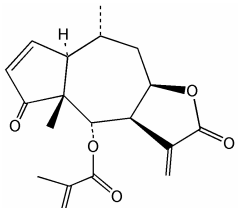
Očitane vrednosti molekulske mase i molekulske formule date su po retencionim vremenima u Tabeli 25.

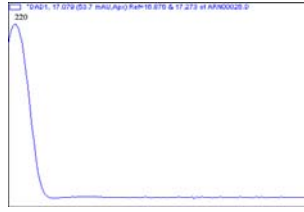
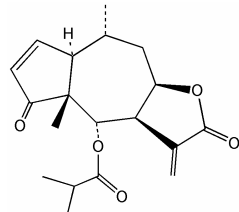
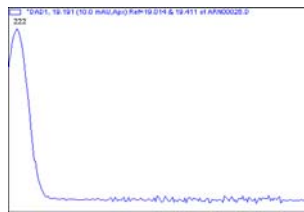
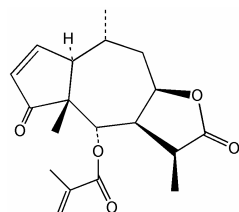
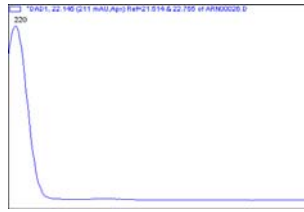
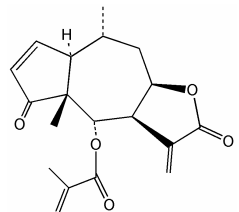
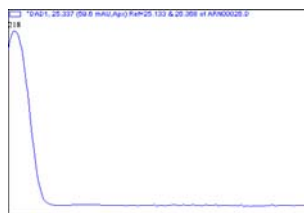
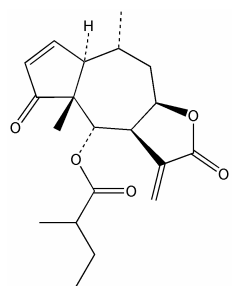
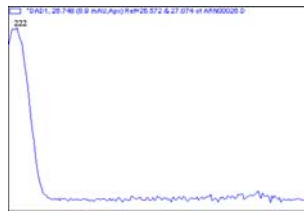
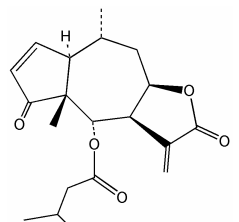
Tabela 25. LC-MS analiza seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici *A. montana*

#	RT	Formula	M g/mol	M+H g/mol	M+NH ₄ g/mol	M+Na g/mol	M+K g/mol	2M+H g/mol	2M+NH ₄ g/mol	2M+Na g/mol
1	12.869	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	332.1623	333.1694	350.1961	355.1518	371.1254			687.3136
2	15.017	C ₁₉ H ₂₂ O ₅	330.1467	331.1537	348.1806				678.3256	683.2819
3	16.605	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	332.1623	333.1692	350.1962	355.1515	371.1254		682.3575	687.3132
4	18.803	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	346.1779	347.1852	364.2116	369.1674	385.1426			715.3450
5	21.626	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	344.1624	345.1698	362.1962	367.1527	383.1255		706.3590	711.3134
6	24.768	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	346.1780	347.1852	364.2118	369.1670	385.1416		710.3903	715.3447
7	25.946	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	346.1781	347.1854	364.2119	369.1670				715.3450

Na osnovu retencionih vremena i molekularnih masa, izvršena je identifikacija seskviterpenskih laktona prisutnih u ekstraktu cveta arnike, a dobijeni podaci zajedno sa strukturnim formulama su pregledno složeni u Tabeli 26.

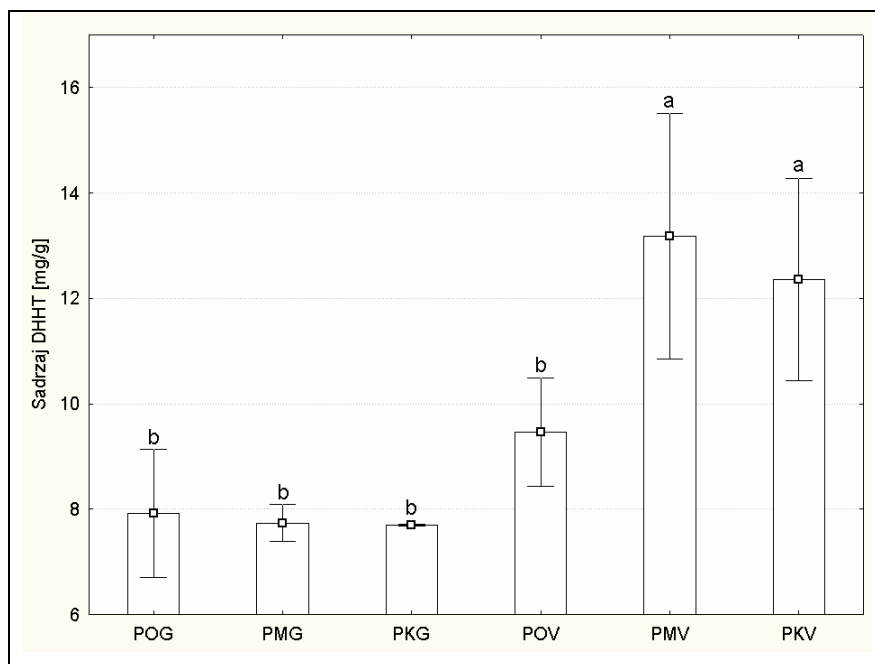
Tabela 26. Pregled spektra i strukturnih formula seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici *A. montana*

SAN			<p>α-santonin Formula: C₁₅H₁₈O₃ M=246.13 Rt=9.132 λ_{max}= 242, 266(r) nm</p>
1			<p>dihidro- helenalin- metakrilat Formula: C₁₉H₂₄O₅ M=332.16 Rt=13.275 λ_{max}= 212 nm</p>
2			<p>helenalin- metakrilat Formula: C₁₉H₂₂O₅ M=330.15 Rt=15.487 λ_{max}= 212 nm</p>

3			<p>helenalin-izobutirat Formula: $C_{19}H_{24}O_5$ $M=332.16$ $R_t=17.079$ $\lambda_{max}=220\text{ nm}$</p>
4			<p>dihidro-helenalin-tiglat Formula: $C_{20}H_{26}O_5$ $M=346.18$ $R_t=19.191$ $\lambda_{max}=222\text{ nm}$</p>
5			<p>helenalin-tiglat Formula: $C_{20}H_{24}O_5$ $M=344.16$ $R_t=22.145$ $\lambda_{max}=220\text{ nm}$</p>
6			<p>helenalin-2-metilbutiril Formula: $C_{20}H_{26}O_5$ $M=346.18$ $R_t=25.337$ $\lambda_{max}=218\text{ nm}$</p>
7			<p>helenalin-izovalerat Formula: $C_{20}H_{26}O_5$ $M=346.18$ $R_t=26.748$ $\lambda_{max}=222\text{ nm}$</p>

Sadržaj ukupnih seskviterpenskih aktona (DHHT) se u cvetnoj glavici arnike u 2009. godini kretao od 7,7 – 13,2 mg/g (Grafik 76). Iz prikazanog grafika se može

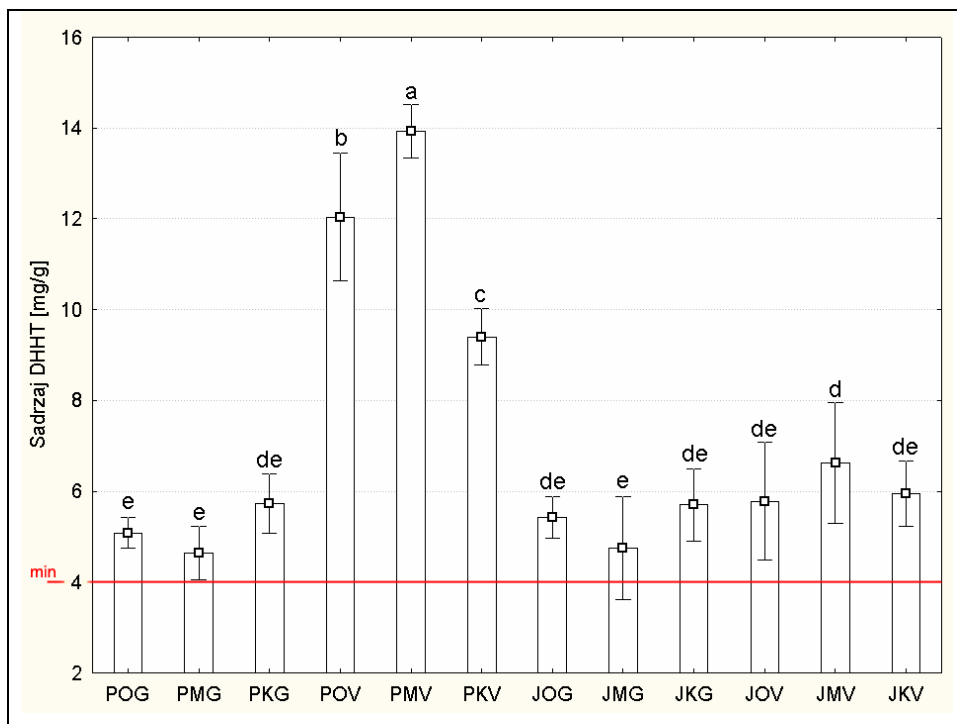
videti da su veći sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona imale varijante vegetativnog razmnožavanja (9,5 – 13,2 mg/g), dok su varijante generativnog razmnožavanja imale manji sadržaj DHHT (7,7 – 7,9 mg/g). Najveće prinose DHHT, u varijantama vegetativne propagacije, ostvarile su biljke iz mineralnog i kontrolnog bloka đubrenja.



Grafik 76. Sadržaj DHHT u cvetnim glavicama arnike u 2009. godini

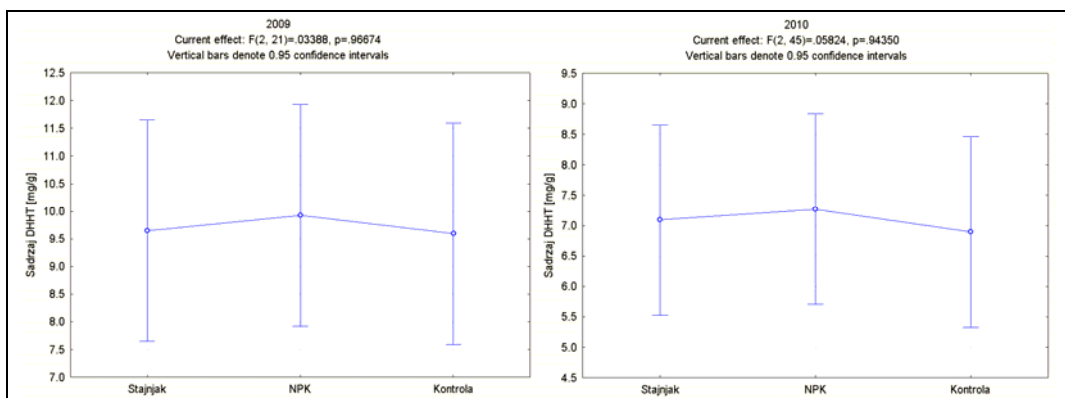
U 2010. godini sadržaj DHHT u cvetnoj glavici arnike se kretao od 4,6 – 13,9 mg/g (Grafik 77). Najveći sadržaj DHHT imale su, kao i u prethodnoj godini, varijante vegetativne propagacije na prolećnom plotu sadnje. U toj varijanti se javljaju i razlike u prinosu đubrenih varijanti i kontrole, ali i između đubrenih varijanti. Tako su biljke iz bloka mineralnog đubriva, i kontrolne varijante, imale viši ukupni sadržaj seskviterpenskih laktona od biljaka iz bloka đubrenog stajskim đubrivom. Najmanje prinodne varijante u sadržaju DHHT bile su đubrene varijante generativnog razmnožavanja na prolećnom plotu sadnje, kao i varijanta generativnog razmnožavanja na jesenjem plotu sadnje u bloku mineralnog đubrenja. Preostale varijante na ogledu se međusobno nisu statistički značajno razlikovale. Na grafiku se takođe vidi da su sve varijante u svojim aritmetičkim sredinama zadovoljile minimum kriterijuma Evropske Farmakopeje (PhEur 6.0), ali isto tako je uočljivo da su vrednosti ukupnog sadržaja seskviterpenskih laktona u pojedinim ponavljanjima generativno razmnoženih biljaka u

blokovima mineralnog đubrenja, prolećnjeg i jesenjeg plota sadnje (PMG i JMG), bile ispod propisanog farmakopejskog minimuma.



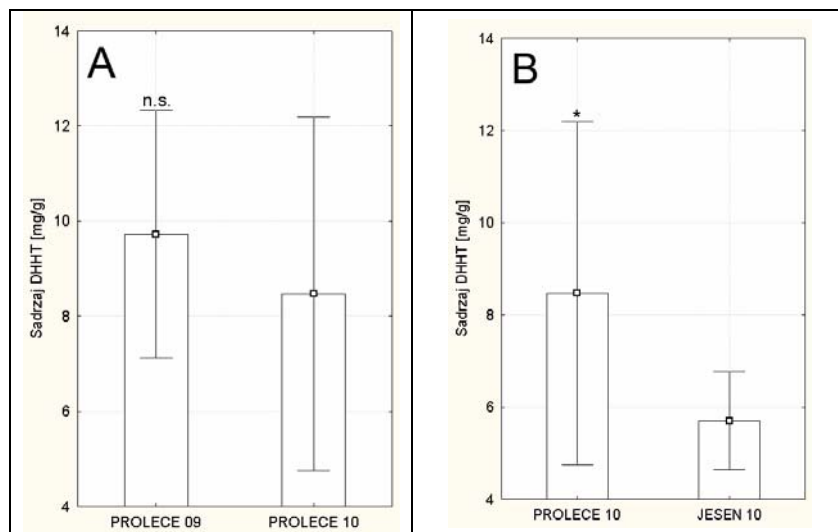
Grafik 77. Sadržaj DHHT u cvetnim glavicama arnike u 2010. godini

Iako je, u 2010. godini, faktor vrste đubrenja uticao na prinos DHHT u varijantama vegetativnog razmnožavanja na prolećnom plotu sadnje, ukupni uticaj ovog faktora na sadržaj DHHT u cvetnoj glavici arnike na ogledu nije bio značajan ni u jednoj posmatranoj godini (Grafik 78). Mogućnost prihvatanja nulte hipoteze je ocenjena veoma visokim verovatnoćama: $p = 0.97$, u 2009., i $p = 0.95$, u 2010. godini.



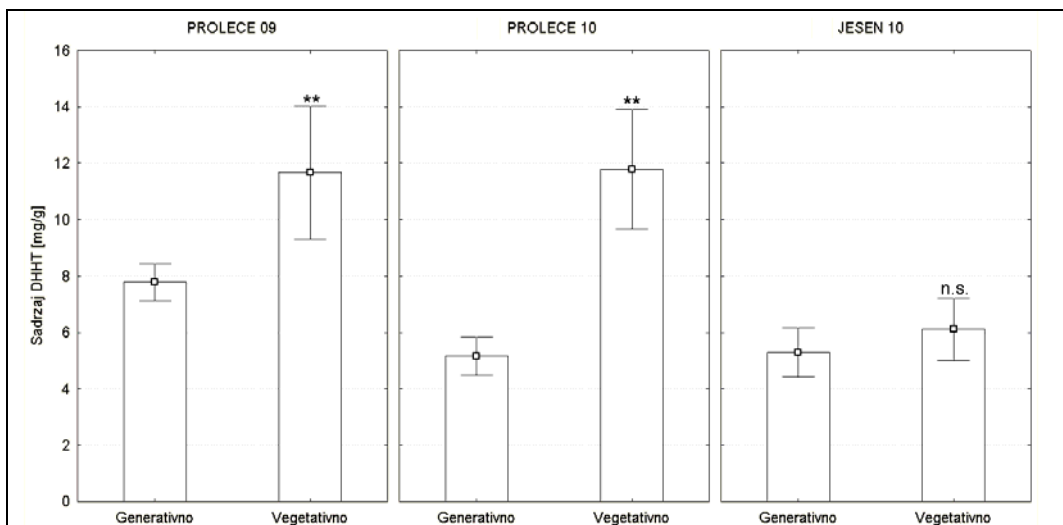
Grafik 78. Uticaj faktora đubrenja na sadržaj DHHT u cvetnim glavicama arnike

Posmatrajući prinose ukupnih seskviterpenskih laktona na prolećnom plotu sadnje, može se reći da nije bilo statistički značajnih razlika u sadržaju DHHT između 2009. i 2010. godine (Grafik 79A). Faktor vremena zasnivanja je uticao na variranje u sadržaju seskviterpenskih laktona, pa su biljke sađene na proleće u proseku imale veći sadržaj ($\bar{x} = 8,5$ mg/g) u odnosu na biljke sa jesenjeg plotu sadnje ($\bar{x} = 5,7$ mg/g) (Grafik 19B).



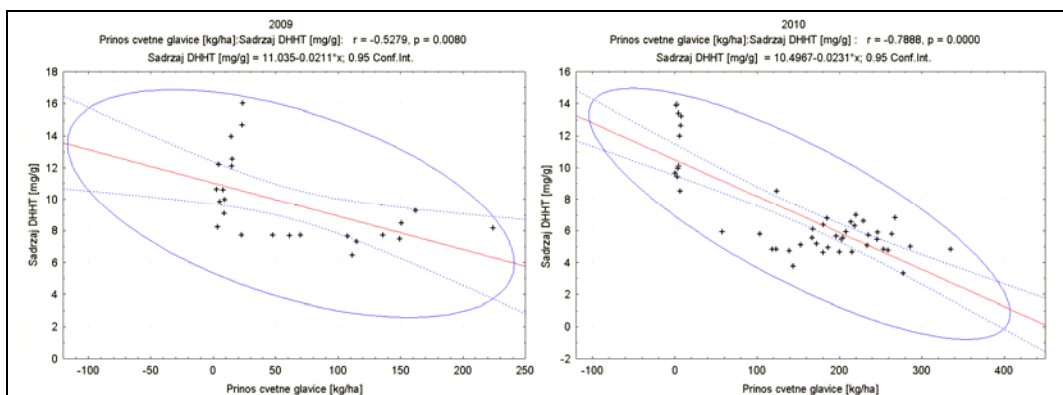
Grafik 79. Uticaj starenja (A) i vremena zasnivanja ogleđa (B) na sadržaj DHHT u cvetnoj glavici arnike

Faktor vrste sadnica uticao je na sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici samo na prolećnom plotu sadnje (Grafik 80). Vegetativno razmnožene biljke na prolećnom plotu sadnje imale su u proseku veći sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici ($\bar{x} = 11,7$ mg/g, u 2009., i $\bar{x} = 11,8$ mg/g, 2010. godini) od generativno razmnoženih varijanti na istom plotu ($\bar{x} = 7,8$ mg/g, u 2009., i $\bar{x} = 5,1$ mg/g, 2010. godini). Na jesenjem plotu sadnje nije bilo statistički značajnih razlika u pogledu sadržaja DHHT između varijanti različitog tipa razmnožavanja.



Grafik 80. Uticaj vrste sadnica na ukupni sadržaj seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici arnike

Odnos između prinosa cvetne glavice i sadržaja DHHT u njoj je u obe godine bio statistički značajno negativno korelisan ($r = -0,52$ u 2009. i $r = -0,78$ u 2010. godini) (Grafik 81). To praktično znači da su biljke sa najnižim prinosima cvetne glavice u isto vreme imale i najveći sadržaj DHHT i obrnuto.



Grafik 81. Odnos prinosa cvetne glavice i sadržaja DHHT

Sadržaj DHHT u cvetnim glavicama je takođe ispoljio u obe posmatrane godine, statistički značajne negativne korelacione odnose sa svim parametrima koji su uticali na prinos cvetne glavice (komponentama prinosa) (Tabela 27), što je i bilo za očekivati obzirom visoke vrednosti korelacionih koeficijenata ovih parametara sa parametrom prinosa cvetne glavice. Odnos sadržaja DHHT sa prečnikom cvetne glavice je u prvoj posmatranoj godini ocenjen značajnom jakom pozitivnom korelacijom ($r = 0.81$), ali se

ista gubi u narednoj godini, što pokazuje da je ova veza nestabilna i nepogodna za izvođenje zaključka.

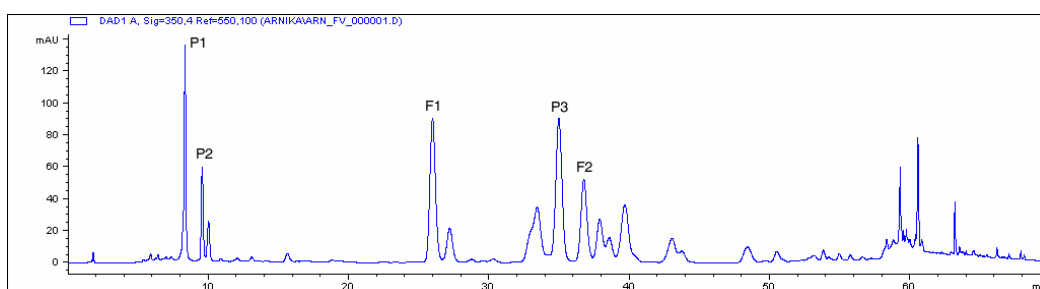
Tabela 27. Odnosi sadržaja DHHT u cvetnoj glavici sa ostalim osobinama

	Sadržaj DHHT	
	2009	2010
	[mg/g]	[mg/g]
Prečnik rozete [cm]	-.5492 p=.005	-.7331 p=.000
Visina cvetnog izdanka [cm]	-.5851 p=.003	-.7132 p=.000
Broj cvetnih izdanaka	-.4761 p=.019	-.6996 p=.000
Broj cvetnih glavica po biljci	-.5214 p=.009	-.5541 p=.000
Prečnik cvetne glavice	.8158 p=.000	.1200 p=.416
Broj rozeta	-.3898 p=.060	-.2936 p=.043
Prinos rizoma	-.2096 p=.326	-.1271 p=.389
Prinos korena	.0747 p=.729	-.0578 p=.696

Sadržaj dominantnih fenolnih komponenti

HPLC analiza

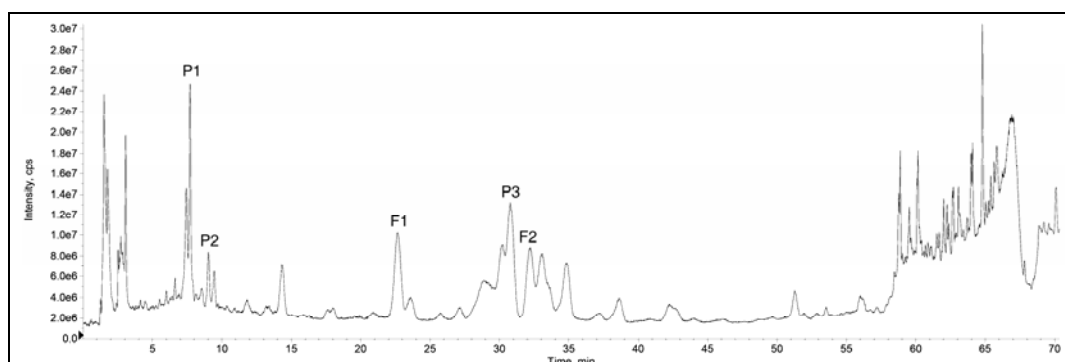
Cvetna glavica arnike je ekstrahovana smešom rastvarača metanol/aceton/voda (3:1:1) i analiziran je HPLC metodom, čiji je hromatogram prikazan na Slici 41. Kao dominantna jedinjenja posmatrane su komponente koje su na hromatogramu po visini pika prelazile 50 mAU. Na osnovu karakterističnih UV spektara, jedinjenja su preliminarno grupisana u dve grupe: fenolne kiseline (**P1-P3**) i flavonoidi (**F1** i **F2**).



Slika 41. HPLC DAD hromatogram ekstrakta cveta arnike ($\lambda = 350$ nm)

Identifikacija dominantnih fenolnih komponenti

Identifikacija dominantnih fenolnih komponenti izvršena je putem HPLC i LC-MS hromatografije poređenjem retencionih vremena, UV-spektara i molekularnih masa odabranih komponenti sa literaturnim podacima. Na Slici 42. predstavljen je LC-MS hromatogram na kome su obeleženi pikovi čija je identifikacija potvrđena detaljima koji su predstavljeni u Tabeli 28.



Slika 42. LC-ESI TOF MS hromatogram fenolnog kompleksa ekstrakta cveta arnike

Tabela 28. HPLC i LC-MS parametri odabranih jedinjenja

#	Rt-DAD (min)	UV spektar λ_{\max} (nm)	Rt-ESI ToF (min)	Molekulska formula	Masa komponente (g mol ⁻¹)	Naziv komponente
P1	8,78	220; 242; 308r; 328	7,72	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	hlorogenska kiselina
P2	10.21	228; 256; 298; 344	9,02	C ₉ H ₆ O ₄	180.16	6,7- dihidroksi kumarin *
F1	28,93	256; 266r; 308r; 354	22,67	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09	kvercetin-3- O-glc
P3	37.68	218; 242; 310r; 330	30,78	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.45	3,5- dikafeoilhina kiselina
F2	40,44	250r; 266; 304r; 348	32,24	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.10	kempferol-3- O-glc

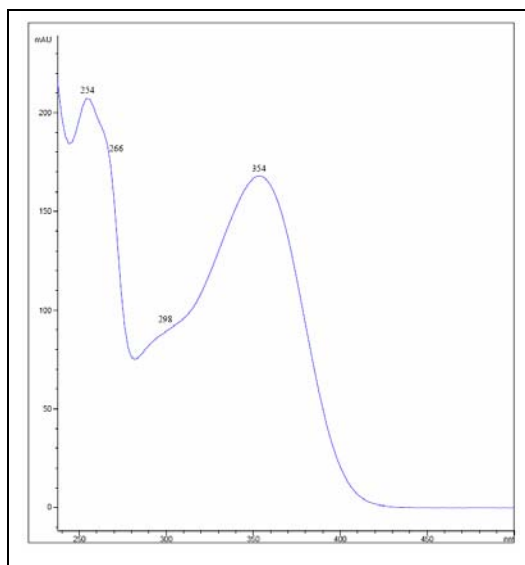
* - označava tentativnu identifikaciju

Izolovanje čistih flavonoidnih jedinjenja (**F1** i **F2**)

Metanolni ekstrakt je razdvojen na više frakcija hromatografijom na koloni silika gela (260 x 30 mm) (Metode poglavlje 3.3.2.4.2.1.). Frakcije 83-90 su spojene i semipreparativnom HPLC hromatografijom izolovana su dva jedinjenja: kvercetin 3-*O*- β -D-glukozid (izokvercitrin) (**F1**) i kempferol 3-*O*- β -D-glukozid (**F2**) (astragalin). Identifikacija izolovanih jedinjenja izvršena je na osnovu retencionih vremena, UV spektara, masenih spektara i ¹H-NMR spektara.

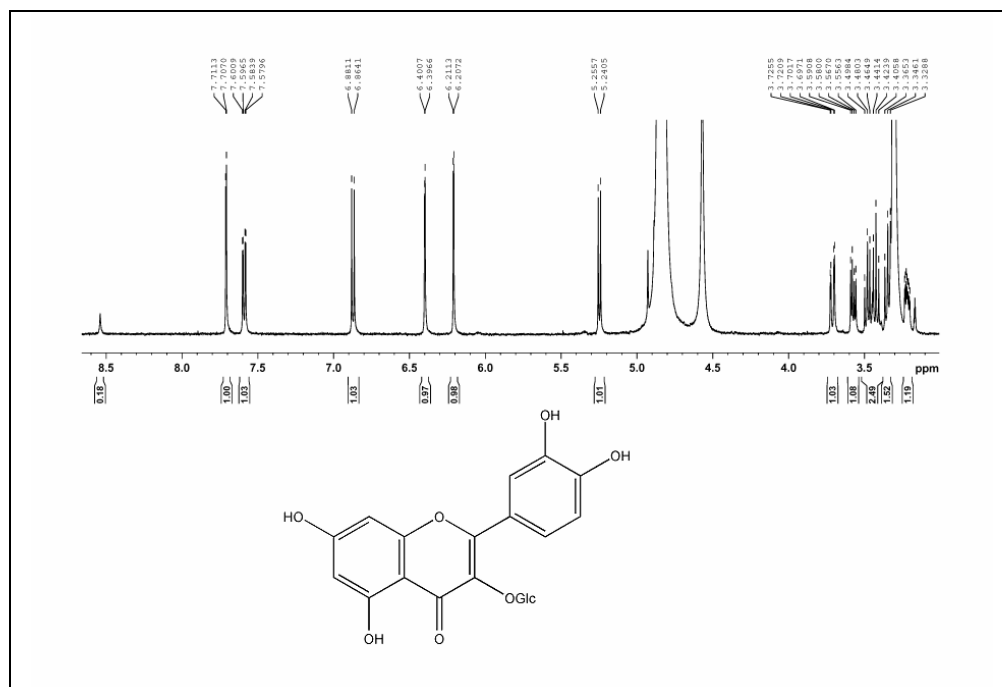
Kvercetin-3-*O*- β -D-glukozid (**F1**)

Na Slici 43 prikazan je UV spektar izolovanog jedinjenja koje je na HPLC-DAD hromatogramu izlazilo na 25,9 minutu.



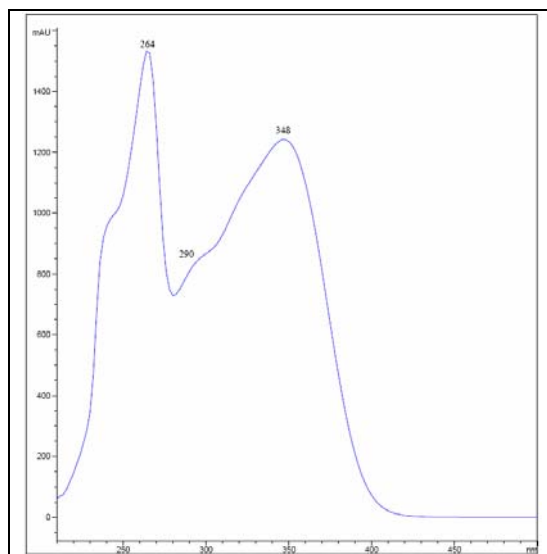
Slika 43. UV spektar ($\lambda = 350$ nm) kvercetin-3-*O*- β -D-glukozida (**F1**) u MeOH (Rt = 25.9 min)

Identifikacija izolovanog **F1** jedinjenja izvršena je HPLC i LC/MS analizom, a dobijeni podaci su prezentovani u Tabeli 28. Struktura izolovanog jedinjenja dodatno je potvrđena NMR analizom čiji je ^1H NMR spektar predstavljen na Slici 44. zajedno sa strukturnom formulom jedinjenja.



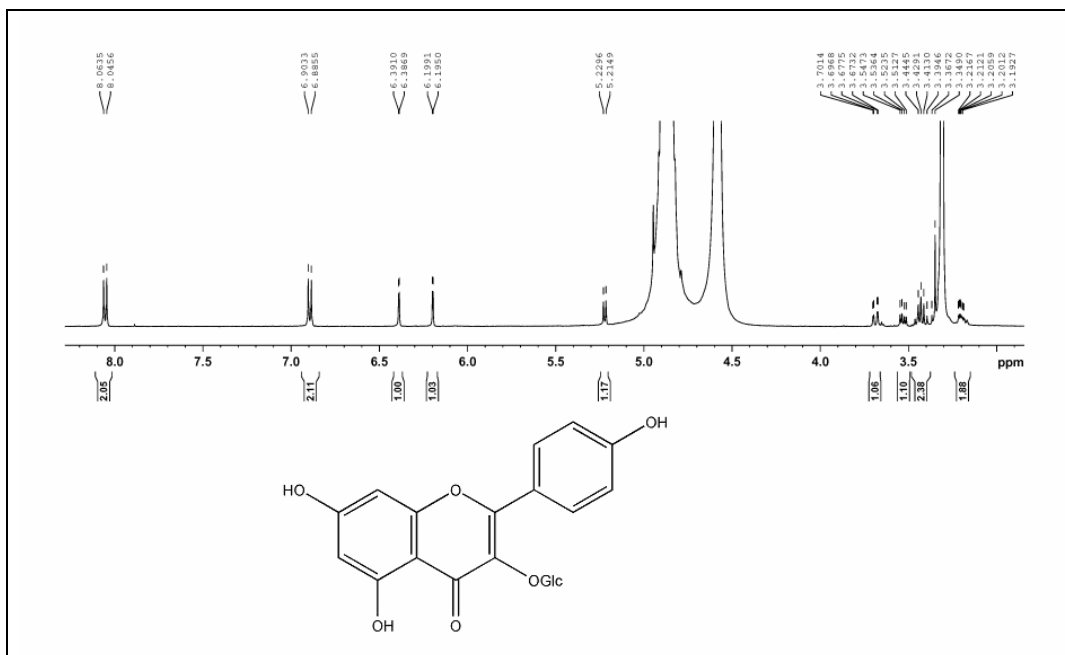
Slika 44. ^1H NMR (CD_3OD) spektar kvercetin-3-*O*- β -D-glukozida (**F1**)

Na Slici 45. prikazan je UV spektar izolovanog jedinjenja koje je na HPLC-DAD hromatogramu izlazilo na 36,6 minutu.



Slika 45. UV spektar ($\lambda = 350$ nm) kempferol-3-*O*- β -D-glukozida (**F2**) u MeOH ($R_t = 36.6$ min)

Identifikacija izolovanog **F2** jedinjenja izvršena je HPLC i LC/MS analizom, a dobijeni podaci su prezentovani u Tabeli 28. Struktura izolovanog jedinjenja dodatno je potvrđena NMR analizom čiji je ^1H NMR spektar predstavljen na Slici 46. zajedno sa strukturnom formulom jedinjenja.



Slika 46. ¹H NMR (CD₃OD) spektar kempferol-3-O-β-D-glukoziida (F2)

Kvantifikacija dominantnih fenolnih komponenti

Kvantifikacija fenolnih jedinjenja u cvetnoj glavici arnike je izvršena HPLC tehnikom, metodom eksternih standarda, i sadržaj tri odabrana jedinjenja: hlorogenske kiseline (P1), kvercetin-3-O-β-D-glukoziida (F1) i kempferol-3-O-β-D-glukoziida (F2) je prikazan u Tabeli 29.

Sadržaj **hlorogenske kiseline** u cvetnoj glavici arnike se u 2009. godini kretao od 3,1 – 6,0 mg/g, gde su varijante iz generativne propagacije prosečno imale veći sadržaj od varijanti vegetativnog razmnožavanja. Đubrenje je, u ovoj godini, imalo uticaj na sadržaj hlorogenske kiseline samo u varijantama vegetativne propagacije, gde su se vrednosti đubrenih varijanti statistički značajno razlikovale od kontrole. U 2010. godini sadržaj hlorogenske kiseline se kretao od 1,9 – 6,6 mg/g, gde su se vrednosti varijanti u blokovima đubrenja stajnjakom na oba plota sadnje statistički značajno razlikovale od svih ostalih varijanti.

Sadržaj **kvercetin-3-O-β-D-glukoziida** se u 2009. godini kretao od 8,4 – 13,9 mg/g, gde su kao i u slučaju sadržaja hlorogenske kiseline, generativno razmnožene varijante imale statistički značajno viši sadržaj od varijanti vegetativne propagacije. Uticaj đubrenja na variranje sadržaja ovog jedinjenja je bilo statistički značajno jedino u slučaju vegetativno razmnoženih biljaka u bloku đubrenja stajskim đubrivom. U 2010.

godini sadržaj kvercetin-3-*O*- β -D-glukoziida se kretao od 7,8 – 12,53 mg/g. Kao i u slučaju sadržaja hlorogenske kiseline, najprinosnije u sadržaju izokvercitrina su takođe bile varijante generativne propagacije u blokovima đubrenja stajnjakom na oba plota sadnje.

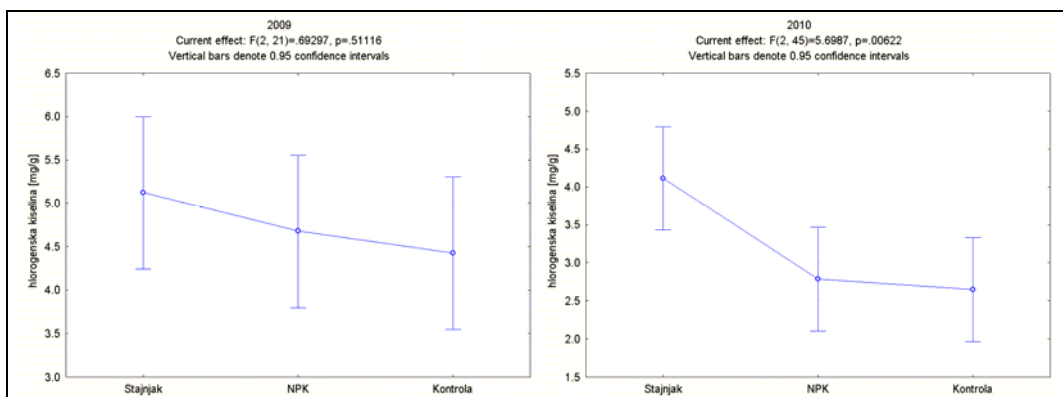
Sadržaj **kempferol-3-*O*- β -D-glukoziida** u 2009. godini se kretao od 2,1 – 4,7 mg/g, gde se nije mogla uočiti neka pravilnost u statističkoj značajnosti đubrenih varijanti, obzirom da su kod generativno razmnoženih varijanti najprinosnije biljke u ovom jedinjenju bile sa kontrolne varijante đubrenja, dok su kod vegetativno razmnoženih biljaka biljke sa bloka đubrenog stajskim đubrivom imale stistički značajno veći sadržaj astragalina u odnosu na biljke sa blokova mineralnog đubrenja i kontrole. U 2010. godini sadržaj astragalina se kretao od 2,1 – 4,5 mg/g, gde se po niskom sadržaju ovog jedinjenja statistički značajno izdvojila jedino varijanta vegetativnog razmnožavanja u bloku đubrenja stajskim đubrivom na jesenjem plotu sadnje. Sve ostale varijante na ogledu u pogledu sadržaja astragalina nisu se statistički značajno razlikovale.

Tabela 29. Sadržaj dominantnih fenolnih komponenti u cvetnoj glavici *A. montana*

	hlorogenska kiselina	kvercetin-3- <i>O</i> - β -D-glukoziid	kempferol-3- <i>O</i> - β -D-glukoziid
	[mg/g] ^a	[mg/g]	[mg/g]
2009			
POG	6.00 ± 0.77 a	12.65 ± 0.70 a	2.57 ± 0.24 cd
PMG	5.60 ± 0.40 a	13.91 ± 0.33 a	3.45 ± 1.05 bc
PKG	5.77 ± 0.26 a	13.66 ± 0.57 a	4.74 ± 0.34 a
POV	4.24 ± 0.46 b	10.84 ± 0.65 b	4.05 ± 0.46 ab
PMV	3.76 ± 0.42 b	9.24 ± 0.80 c	2.61 ± 0.65 cd
PKV	3.08 ± 0.24 c	8.37 ± 0.91 c	2.07 ± 0.20 d
2010			
POG	6.57 ± 2.18 a	12.53 ± 2.04 a	3.23 ± 1.21 ab
PMG	2.57 ± 0.10 b	10.08 ± 0.79 b-f	3.29 ± 0.65 ab
PKG	2.86 ± 0.59 b	11.10 ± 1.09 a-d	3.89 ± 1.08 a
POV	2.54 ± 0.36 b	9.85 ± 0.84 c-f	3.54 ± 0.40 ab
PMV	2.68 ± 0.37 b	8.07 ± 0.58 ef	3.86 ± 0.63 a
PKV	2.85 ± 0.64 b	8.17 ± 0.43 ef	3.16 ± 0.28 ab
JOG	5.48 ± 0.95 a	12.22 ± 1.58 ab	3.66 ± 0.31 ab
JMG	2.85 ± 1.01 b	10.29 ± 1.46 a-e	3.89 ± 0.73 a
JKG	2.82 ± 0.62 b	9.92 ± 0.86 b-f	4.03 ± 0.87 a
JOV	1.87 ± 0.54 b	7.76 ± 1.52 f	2.06 ± 1.09 b
JMV	3.04 ± 0.95 b	11.38 ± 1.89 abc	4.46 ± 1.07 a
JKV	2.05 ± 0.47 b	8.85 ± 0.09 def	3.43 ± 1.51 ab

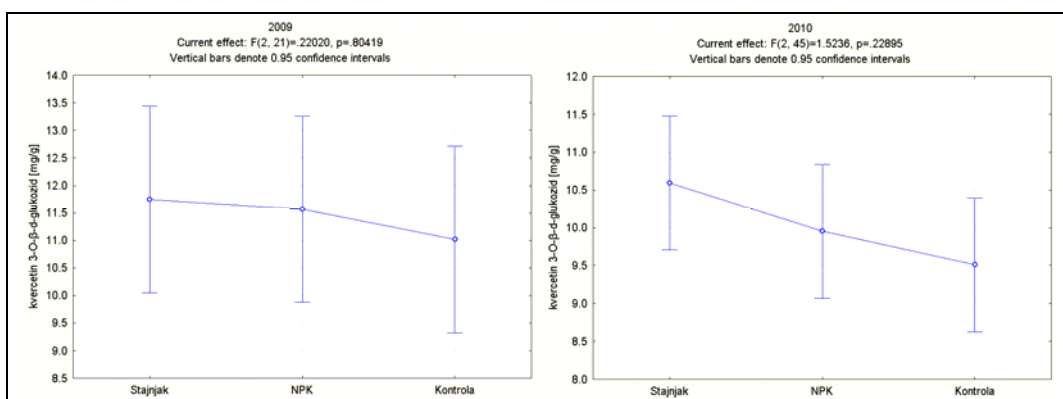
^a Različita slova označavaju statističku značajnost Dankanovog testa na nivou $p < 0.05$

Na grafiku 82. prikazan je uticaj faktora vrste đubrenja na sadržaj hlorogenske kiseline u cvetnoj glavici arnike. Uticaj ovog faktora je bio statistički veoma značajan samo u 2010. godini, gde su varijante u bloku đubrenja stajnjakom imale viši sadržaj od biljaka sa ostalih blokova đubrenja.



Grafik 82. Uticaj đubrenja na sadržaj hlorogenske kiseline u cvetnoj glavici arnike

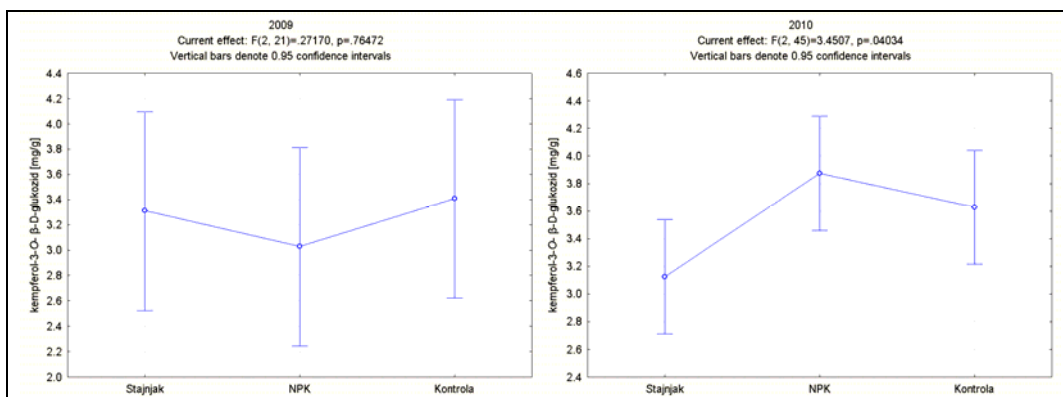
Na Grafiku 83. prikazan je uticaj faktora vrste đubrenja na sadržaj kvercetin-3-*O*- β -D-glukozida u cvetnoj glavici arnike. Iz prikazane analize se može zaključiti da uticaj ovog faktora ni u jednoj posmatranoj godini nije bio statistički značajan, odnosno da se hipoteza o jednakosti aritmetičkih sredina osnovnih skupova blokova đubrenja prihvata sa verovatnoćama $p = 0.80$, u 2009., i $p = 0.23$, u 2010. godini.



Grafik 83. Uticaj đubrenja na sadržaj kvercetin-3-*O*- β -D-glukozida u cvetnoj glavici arnike

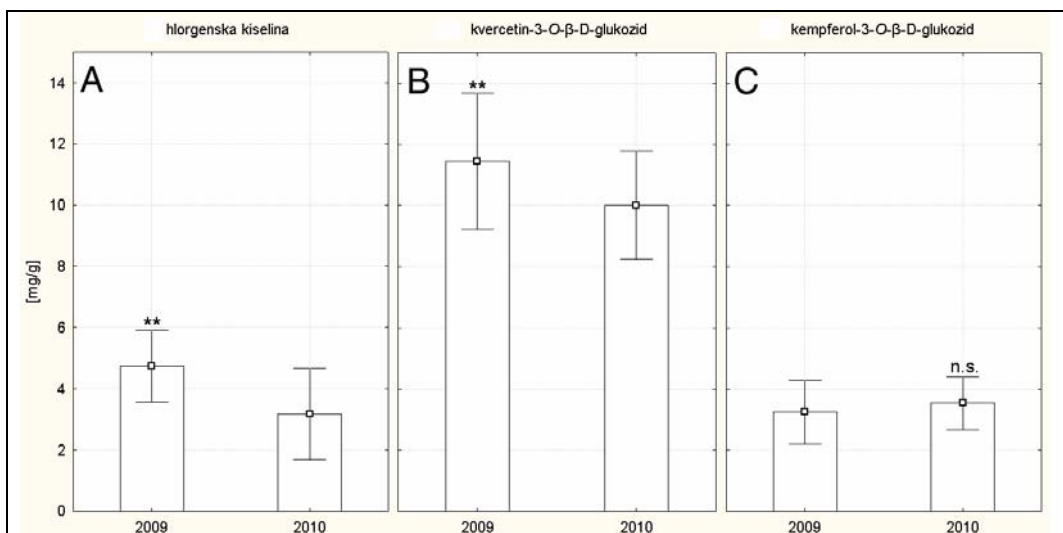
Na Grafiku 84. prikazan je uticaj faktora vrste đubrenja na kempferol-3-*O*- β -D-glukozida u cvetnoj glavici arnike. Uticaj ovog faktora na variranje sadržaja posmatranog jedinjenja je bio statistički značajan samo u drugoj posmatranoj godini, ali

ne može izvući kvalitetan zaključak o uzročno-posledičnoj vezi đubrenja i ovog svojstva, obzirom da su biljke đubrenih blokova, po sadržaju kempferol-3-*O*- β -D-glukozida, ni u jednoj godini nisu statistički značajno prevazilazile biljke iz kontrolnih varijanti, niti su kontrolne varijante bile prinosnije od đubrenih.



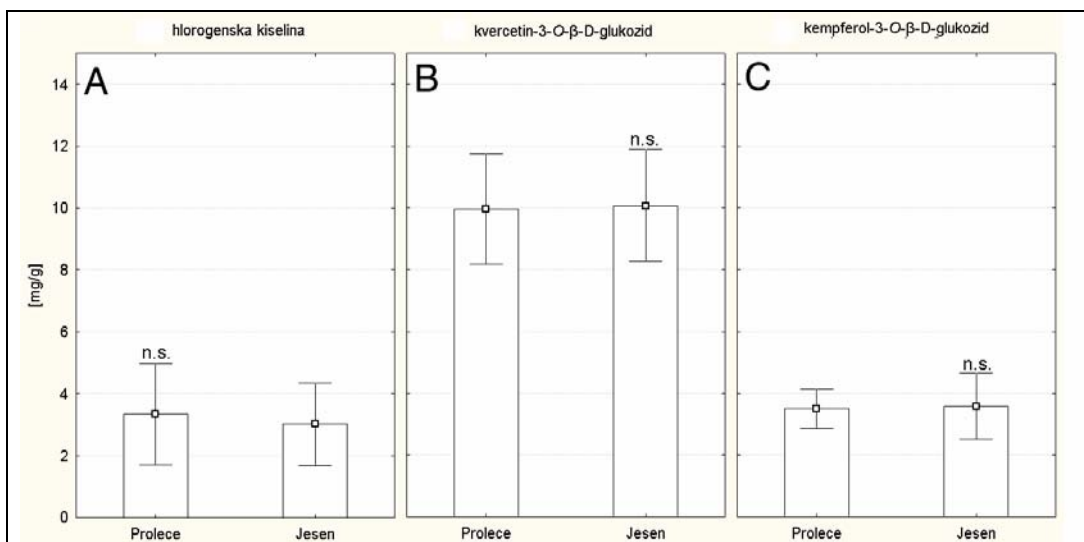
Grafik 84. Uticaj đubrenja na sadržaj kempferol-3-*O*- β -D-glukozida u cvetnoj glavici arnike

U 2009. godini biljke arnike na ogledu su u proseku imale statistički veoma značajno viši sadržaj hlorigenske kiseline i kvercetin-3-*O*- β -D-glukozida, dok u slučaju sadržaja kempferol-3-*O*- β -D-glukozida nije bilo statistički značajnih razlika između posmatranih godina (Grafik 85).



Grafik 85. Uticaj starenja na sadržaj hlorigenske kiseline (A), kvercetin-3-*O*- β -D-glukozida (B) i kempferol-3-*O*- β -D-glukozida (C) u cvetnoj glavici arnike na prolećnom plotu sadnje

Faktor vremena sadnje nije statistički značajno uticao na sadržaj odabranih fenolnih jedinjenja (Grafik 86 A, B i C).



Grafik 86. Uticaj vremena sadnje na sadržaj hlorogenske kiseline (A), kvercetin-3-O-β-D-glukozi (B) i kempferol-3-O-β-D-glukozi (C) u cvetnoj glavici arnike

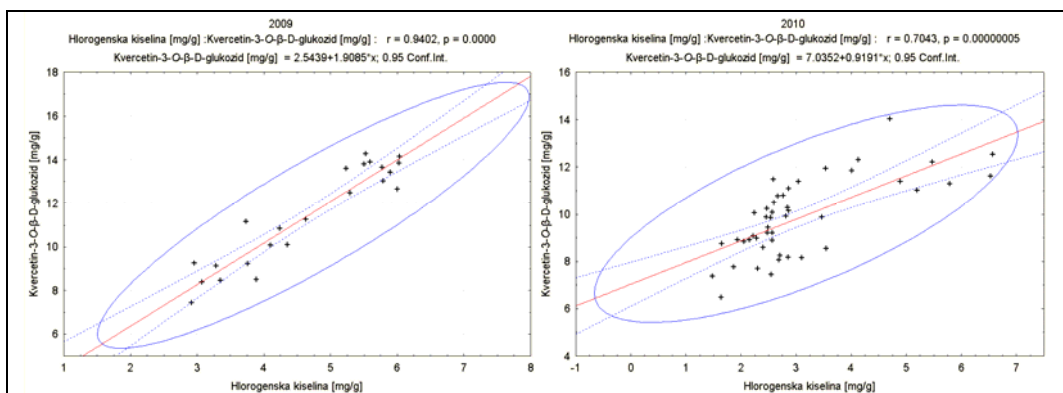
Biljke iz generativne propagacije su, u obe posmatrane godine i na oba plota sadnje, imale statistički značajno veći prinos hlorogenske kiseline i kvercetin-3-O-β-D-glukozi u odnosu na biljke razmnožene deljenjem bokora (Tabela 30). Variranje sadržaja kempferol-3-O-β-D-glukozi u cvetnim glavicama arnike nije bilo statistički značajno uslovljeno tipom sadnica.

Tabela 30. Uticaj tipa sadnica na sadržaj odabranih fenolnih jedinjenja

		Proleće		Jesen
		2009	2010	2010
Hlorogenska kiselina	Generativno	5.79 **	4.00 *	3.71 **
	Vegetativno	3.69	2.69	2.32
Kvercetin-3-O-β-D-glukozi	Generativno	13.41 **	11.24 **	10.81 *
	Vegetativno	9.48	8.69	9.33
Kempferol-3-O-β-D-glukozi	Generativno	3.59 n.s.	3.47 n.s.	3.86 n.s.
	Vegetativno	2.91	3.52	3.32

U prvoj godini (2009) hlorogenska kiselina i kvercetin-3-O-β-D-glukozi ostvaruju korelacione odnose sa većinom posmatranih parametara, ali u sledećoj godini (2010) jedini jak korelacioni odnos ($r > 0.5$) je odnos između ova dva jedinjenja (Grafik

87). Kempferol-3-*O*- β -D-glukozid nije ostvarivao značajne jake korelacione veze sa ostalim posmatranim parametrima.



Grafik 87. Odnos između sadržaja hlorogenske kiseline i kvercetin-3-*O*- β -D-glukozida u cvetnoj glavici arnike

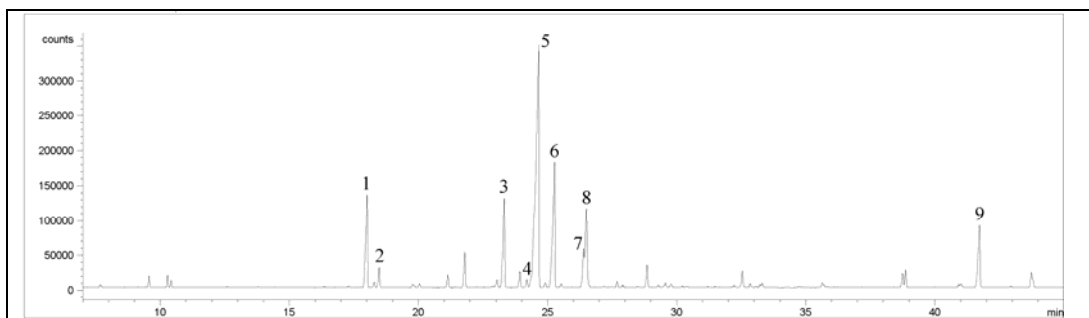
Tabela 31. Pregled uticaja faktora na variranje hemijskih parametara i interakcija između faktora

Izvor varijacije	DHHT		Hlorogenska kiselina		Kvervetin-3- <i>O</i> -glukozid		Kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	
	2009	p	p	p	p	p		
Vrsta sadnica (B)		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0021		
Vrsta djobrenja (C)		0.0535	0.0055	0.0435	0.2645			
B x C		0.0293	0.0418	0.0000	0.0000			
	2010							
Vreme sadnje (A)		0.0000	0.1476	0.7311	0.6829			
Vrsta sadnica (B)		0.0000	0.0000	0.0000	0.2807			
Vrsta djobrenja (C)		0.0789	0.0000	0.0235	0.0284			
A x B		0.0000	0.8484	0.0943	0.1942			
A x C		0.0317	0.0963	0.0014	0.1272			
B x C		0.0000	0.0000	0.0009	0.0498			
A x B x C		0.0138	0.5386	0.0069	0.1260			

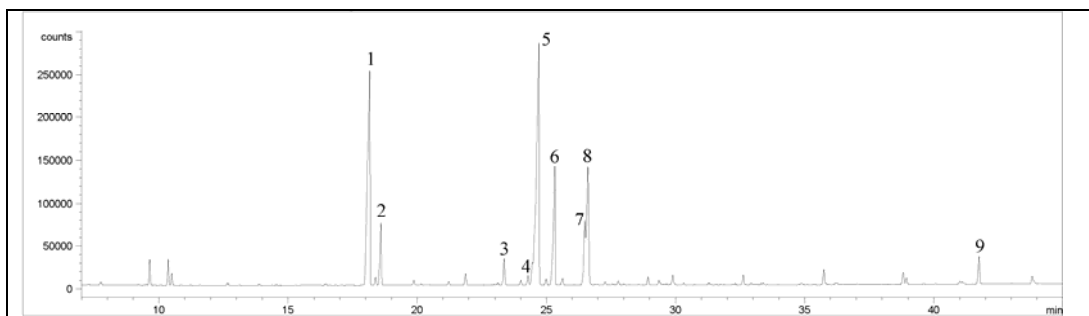
^a p vrednosti u tabeli predstavljaju verovatnoće prihvatanja nulte hipoteze

Hemijski profili etarskih ulja korena i rizoma

Izdestilisana etarska ulja iz korena i rizoma arnike analizirana su tehnikom gasne hromatografije (GC), a identifikacija komponenti ulja tehnikom gasno-masene hromatografije (GC/MS). Karakterističan hromatogram etarskog ulja korena predstavljen je na Slici 47., a karakterističan hromatogram etarskog ulja rizoma predstavljen je na Slici 48.



Slika 47. Karakteristični hromatogram etarskog ulja korena *A. montana*



Slika 48. Karakteristični hromatogram etarskog ulja rizoma *A. montana*

U Tabeli 32. dat je kompletan pregled hemijskog sastava etarskih ulja korena i rizoma odakle se vidi da su glavne komponente u dve uzastopne godine bili aromatični ugljovodonici, kao što su 2,5-dimetoksi-*p*-cimen (37,9 – 40,6% i 28,9 – 30,0%, respektivno), timol metil ether (9,6 – 10,6% i 26,1 – 27,1%, respektivno), *p*-metoksiheptanofenon (6,1 – 8,9% i 7,0 – 7,5%, respektivno) i 2,6-diizopropilanol (12,8 – 14,1% i 8,9 – 10,4 %, respektivno) (Tabela 30). Seskviterpenska frakcija bila je prisutna u manjoj meri (11,1 – 15,7% i 7,1 – 8,2%, respektivno) i mogu se primetiti kvalitativne razlike. Na kraju druge vegetacije rizom je sadržao trans-kariofillen dok koren nije. Na kraju treće vegetacije rizom je sintetisao germakren D, dok je koren sintetisao trans-kariofilen. Takođe se može primetiti da se ova dva etarska ulja razlikuju

u sadržaju pojedinih komponenti. Koren je sadržao veću količinu 2,5-dimetoksi-*p*-cimena, 2,6-diizopropilanisola, 7-epi-silfiperfol-5-ena i α -isokomena, dok je rizom veće količine timol metil etar, *p*-diizopropil-benzena, pinchoten acetata, *p*-metoksheptanofenona, *p*-cimena i α -felandrena.

Tabela 32. Hemijski sastav (%*m/m*) etraskog ulja iz korena i tizoma arnike

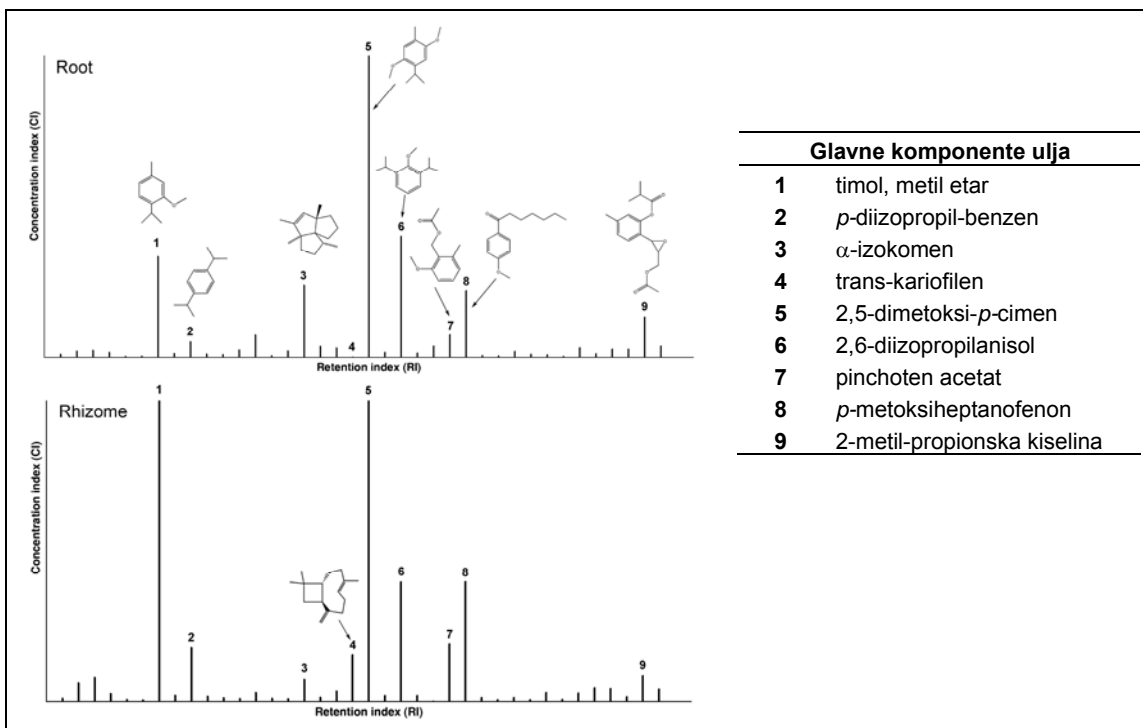
#	Komponenta	RI ^a	Koren		Rizom	
			2009 %	2010 %	2009 %	2010 %
1	kamfen	938	0.30 ± 0.09	0.21 ± 0.05	0.22 ± 0.07	0.29 ± 0.10
2	α -felandren	996	0.62 ± 0.14	0.61 ± 0.19	1.34 ± 0.31	1.12 ± 0.53
3	<i>p</i> -cimen	1017	0.72 ± 0.21	1.10 ± 0.33	1.75 ± 0.41	1.72 ± 1.08
4	limonene	1020	0.51 ± 0.11	0.38 ± 0.07	0.56 ± 0.09	0.58 ± 0.15
5	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dien	1081	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.03
6	α -terpineol	1186	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.13 ± 0.02
7	timol, metil etar	1229	10.57 ± 3.92	9.64 ± 2.90	27.16 ± 6.72	26.10 ± 8.83
8	karvakrol, metil ether	1236	0.38 ± 0.07	0.35 ± 0.05	0.44 ± 0.02	0.47 ± 0.10
9	<i>p</i> -diizopropil-benzen	1242	1.62 ± 0.73	2.02 ± 0.76	3.96 ± 1.00	5.73 ± 1.93
10	bornil acetat	1277	0.32 ± 0.10	0.33 ± 0.09	0.36 ± 0.35	0.05 ± 0.02
11	timol	1293	0.28 ± 0.11	0.59 ± 0.18	0.25 ± 0.23	0.19 ± 0.07
12	silfiperfol-5-en	1314	0.76 ± 0.31	1.80 ± 0.42	0.19 ± 0.06	0.39 ± 0.18
13	7-epi-silfiperfol-5-en	1332	2.33 ± 0.92	0.15 ± 0.05	0.63 ± 0.16	0.16 ± 0.04
14	silfiperfol-6-en	1365	0.14 ± 0.06	0.39 ± 0.11	0.21 ± 0.09	0.56 ± 0.16
15	modhef-2-en	1369	0.66 ± 0.27	0.03 ± 0.00	0.18 ± 0.06	0.11 ± 0.04
16	α -izokomen	1376	7.57 ± 3.33	5.17 ± 1.21	1.60 ± 0.45	1.27 ± 0.40
17	β -izokomen	1394	1.14 ± 0.44	0.86 ± 0.19	0.29 ± 0.07	0.23 ± 0.07
18	izobornil izobutanoat	1406	0.96 ± 0.24	1.12 ± 0.21	0.74 ± 0.33	1.12 ± 0.30
19	trans-kariofilen	1408	-	1.07 ± 0.50	3.39 ± 2.47	1.11 ± 0.15
20	2,5-dimetoksi- <i>p</i> -cimene	1417	37.94 ± 3.80	40.65 ± 3.80	28.89 ± 5.15	29.99 ± 5.89
21	α -trans-bergamoten	1426	0.50 ± 0.35	0.50 ± 0.23	0.42 ± 0.31	0.40 ± 0.17
22	2,6-diizopropilanisol	1438	12.76 ± 1.73	14.1 ± 1.18	8.88 ± 1.89	10.38 ± 2.32
23	cis- β -farnesen	1448	0.44 ± 0.37	0.29 ± 0.03	0.42 ± 0.08	0.41 ± 0.13
24	germakren D	1471	1.17 ± 0.00	0.02 ± 0.01	-	1.42 ± 1.89
25	pinchoten acetat*	1473	2.35 ± 0.51	2.51 ± 0.29	4.24 ± 0.86	4.73 ± 2.33
26	<i>p</i> -metoksiheptanofenon	1476	6.97 ± 0.93	7.50 ± 0.77	8.90 ± 1.26	6.12 ± 4.25
27	izobornil 2-metil butanoat	1496	0.18 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.27 ± 0.10	0.10 ± 0.10
28	izobornil izovalerat	1506	0.13 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.10 ± 0.04	0.37 ± 0.23
29	β -seskvifelandren	1514	0.62 ± 0.31	0.62 ± 0.33	0.27 ± 0.14	0.13 ± 0.05
30	dimetil-jonon	1571	0.30 ± 0.08	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.30 ± 0.09
31	zieron	1578	0.24 ± 0.08	0.04 ± 0.01	0.63 ± 0.20	0.67 ± 0.33
32	n.i.	1633	0.07 ± 0.00	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.18 ± 0.06
33	n.i.	1677	0.99 ± 0.30	2.04 ± 0.64	0.59 ± 0.11	0.42 ± 0.18
34	n.i.	1790	0.36 ± 0.09	0.27 ± 0.09	0.98 ± 0.24	0.44 ± 0.21
35	3-(3-hidroksi-4-metil-fenil)-3,4,4-trimetil-ciklopentanon	1989	0.84 ± 0.18	1.13 ± 0.24	0.92 ± 0.39	0.43 ± 0.44
36	n.i.	1993	0.85 ± 0.26	0.55 ± 0.47	0.33 ± 0.05	0.50 ± 0.54
37	2-metil-propionska kiselina-2-[3-[(acetiloksi)metil]oksiranil]-5-metilfenil estar	2018	4.22 ± 1.47	2.15 ± 2.89	1.87 ± 0.54	1.04 ± 0.67
38	n.i.	2106	1.17 ± 0.58	0.98 ± 0.98	0.88 ± 0.43	0.56 ± 1.05
Procentat identifikovanih			96.60%	96.07%	97.16%	97.91%

n.i. – nije identifikovano

* - tentativna identifikacija

^a Retenciona vremena odgovaraju n-alkanima na HP-% kapilarnoj koloni

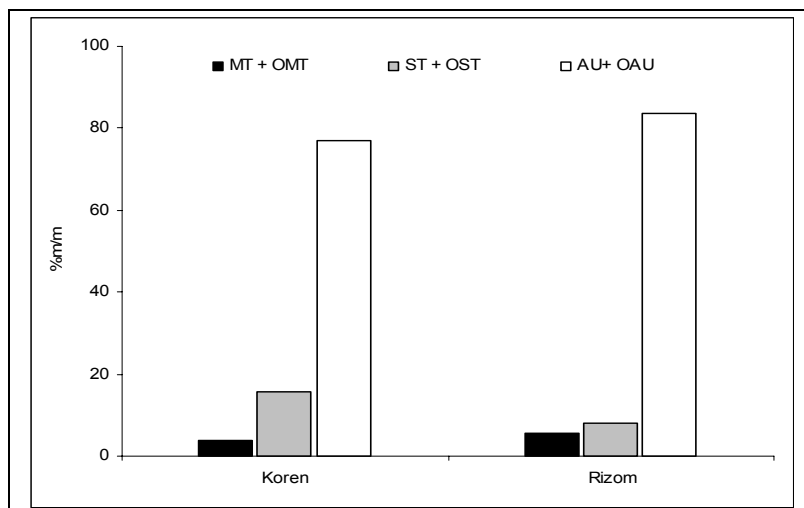
Uprosečene vrednosti sadržaja identifikovanih jedinjenja etarskih ulja korena i rizoma arnike za obe posmatrane godine prikazani su na Slici 48. kao normalizovani hromatogrami sa imenima i strukturnim formulama glavnih komponenti (>4%).



Slika 49. Normalizovani hromatogrami sa strukturnim formulama glavnih komponenti etarskih ulja korena i rizoma arnike.

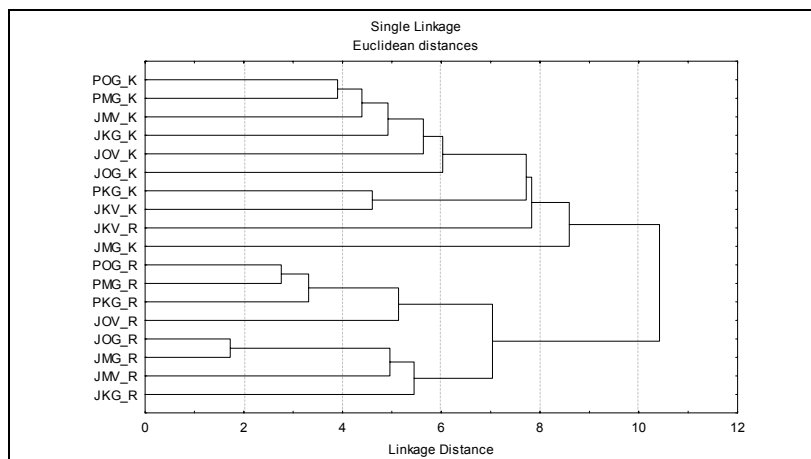
Sa prikazanih hromatograma (Slike 47 i 48), iz Tabele 30 i sa normalizovanih hromatograma (Slika 49), može se zaključiti da su hemijski profili etarskih ulja korena i rizoma arnike veoma slični, sa izuzetkom sadržaja timol-metil estra, koji se u ulju rizoma pojavljuje kao druga dominantna komponenta, dok je u korenu jasno izražena dominacija samo 2,5-dimetoksi-*p*-cimena.

U oba ulja najzastupljenija je bila frakcija aromatičnih ugljovodonika, dok su seskviterpeni i monoterpeni imali manji udeo (Grafik 92).



Grafik 92. Glavne grupe komponenti zastupljene u korenu i rizomu *A. montana* **MT** – monoterpeni, **OMT** – oksigenovani monoterpeni; **ST** – seskviterpeni, **OST** – oksigenovani seskviterpeni; **AU** – aromatični ugljovodonici, **OAU** – oksigenovani aromatični ugljovodonici

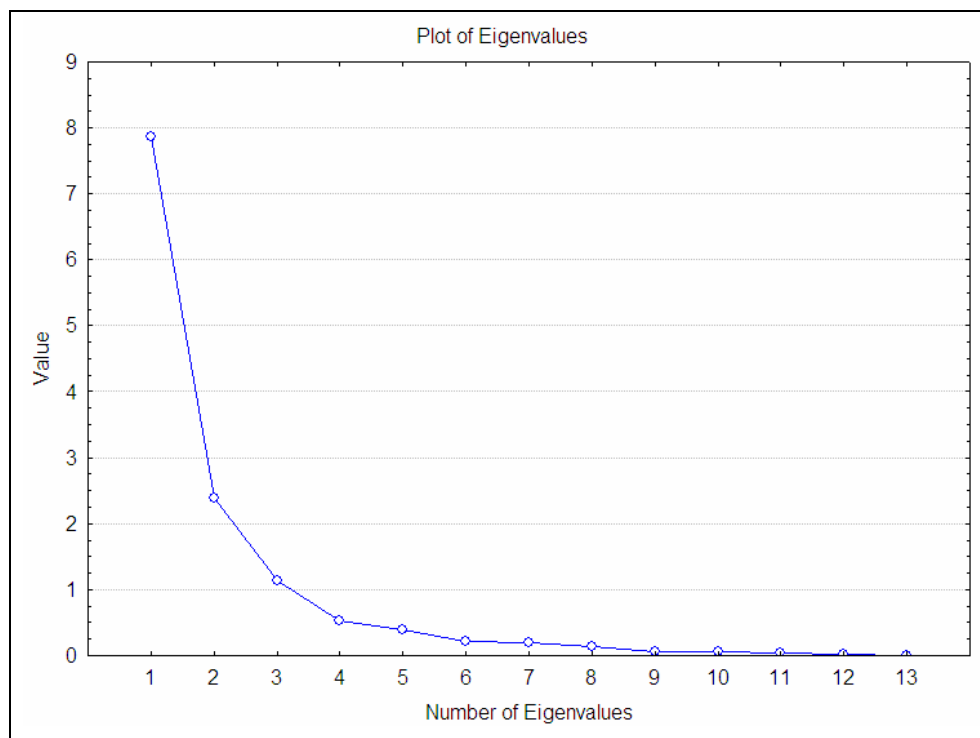
Rezultati klasifikacije etarskih ulja korena i rizoma arnike po sličnosti predstavljeni su u dendrogramu na Grafiku 93. Iz prikazane klasifikacije se može videti da su se sve varijante etarskog ulja korena, izuzev varijante generativnog razmnožavanja u bloku mineralnog đubrenja na jesenjem plotu sadnje, grupisale u jednu grupu na udaljenosti ispod 8 jedinica rastojanja, dok su se sve varijante etarskih ulja rizoma, takođe, grupisale u jednu grupu na oko 7 jedinica rastojanja, izuzev vegetativno razmnožene varijante u kontrolnom bloku đubrenja na jesenjem plotu sadnje.



Grafik 93. Euklidova rastojanja gajenih varijanti arnike po sličnosti hemijskog sastava etarskog ulja

6.5. Međusobni odnosi testiranih karakteristika

Iz korelacione matrice svih posmatranih osobina u 2009. godini ekstrahovano je tri faktora* metodom glavnih komponenti. Broj značajnih faktora određen je kriterijumom eigenvalues većih od 1 (Grafik 88).



Grafik 88. Eigenvalues u 2009. godini (Scree-plot)

* Termin „FAKTOR“ koji se koristi u faktorskoj analizi predstavlja veštačku promenljivu koja objašnjava međuzavisnost većeg broja promenljivih i nema veze sa terminom „Faktor“ koji se koristi u ANOVA.

Iz faktorskih opterećenja posmatranih osobina arnike u 2009. godini koja su data u Tabeli 33. može se zaključiti da su se posmatrani parametri grupisali po: komponentama prinosa cvetne glavice - **Faktor 1**, hemijske karakteristike cvetne glavice - **Faktor 2** i grupa podzemnih organa - **Faktor 3**.

Tabela 33. Faktorska opterećenja posmatranih osobina u 2009. godini.

2009	Opterećenja na faktoru ^a		
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
Prečnik rozete	0.9190	0.1946	0.1831
Visina cvetnog izdanka	0.8732	0.2999	0.0865
Broj cvetnih izdanaka	0.9142	0.1164	0.2706
Broj cvetnih glavica po biljci	0.9400	0.1164	0.2370
Prečnik cvetne glavice	-0.5686	-0.6394	0.1890
Prinos cvetne glavice	0.9326	0.1723	0.2092
Broj sek. rozeta	0.6385	0.2738	0.5013
Prinos rizoma	0.4409	0.0989	0.8703
Prinos korena	0.0548	-0.1835	0.8913
Sadržaj DHHT	-0.4627	-0.7462	0.0695
Hlorogenska kiselina	0.6627	0.6494	0.0510
Kvercetin-3-O-glc	0.5733	0.7885	0.0398
Kempferol-3-O-glc	-0.2247	0.9146	0.0338

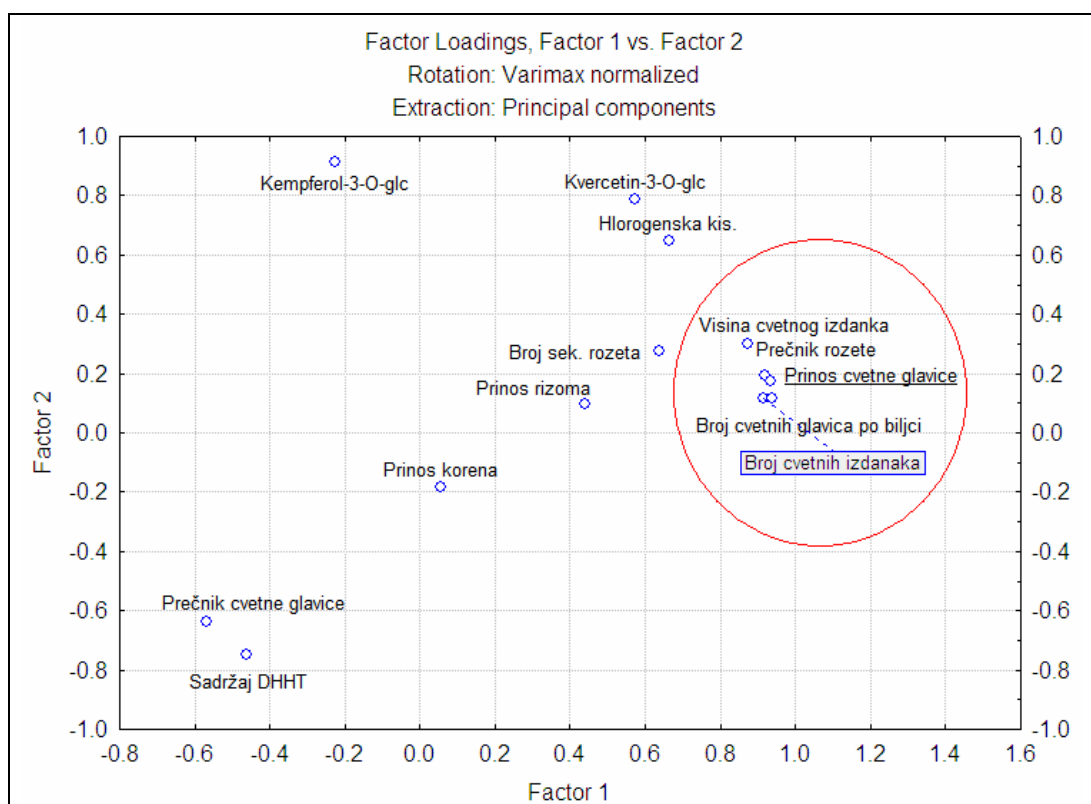
^a crveno su markirana opterećenja >0.70

Procenat ukupne varijanse koji je objašnjen ekstrahovanim faktorima u 2009. godini zajedno sa eigenvalues dat je u Tabeli 34., odakle se može videti da Faktor 1 nosi najveću informaciju i da objašnjava preko 60% ukupne varijanse, Faktor 2 objašnjava oko 18% varijanse, dok Faktor 3 objašnjava oko 9% ukupne varijanse. Kumulativno, prva dva faktora objašnjavaju preko 78% ukupne varijanse, a sva tri faktora zajedno preko 87% ukupne varijanse.

Tabela 34. Eigenvalues faktora u 2009. godini i procenat varijanse koji objašnjavaju

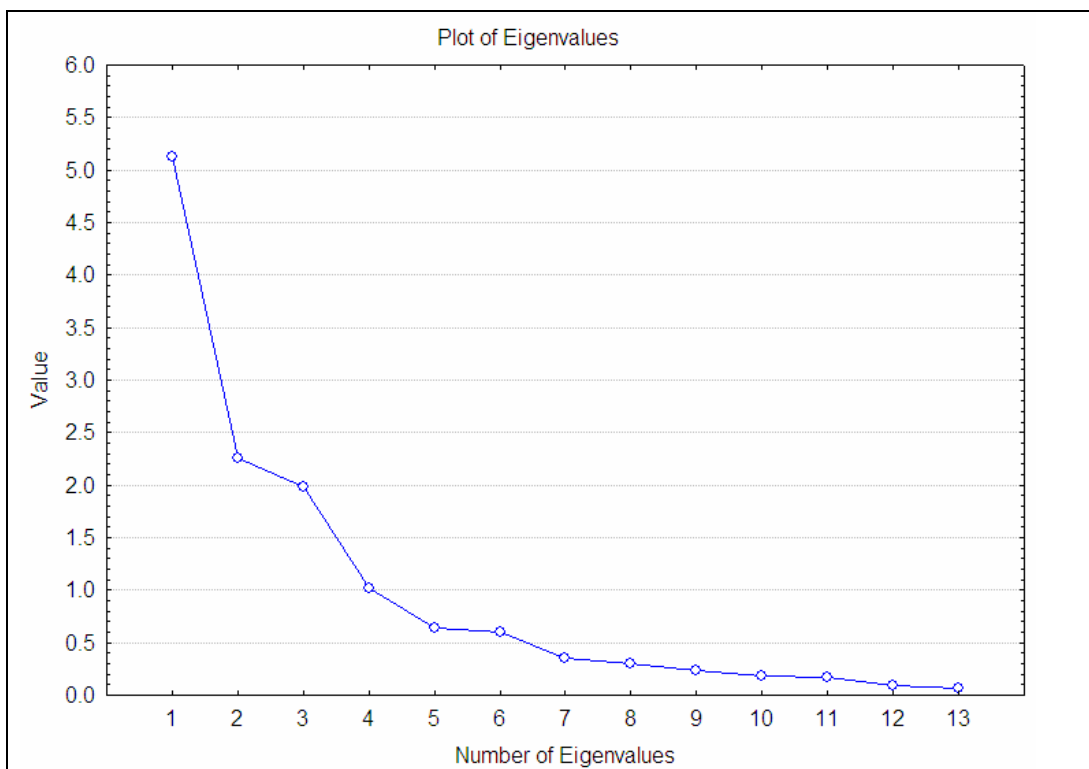
Faktor	Eigenvalues	% Ukupne objašnjene varijanse	Kumulativni eigenvalues	% Kumulativno objašnjene varijanse
1	7.8576	60.4433	7.8576	60.4433
2	2.3793	18.3019	10.2369	78.7452
3	1.1321	8.7088	11.3690	87.4541

Na Grafiku 89. predstavljena su faktorska opterećenja posmatranih osobina u odnosu na Faktor 1 i Faktor 2 koji nose najveću informaciju pojašnjenja ukupne varijanse. Na Grafiku, kao i u Tabeli 33, se može videti da su se osobine koje su usko vezane za prinos cvetne glavice (komponente prinosa) značajno korelisane (faktorska opterećenja $>0,7$) sa Faktorom 1, dok su hemijske karakteristike korelisane sa Faktorom 2 (fenolna jedinjenja pozitivno, a sadržaj DHHT negativno). Prinos korena i rizoma značajno su korelisani sa Faktorom 3, ali na ovom grafiku gravitiraju sredini koordinatnog sistema, što ukazuje na slabe veze ova dva parametra sa prezentovanim faktorima. Redukcijom podataka možemo zaključiti da su na prinos cvetne glavice u 2009. godini najviše uticale: visina cvetnog izdanka, prečnik rozete, broj cvetnih glavica po biljci i broj cvetnih izdanaka. Takođe se može zaključiti da je sadržaj fenolnih jedinjenja negativno korelisani sa sadržajem ukupnih seskviterpenskih laktona (DHHT).



Grafik 89. Faktorska opterećenja za prva dva faktora ($>78\%$ objašnjene ukupne varijanse)

Iz korelacione matrice svih posmatranih osobina u 2010. godini ekstrahovano je četiri faktora metodom glavnih komponenti. Broj značajnih faktora određen je kriterijumom eigenvalues većih od 1 (Grafik 90).



Grafik 90. Vrednosti latentnih korenova u 2010. godini (Scree-plot)

Kao i u prethodnoj godini, iz faktorskih opterećenja posmatranih osobina arnike u 2010. godini (Tabela 35) može se zaključiti da su se posmatrani parametri grupisali po: komponentama prinosa cvetne glavice (ovaj put zajedno sa negativno korelisanim sadržajem DHHT) - **Faktor 1**, hemijske karakteristike cvetne glavice (samo fenolna jedinjenja) - **Faktor 2**, grupa podzemnih organa - **Faktor 3** i ostale osobine – **Faktor 4**.

Tabela 35. Faktorska opterećenja posmatranih osobina u 2010. godini.

2010	Opterećenja na faktoru ^a			
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4
Prečnik rozete	0.9167	0.1363	0.0199	0.0883
Visina cvetnog izdanka	0.8970	0.2465	-0.0140	0.0157
Broj cvetnih izdanaka	0.9056	-0.0577	0.0657	0.0710
Broj cvetnih glavica po biljci	0.8579	-0.0664	-0.2647	-0.1790
Prečnik cvetne glavice	0.0861	0.0051	0.0007	-0.9166
Prinos cvetne glavice	0.9465	0.0759	-0.0920	0.0060
Broj sek. rozeta	0.2816	-0.2090	0.2078	0.6814
Prinos rizoma	0.0293	0.0109	0.8816	0.1698
Prinos korena	-0.1349	0.1163	0.7978	0.0099
Sadržaj DHHT	-0.8239	-0.0803	-0.1407	-0.2238
Hlorogenska kiselina	0.1412	0.7255	0.4233	-0.1181
Kvercetin-3- <i>O</i> -glc	0.2958	0.8431	0.2501	-0.0028
Kempferol-3- <i>O</i> -glc	-0.0953	0.8010	-0.2991	-0.1043

^a crveno su markirana su opterećenja >0.7

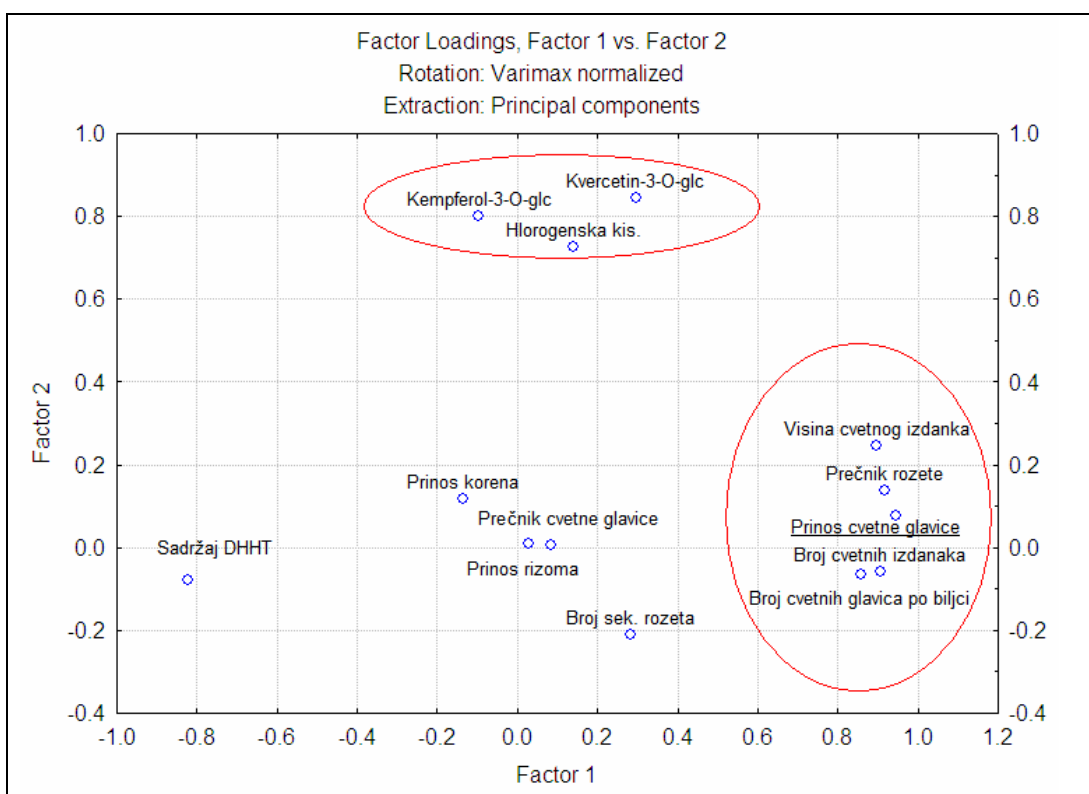
Procenat ukupne varijanse koji je objašnjen ekstrahovanim faktorima u 2010. godini zajedno sa vrednostima latentnih korenova dat je u Tabeli 36., odakle se može videti da Faktor 1 nosi najveću informaciju i da objašnjava oko 40% ukupne varijanse, Faktor 2 objašnjava oko 17%, Faktor 3 oko 15%, Faktor 4 oko 8% ukupne varijanse. Kumulativno, prva dva faktora objašnjavaju preko 56% ukupne varijanse, a sva četiri faktora zajedno skoro 80% ukupne varijanse.

Tabela 36. Eigenvalues faktora u 2010. godini i procenat varijanse koji objašnjavaju

Faktor	Eigenvalues	% Total objašnjene varijanse	Kumulativni eigenvalues	% Kumulativno objašnjene varijanse
1	5.1261	39.4313	5.1261	39.4313
2	2.2566	17.3586	7.3827	56.7900
3	1.9844	15.2645	9.3671	72.0544
4	1.0113	7.7793	10.3784	79.8337

Grafik 15. predstavlja su faktorska opterećenja posmatranih osobina u 2010 godini u odnosu na dva faktora koji nose najveću informaciju pojašnjanja ukupne varijanse (preko 56%). Na grafiku se može videti da su osobine koje su usko vezane za prinos cvetne glavice (komponente prinosa) značajno pozitivno korelisane sa Faktorom 1, ali da je sa istim faktorom sadržaj DHHT negativno korelisano. Ostale hemijske

karakteristike (fenolna jedinjenja) su pozitivno korelisane sa Faktorom 2. Prinosi korena i rizoma značajno su korelisani sa Faktorom 3, ali, obzirom da grafički prikaz predstavlja samo prva dva faktora, na ovom grafiku faktorska opterećenja ovih parametara su locirana na sredini koordinatnog sistema, što ukazuje na slabe veze ova dva parametara sa prezentovanim faktorima. Ostale osobine: broj sekundarnih rozeta i prečnik cvetne glavice, nisu korelisane ni sa jednim napred ekstrahovanim faktorom, tako da su pripale Faktoru 4, koji po definiciji nije korelisani sa jednim od prethodno objašnjenih faktora. Redukcijom podataka možemo zaključiti da su na prinos cvetne glavice u 2010. godini, kao i u prethodnoj godini, najviše uticale: visina cvetnog izdanka, prečnik rozete, broj cvetnih glavica po biljci i broj cvetnih izdanaka. Takođe se može zaključiti da je prinos cvetnih glavica u ovoj godini bio negativno korelisani sa sadržajem ukupnih seskviterpenskikh laktona (DHHT).



Grafik 91. Faktorska opterećenja za prva dva faktora u 2010. godini (>56% objašnjene ukupne varijanse)

Za sekvencijalnu klasifikaciju varijanti zasnivanja plantaže arnike uzeti su parametri prinosa i hemijskog sastava cvetne glavice, gde je prinos cvetne glavice

proglašen za najbitnije svojstvo. Kako su diskriminacioni efekti računati kao udaljenost od maksimalnih vrednosti izabranih osobina, sekvencionalno rangiranje je u recipročnom odnosu sa visinom izračunatog I-odstojanja (Tabela 37). Kao maksimalne vrednosti poželjinih parametara uzete su $X_{max} = \{\text{prinos cvetne glavice; ukupni sadržaj SL; sadržaj kvercetin-3-O-glukozida; sadržaj hlorogenske kiseline; sadržaj kemferol-3-O-glukozida}\} = \{258,69; 13,92; 12,53; 6,57; 4,46\}$.

Tabela 37. Rangirane varijante zasnivanja plantaže arnike prema prinosu i hemijskom sastavu cvetne glavice

Model	I-odstojanje	Rang
JOG	1.3345	I
JMV	1.9896	II
JMG	2.0142	III
POG	2.1538	IV
JKG	2.8368	V
PMG	3.0620	VI
JKV	3.1804	VII
PKG	3.2222	VIII
JOV	4.1240	IX
POV	4.5216	X
PMV	4.6539	XI
PKV	5.3325	XII

Na ovaj način rangirane kombinacije indukovanih faktora daju odgovor koliko su udaljene od najpoželjnije varijante koja uzima prinos cvetne glavice za najbitnije svojstvo, ne zanemarujući pri tom važnost hemijskih karakteristika.

6.6. Biološki efekti

Odabrani ekstrakti za biološke testove

Za biološke testove odabrani su ekstrakti i etarska ulja sa ekstremnim vrednostima sadržaja sekundarnih metabolita (Tabela 38). Tako su od ekstrakata cvetne glavice arnike odabrani ekstrakt sa najvećim (**SL max**) i najnižim sadržajem DHHT (**SL min**), a isto tako i ekstrakti sa najvišim (**F max**) i najnižim (**F min**) ukupnim sadržajem tri kvantifikovana fenolna jedinjenja: hlorogenske kiseline (**P1**), kvercetin-3-O-

glukozida (**F1**) i kemferol-3-*O*-glukozida (**F2**). Kao kriterijum za razdvajanje etarskih ulja rizoma i korena uzeta je suma procentualnog učešća aromatičnih jedinjenja, tako da su i u jednom i u drugom slučaju maksimalne vrednosti označene sa **AU max**, a minimalne sa **AU min**. Svi ekstrakti i etarska ulja uzeti su iz 2010. godine. U Tabeli 36 takođe su prikazano poreklo uzoraka maksimalnih i minimalnih vrednosti kao i njihova razlika u vrednostima. U testovima antioksidativne aktivnosti korišćeni su ekstrakti cvetne glavice arnike, dok su za testiranje antimikrobne aktivnosti, pored ovih ekstraktata, testirane i aktivnosti etarskih ulja rizoma i korena.

Tabela 38. Odabrani ekstrakti i etarska ulja za testiranje bioloških efekata

	Maksimalne vrednosti			Minimalne vrednosti			Razlika (Max- Min) [mg/g]
	Vrednost [mg/g]	Poreklo	Oznaka	Vrednost [mg/g]	Poreklo	Oznaka	
DHHT	14.66	PMV1	SL max	3.31	JMG3	SL min	11.35
Σ(P1+F1+F2)	28.54	POG3	F max	9.54	JOV3	F min	19.01
	[%m/m]			[%m/m]			[%m/m]
Rizom ΣAU	88.17	JMG	AU max	78.06	JOV	AU min	10.11
Koren ΣAU	85.30	PKG	AU max	72.72	JOV	AU min	12.59

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Testirani ekstrakti sa maksimalnim i minimalnim sadržajem fenolnih jedinjenja i seskviterpenskih laktona, iskazali su antioksidativnu aktivnost sa vrednošću IC₅₀ od 0,18 mg/g (**F max**) i 0,21 mg/g (**F min**), dok su osnovni rastvori dobijeni u ekstrakciji seskviterpenskih laktona pokazali procenat inhibicije od 99,4% (**SL max**) i 52,7% (**SL min**).

Antimikrobna aktivnost

U Tabeli 39 prikazane su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) odabranih ekstraktata cvetnih glavica arnike.

Tabela 39. Antimikrobna aktivnost ekstrakata cvetnih glavica arnike

Mikroorganizmi	Gram +/-	SL	SL	F	F
		max μl/ml	min μl/ml	max μl/ml	min μl/ml
<i>Escherichia coli</i>	-	5	5	5	5
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	5	12	5	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	10	15	3	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	12	13	7	10
<i>Proteus mirabilis</i>	-	5	13	5	12
<i>Bacillus subtilis</i>	+	8	12	12	10
<i>Micrococcus luteus</i>	+	12	15	12	6
<i>Micrococcus flavus</i>	+	12	15	10	7
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	7	15	2	8
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	6	15	4	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	7	12	6	8
<i>Candida albicans</i>	Kvasac	6	8	4	8

Testirani ekstrakti ispoljili su takođe umerenu antimikrobnu aktivnost gde su se minimalne vrednosti za inhibiciju rasta devet sojeva bakterija i jednog kvasca kretale od 2 – 15 μl/ml. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja je bila selektivna, gde su MIC vrednosti za određene mikroorganizme (*E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *M. flavus*, *L. monocytogenes* i *S. enteritidis*) bile izuzetno male (5 μl/ml), dok je kvasac *Candida albicans* bio visoko rezistentan na sva testirana etarska ulja (MIC koncentracija kretala se i do 83 μl/ml).

Od testiranih ekstrakata najslabiju aktivnost ispoljio je ekstrakt SL min jer je bila potrebna najveća koncentracija za potpunu inhibiciju rasta bakterija i kvasca. Najveći broj bakterija je bio inhibiran koncentracijom od 15 μl, a to znači da su bakterije ispoljile sličnu osetljivost na pomenuti ekstrakt, izuzev *E. coli*, čiji je rast bio potpuno inhibiran koncentracijom od 5 μl/ml. Takođe je i kvasac *Candida albicans* ispoljio veću osetljivost na ekstrakt (MIC je 8 μl).

Najveći antimikrobni potencijal ispoljio je ekstrakt F max jer su se minimalne inhibitorne koncentracije kretale od 2 do 12 μl/ml, u zavisnosti od testiranog

mikroorganizma. Rast najvećeg broja bakterija bio je inhibiran koncentracijama ispod 10 µl/ml. Najniža potrebna koncentracija od 2 µl bila je neophodna za inhibiciju rasta Gram pozitivne bakterije *L. monocytogenes*. Nešto većom koncentracijom od 3 µl inhibiran je rast *S. aureus*. Koncentracija od 4 µl je bila MIC za *S. enteritidis* i *C. albicans*. Koncentracija od 5 µl je bila baktericidna za sledeće Gram negativne bakterije *E. coli*, *S. typhimurium* i *P. mirabilis*. Najveću rezistentnost na ekstrakt F max ispoljile su *Micrococcus*-i i *B. subtilis* sa MIC od 10 odnosno 12 µl/ml.

Izvesne sličnosti u antimikrobnoj aktivnosti ispoljio je i ekstrakt SL max na koji su takođe najveću otpornost ispoljile pomenute Gram pozitivne bakterije (*Micrococcus*-i *Bacillus*). Takođe je koncentracija od 5 µl bila MIC za *E. coli*, *S. typhi*, *P. mirabilis*, kao i kod ekstrakta F max. Ono što se može uočiti iz Tabele 36. je da odstupaju MIC vrednosti za *Listeria monocytogenes* koja je ispoljila veću otpornost na ekstrakt SL max (MIC je 7 µl/ml) u odnosu na ekstrakt F max (2 µl/ml). Takođe, veću rezistentnost na SL max ekstrakt ispoljile su *S. aureus* i *P. aeruginosa*, za čiju je potpunu inhibiciju rasta bilo potrebno 10 odnosno 12 µl/ml ekstrakta. Testirane bakterije su ispoljile ujednačenu osetljivost na ekstrakt F min jer je većina njih bila inhibirana koncentracijama od 8 do 10 µl/ml. Izuzetak su bile bakterije *E. coli* (MIC = 5 µl) i *M. luteus* (MIC = 6 µl) koje su ispoljile veću osetljivost.

U Tabeli 40 prikazana je antimikrobna aktivnost (MIC) etraskih ulja podzemnih organa arnike.

Tabela 40. Antimikrobna aktivnost etraskih ulja podzemnih organa arnike

Mikroorganizmi	Gram +/-	AU	AU	AU	AU
		min rizom ml/ml	min koren ml/ml	max rizom ml/ml	max koren ml/ml
<i>Escherichia coli</i>	-	33.3	38.8	5	5
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	44.4	38.8	5	5
<i>Salmonella enteritidis</i>		38.8	44.4	16.6	33.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	27.7	38.8	5	11.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	27.7	38.8	5	11.1
<i>Proteus mirabilis</i>	-	27.7	55.5	11.1	27.7
<i>Bacillus subtilis</i>	+	38.8	33.3	11.1	11.1
<i>Micrococcus luteus</i>	+	33.3	27.7	16.6	11.1
<i>Micrococcus flavus</i>	+	44.4	33.3	11.1	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	55.5	33.3	5	5
<i>Candida albicans</i>	Kvasac	66.6	83.3	83.3	55.5

Najveću aktivnost su ispoljili AU max (rizom) i AU max (koren) u zavisnosti od testirane bakterije. MIC su se kretale od 5 – 33 µl/ml za bakterije kada je u pitanju AU max-rizom, a kada je u pitanju antimikrobna aktivnost AU max-koren MIC su se kretale od 5 – 27 µl/ml. Etraska ulja AU min-rizom i AU min-koren su prema dobijenim rezultatima imala uglavnom ujednačeni efekat na testirane bakterije uz pojedina odstupanja sa ispoljenom znatno slabijom antimikrobnom aktivnošću u odnosu na AU max etraska ulja korena i rizoma. Minimalne inhibitorne koncentracije su se za AU min-rizom, kao i za AU min-koren, kretale od 27,7 do 55,5 µl/ml. Ono što se može uočiti je da je kvasac *Candida albicans* visoko rezistentan na sva testirana etraska ulja. MIC koncentracija za *C. albicans* kretala se i do 83 µl/ml.

7. DISKUSIJA

Stanje ogleda i broj preživelih biljaka

Proizvodnja rasada iz semena i vegetativnim putem je bila prilično jednostavna i u velikoj meri uspešna, iako neki literaturni podaci ukazuju na probleme u imitiranju prirodnih uslova za razvoj klijanca (Kalynyak *et al.*, 1995; Petrova *et al.*, 2012). Iz prethodnih istraživanja plantažnog gajenja arnike primećeno je da biljke provode čitavu jednu vegetaciju u fazi rozete (Bomme *et al.*, 1995; Galambosi, 1999; Radanovic *et al.*, 2007), a da tek u narednoj vegetaciji razvijaju generativne organe. Iz vremenskog prikaza osnovnih faza razvića (Slika 22) može se videti da su u 2009. godini u fazu romiranja cvetnih izdanaka prešle samo biljke iz prolećnog plota sadnje. Na postavljenom ogledu očekivalo se da sve biljke iz prolećne sadnje 2008. godine cvetaju tek u 2009. godini, međutim neposredno nakon sadnje prolećnog dela ogleda (19 dana) došlo je do cvetanja varijanti zasnovanih iz vegetativnih sadnica (Slika 23). Ova pojava, koja je zahvatila preko 60 % varijante, uticala je na slabiji prijem ovih sadnica što je dovelo do desetkovanja broja biljaka (76 % uginulih) u prvoj posmatranoj godini (2009) (Grafik 2). Loši početni uslovi imali su za posledicu slabiji razvoj preživelih biljaka na toj varijanti, što se kasnije odrazilo na većinu praćenih parametara na ogledu. Uzrok ovoj pojavi je uznapredovala generativna faza na matičnim biljkama sa kojih su deljenjem bokora proizvedene vegetativne sadnice što je dokumentovano u maju naredne godine (Slika 24). Pretpostavka je da su biljke fiziološki reagovala ka produženju vrste u smislu formiranja cveta i semena, trošeći pri tom celokupan energetski potencijal na nadzemni deo, što je uslovalo lošiji razvoj korenovog sistema i uginuće velikog broja biljaka. Kod varijanti zasnovanih iz sadnica proizvedenih iz semena (u nastavku – generativnih sadnica) u prolećnoj sadnji nije došlo do pojave ranog cvetavanja, tako da je prijem sadnica ove varijante u odnosu na vegetativnu varijantu bio znatno bolji (prosečno 12% uginulih) u prvoj posmatranoj godini. U narednoj godini (2010) broj preživelih biljaka se dodatno smanjivao (Grafik 3), ali je procentualni bilans uginulih biljaka vegetativnih varijanti na prolećnom delu ogleda bio blizak nivou uginulih biljaka generativnih varijanti (Tabela 12). Biljke posađene na jesen 2008. godine su formirale generativne organe tek u 2010. godini. Može se reći da

su biljke iz prolećnog dela oglada imale 2008. godinu kao prvu vegetaciju provedenu u fazi rozete, dok su biljke iz jesenjeg dela oglada kraj 2008. godine prihvatile kao pripremu za zimu, a 2009. godinu kao svoju prvu vegetaciju. Jesenji deo oglada je takođe pretrpeo gubitke što je najverovatnije posledica lošeg prezimljavanja. Gubici na jesenjem delu oglada su bili ujednačeni na obe varijante sadnog materijala. U ovom slučaju vegetativne sadnice su sađene van generativne faze, nisu trošile rezerve energije na razvoj nadzemnog dela, tako da su razvile jednako dobar korenov sistem kao i sadnice proizvedene iz semena (Prilog 4A).

Prethodna istraživanja na polju razmnožavanja arnike takođe su obuhvatila proučavanje vegetativne propagacije. Kating i Seidel (1967) preporučuju vegetativno razmnožavanje *A. montana* reznicama rizoma posebno ožiljenim u zaštićenom prostoru kao prevazileženje neuspeha njihovih prethodnika. Oni ne navode problem ranog iscvetavanja, ali su im sadnice pristigle na sadnju u polju nakon fotoperioda za prelazak u generativnu fazu razvića (23. VI). Prijem sadnica u takvim uslovima bio je oko 75%. Evstatieva i saradnici (2012) su deobom rozete postavili mikro ogled na Rodopskim planinama (1500 m). Iako je sadnja bila prolećna (maj), autori nisu prijavili pojavu nakon ranog cvetanja (odmah nakon sadnje), ali im je prijem sadnica bio umanjnjen za 27%.

Klonska propagacija je ekonomičniji metod dobijanja sadnica utoliko što ne traži grejani prostor (prolećna proizvodnja sadnica iz semena za prolećnu sadnju), ni zasenu sa svakodnevnim zalivanjem i negom (letnja proizvodnja sadnica iz semena za jesenju sadnju). Što se prijema sadnica arnike tiče, na ovom nivou se može zaključiti da se vegetativna propagacija u prolećnom roku sadnje, zbog velikog procenta propadanja biljaka, ne može preporučiti kao model zasnivanja plantaže, a da su ostali primenjeni modeli podjednako dobri.

7.1. Morfološki parametri

Prečnik rozete

Dijametar rozete arnike na ogledu se u 2009. godini kretao od 12.4 – 23.4 cm (Grafik 4), dok se u 2010. godini kretao od 14.47 – 28.15 cm (Grafik 5). Prikupljeni

podaci su u skladu sa većinom literaturnih podataka. Seidel i Kating (1967) su merili prečnike rozeta na dva lokaliteta u drugoj vegetaciji prolećno posađenih biljaka, gde su se vrednosti kretale od 14.7 – 34 cm. Smallfield i Douglas (2008) procenjuju da biljke u dobrim agroekološkim uslovima mogu razviti rozete prečnika 25 – 30 cm. Galambosi i saradnici (1998) navode vrednosti prečnika rozete 13, 15, 22 i 37 cm, u prvoj, drugoj, trećoj i četvrtoj godini gajenja, respektivno. Seeber i sar. (1997) su poredili prečnike rozeta biljaka na prirodnim staništima i iz kultivacije gde su samonikle biljke imale prečnik oko 10 cm (max. 18 cm), a gajene biljke oko 15,3 cm (max. 25 cm). Bezzi i Ghidini (1988) prijavljuju prečnike rozeta od 7.1 – 14.8 cm. Takođe su Balabanova i Vitkova (2010) izmerile prečnike rozeta od 16.3 – 25.6 cm na biljkama starim 10 meseci.

Na variranje prečnika rozete u 2009. godini statistički značajno su uticala oba indukovana faktora (vrsta sadnica i vrsta đubrenja) (Tabela 23), ali je statistički značajna interakcija faktora prikrila izolovano dejstvo faktora vrste đubrenja na celom ogledu ($p=0.15$) (Grafik 6). Posmatrano po razdvojenim varijantama vrsta razmnožavanja, faktor vrste đubrenja je imao statistički značajan uticaj na dijametar rozete generativno razmnoženih biljaka, dok na variranje ovog svojstva kod biljaka iz vegetativne propagacije nije imao uticaj (Grafik 4). U narednoj godini (2010) takođe su svi indukovani faktori ispoljili statistički značajan uticaj na variranje prečnika rozete arnike. I u ovoj godini, kao i u prethodnoj, izolovani uticaj đubrenja nije bio statistički značajan ($p=0.20$) (Grafik 6). Ovo je s jedne strane posledica zaostale interakcije faktora vrste đubrenja i vrste sadnica iz prethodne godine, a s druge strane loše reakcije biljaka iz jesenjg plotu sadnje na uneto hranivo u zemljište (Grafik 5). U ovoj godini je u pogledu posmatranog parametra statistički bila značajna iterakcija između faktora vremena sadnje i vrsta sadnica, kao i između vremena sadnje i vrste đubrenja (Tabela 23). Biljke su u drugoj godini formirale očekivano statistički značajno veće prečnike rozeta (Grafik 7A). Izolovano dejstvo faktora vremena sadnje je statistički značajno uticalo na variranje ovog svojstva, gde su biljke sa jesenjg plotu sadnje formirale veće prečnike rozeta (Grafik 7B). Ovaj fenomen je umnogome posledica niskih vrednosti prečnika rozeta veretativno razmnoženih biljaka na prolećnom plotu sadnje koje su uticale na srednju vrednost ovog parametra na celom plotu. Posmatranjem izolovanih uticaja faktora vrste sadnica, u dve godine na dva plotu sadnje, možemo zaključiti da je

ovaj faktor u obe godine bio statistički značajan samo na prolećnom plotu sadnje, dok na jesenjem plotu nije bio statistički značajan (Grafik 8). Uzrok ovakvom rasporedu značajnosti faktora vrste sadnica na posmatranom parametru prečnika rozeta je lošiji prijem sadnica vegetativno razmnoženih biljaka na prolećnom plotu sadnje.

Variranje prečnika rozete je u obe godine bilo u jakoj pozitivnoj korelacionoj vezi sa visinom cvetnog izdanka (Grafik 14), što je dodatno potvrđeno faktorskom analizom gde ova dva svojstva dele zajedničku varijansu sa ostalim komponentama prinosa (Grafici 89 i 91).

Visina cvetnog izdanka

Dobijene vrednosti visina cvetnih izdanaka arnike u 2009. i 2010 godini od 19.7 – 34.2 cm i od 25.6 – 41.7 cm, respektivno (Grafici 9 i 10) su delimično u saglasnosti sa literaturnim podacima. Naime, literaturni podaci o visini cvetnog izdanka su veoma varijabilni i kreću se u vrednostima od 20 – 60 cm. Jedna grupa autora upravo ovaj opseg navodi kao eksperimentalne vrednosti merenja (Munoz, 1987; HagerROM, 2002; Smallfield i Douglas, 2008), dok se kod druge grupe autora ove vrednosti kreću do 40 cm (Seeber *et al.*, 1997; Dachler i Pelzmann, 1999; Radanović *et al.*, 2007; Heeger, 1956).

Od posmatranih uticaja faktora u 2009. godini statistički značajnim su se pokazali i faktor vrste sadnica i faktor vrste đubrenja, ali i njihova međusobna interakcija (Tabela 23). Tako izolovani faktor vrste đubriva, u ovoj godini, iako statistički značajan u dvo-faktorskoj analizi varijanse, nije značajno uticao na variranje visine cvetnog izdanka na celom ogledu ($p=0.36$) (Grafik 11). Ovakva nedoslednost je posledica statistički značajnog uticaja interakcije između faktora faktora ($p=0.03$), gde su lošije razvijene biljke iz vegetativne propagacije na prolećnom plotu sadnje, koje nisu reagovala na uneto hranivo u zemljište, uticale na ukupnu varijansu, onemogućujući pri tom statitičko razlikovanje aritmetičkih sredina osnovnih skupova đubrenih varijanti iz generativne propagacije, koje su u izdvojenom posmatranju reagovala na uneta hraniva (Grafik 9). U 2010. godini svi indukovani faktori na ogledu gajenja arnike su statistički značajno uticali na variranje vrednosti visine cvetnog izdanka, ali i interakcija faktora vreme zasnivanja i vrste sadnica (Tabela 23). U ovoj

godini izolovani uticaj đubrenja je imao statistički značajan uticaj na visinu cvetnog izdanka (Grafik 11). To se takođe moglo zaključiti i sa Grafika 10, gde su sve varijante sadnica u oba plotu sadnje pokazale statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina osnovnih skupova đubrenih varijanti u odnosu na kontrolu. Biljke arnike su na prolećnom plotu sadnje u trećoj vegetaciji (2010) formirale očekivano statistički značajno više cvetne izdanke nego u drugoj vegetaciji (Grafik 12A). Izolovano dejstvo faktora vremena sadnje je statistički značajno uticalo na variranje visine cvetnog izdanka, u 2010. godini, gde su biljke sa jesenjm plotu sadnje formirale više izdanke (Grafik 12B). Uticaj faktora vrste sadnica posmatran zasebno je kao i kod parametra prečnika rozete bio statistički značajan u obe posmatrane godine samo na prolećnom plotu sadnje, dok između aritmetičkih sredina osnovnih skupova generativno i vegetativno razmnoženih biljaka na jesenjm plotu sadnje nije bilo statistički značajnih razlika (Grafik 13).

Ovaj parametar je, kao što je rečeno, u obe posmatrane godine ostvario statistički veoma značajne pozitivne korelacione veze sa prečnikom rozete, a zajedno su u faktorskoj analizi, po faktorskim opterećenjima, svrstani u grupu komponenti prinosa cvetne glavice (Grafik 89 i 91).

Broj cvetnih izdanaka

Broj cvetnih izdanaka se na plantaži arnike kretao od 1,5 – 10,5 u 2009. godini (Grafik 15) i od 2,4 – 12,6 u 2010. godini (Grafik 16). Ovakav raspon vrednosti broja cvetnih izdanaka je u skladu sa prethodno publikovanim podacima na gajenim biljkama *A. montana*, koji se razlikuju u odnosu na godinu posmatranja. Po većini autora, u drugoj godini gajenja, biljka razvija od 0.6 – 5 cvetnih izdanaka, dok se taj broj u traćoj vegetaciji povećava na 5 – 35 cvetnih izdanaka po biljci (Bezzi i Ghidini, 1988; Seeber *et al.*, 1997; Galambosi, 2004; Radanović *et al.*, 2007; Galambosi, 2000; Evstatieva *et al.*, 2012).

U 2009. ispoljen je značajan uticaj oba indukovana faktora (vrsta sadnica i vrsta đubrenja) na vrednosti merenog parametra (Tabela 23). Interakcija između faktora u ovoj godini nije bila statistički značajna, ali je verovatnoća prihvatanja nulte hipoteze bila veoma mala ($p=0.052$), tako možemo reći da iako nije postojala statistička

značajnost u interakciji faktora vrsta sadnica i vrsta đubrenja, prihvatanje alternativne hipoteze je podržano u preko 94% slučajeva. Ovom interakcijom se može objasniti zašto faktor đubrenja izolovano posmatrano nije imao statistički značajan uticaj na broj cvetnih izdanaka u ovoj godini ($p=0,24$) (Grafik 17). Na poljskom ogledu ova informacija praktično znači da je statistički značajan uticaj đubrenja na varijantama generativnog razmnožavanja, u ukupnoj varijansi, potisnut lošom reakcijom na đubrenje vegetativno razmnoženih varijanti (Grafik 15). Dakle vrsta sadnica je značajno uticala na reakciju biljaka na uneto hranivo. U narednoj godini (2010), uticaji svih indukovanih faktora na posmatrano svojstvo su bili statistički značajni (Tabela 23). Interakcija između faktora vreme sadnje i vrsta sadnica je takođe bila statistički veoma značajna, ali i interakcija između svih faktora nije bila zanemarljiva ($p=0,082$). To znači da su biljke u preko 91% slučajeva varirale u broju cvetnih izdanaka zavisno od zajedničke varijanse ova tri faktora. Ovom poslednjom interakcijom se može objasniti slab doprinos faktora vrste đubrenja u pogledu vrednosti broja cvetnih izdanaka u 2010. godini ($p=0,25$) (Grafik 17). Jednofaktorska analiza varijanse za ovo svojstvo u 2010. godini rasvetjava koje su varijante pozitivno reagovala na uneto hranivo, a koje nisu (Grafik 16). Iz prikazanih variranja vrednosti broja cvetnih izdanaka se može videti dobra reakcija biljaka sa đubrenih blokova generativno razmnoženih varijanti na prolećnom plotu sadnje u odnosu na biljke iz vegetativne propagacije na istim blokovima, a takođe i izostanak reakcije đubrenih plotova generativno razmnoženih varijanti jesenjeg plotu sadnje. Biljke arnike su na prolećnom plotu sadnje u trećoj vegetaciji formirale očekivano statistički značajno više cvetnih izdanaka nego u drugoj vegetaciji (Grafik 18A). Uticaj faktora vremena zasnivanja je bio značajan u pogledu variranja vrednosti ovog parametra (Grafik 18A). Uticaj vrsta sadnica je bio, kako i kod prethodna dva proučavana svojstva, statistički značajan samo na prolećnom plotu sadnje, gde su generativno razmnožene biljke formirale veći broj cvetnih izdanaka od vegetativno razmnoženih biljaka (Grafik 19). U obe posmatrane godine, broj cvetnih izdanaka je bio u statistički značajnim jakim korelacionim odnosima sa prečnikom rozete i visinom cvetnog izdanka (Grafici 20 i 21). Jačina veze sa prečnikom rozete ocenjena je korelacionim korefijentom $r=0.91$, u 2009. godini, odnosno $r=0.88$ u 2010. godini. Takođe su značajni i korelacioni koeficijenti veze broja cvetnih izdanaka i visine

cvetnog izdanka, koji su uzimali vrednosti $r=0.79$, u 2009. godini, odnosno $r=81$, u 2010. godini.

Na ovom nivou se može zaključiti da su bolje razvijene biljke arnike bile superiorne u odnosu na lošije razvijene po sva tri do sada obrađena svojstva. Visoki korelacioni koeficijenti ukazuju na to da su biljke sa većim brojem cvetnih izdanaka u isto vreme imale i veće prečnike rozeta i više cvetne izdanke. Faktorska analiza je u obe posmatrane godine po faktorskim opterećenjima broj cvetnih izdanaka grupisala zajedno sa prinosom cvetnih glavica i ostalim parametrima koji utiču na ovaj prinos (Grafici 89 i 91).

Broj cvetnih glavica po biljci

U drugoj vegetaciji arnike (2009) broj cvetnih glavica po biljci se kretao od 1,2 – 10,5 (Grafik 23), dok su se vrednosti ovog svojstva u trećoj vegetaciji kretale od 8,4 – 38,9. Naši rezultati u pogledu vrednosti ovog parametra u potpunosti odgovaraju literaturnim podacima. Najsličniji su vrednostima biljaka gajenim na Rodopima koje su u drugoj vegetaciji imale od 1 - 4, a u trećoj vegetaciji od 25 – 38 cvetnih glavica po biljci (Evstatieva *et al.*, 2012). Galambosi (2004) je prijavio slične rezultate u drugoj i trećoj godini, prosečno 5, odnosno 28, cvetnih glavica, respektivno. Biljke gajene na malč folijama su, u našim ekološkim uslovima, dale u drugoj vegetaciji od 2.7 – 5.5 cvetnih glavica po biljci (Radanović *et al.*, 2007), dok su biljke gajene na četiri lokaliteta u Italiji dale od 0.9 – 6.1 cvetnih glavica po biljci (Bezzi i Ghidini, 1988). Bomme (1999) navodi da selektovana sorta ‘ARBO’ može u četvrtoj vegetaciji da dostigne u proseku oko 90 cvetnih glavica po biljci. Sličan nalaz je prijavio Galambosi (2000) na lokalnoj finskoj polulaciji *A. montana* gde je izbrojao u četvrtoj godini cvetanja (peta vegetacija) maksimalnih 98 cvetnih glavica po biljci.

Iz podataka prezentovanih na Graficima 22 i 23, kao i iz Tabela 13 i 14, može se zaključiti da berba cvetnih glavica arnike, u agroekološkim uslovima planinskog regiona zapadne Srbije, traje oko 25 dana i da po terminu za početak berbe pristiže oko 20. maja.

Na ovo svojstvo, u obe posmatrane godine, statistički značajno su uticali svi indukovani faktori na ogledu (Tabela 23). U 2009. godini se pored uticaja faktora vrsta

sadnica i vrsta đubriva, statistički značajnom pokazala i njihova interakcija. Ova interakcija, koja se prenela i u narednu godinu (2010) usloвила je, kao i u slučaju prethodno proučavanih svojstava, maskiranje statističke značajnosti uticaja faktora vrste đubriva na celom ogledu (Grafik 26), gde je prihvatanje nulte hipoteze ocenjeno sa verovatnoćom $p=0.17$, u 2009. godini, odnosno sa $p=0.18$, u 2010. godini. U prilog ovome idu statističke značajnosti đubrenih blokova u odnosu na kontrolni blokove na izolovanim varijantama vrste sadnica u oba plotu sadnje (Grafici 23 i 25). Prosečan broj cvetnih glavica po biljci u trećoj vegetaciji je očekivano bio statistički značajno veći od broja cvetnih glavica po biljci u drugoj vegetaciji (Grafik 27A). Uticaj faktora vremena zasnivanja na variranje broja cvetnih glavica po biljci je u 2010. godini bio statistički veoma značajan. Uticaj faktora vrste sadnica an vatiranje broja cvetnih glavica po biljci je bio, kao i kod prethodno proučavanih morfoloških osobina, statistički značajan samo na prolećnom plotu sadnje (Grafik 28). Ovo je posledica prethodno pomenute pojave ranog cvetanja vegetativno razmnoženih varijanti i lošijeg prijema ovih sadnica. Na jesenje plotu sadnje između aritmetičkih sredina osnovnih skupova varijanti generativnog i vegetativnog razmnožavanja nije bilo statistički značajnih razlika.

Posmatrana osobina (broj cvetnih glavica po biljci) je usko vezana sa prečnikom rozete, visinom cvetnog izdanka i brojem cvetnih izdanaka, gde su jačine veza ocenjene korelacionim koeficijentima u 2009. godini $r=0.91$ (odnosno $r=0.71$, u 2010. godini), $r=0.85$ ($r=0.73$) i $r=0.96$ ($r=0.71$), respektivno. Takođe u faktorskoj analizi, ova osobina je, u obe posmatrane godine, usko korelisana sa Faktorom 1 koji grupiše promenljive koje dele zajedničku varijansu sa prinosom cvetne glavice (Grafici 89 i 91).

Prečnik cvetne glavice

Vrednosti prečnika cvetne glavice na ogledu arnike u 2009. godini su se kretale od 5,9 – 7,5 cm (Grafik 32), dok su se u 2010. godini iste vrednosti kretale od 6,4 – 9,1 cm (Grafik 33). Literaturni podaci koji opisuju ovaj parametar potvrđuju naše nalaze i vrednosti se uglavnom kreću od 4 – 8 cm. Tako Smallfield i Douglas (2008) navode upravo ovaj raspon, dok Munoz (1987) prijavljuje znatno užu raspon od 7 – 8 cm. Ostali autori potvrđuju da se kod merenja prečnika cvetne glavice biljke *A. montana* mogu

očekivati vrednosti od 6 – 8 cm (Heeger, 1956; HagerROM, 2002; Evstatieva *et al.*, 2012).

Na variranje vrednosti ovog parametra je u drugoj vegetaciji (2009) uticao samo faktor vrste sadnica, dok uticaj faktora vrste đubriva nije bio statistički značajan (Tabela 23). U trećoj vegetaciji (2010) indukovani faktori vreme sadnje i vrsta đubrenja na su statistički značajno uticali na variranje izmerenih vrednosti prečnika cvetne glavice. Takođe je, u ovoj godini, i interakcija faktora vremena sadnje i vrste sadnica bila statistički značajna. Uticaj đubrenja na variranje ovog svojstva nije bio statistički značajan, ni u jednoj od posmatranih godina, ali je prihvatanje nulte hipoteze, u 2010. godini, bilo ocenjeno verovatnoćom od 8,2%. Što zapravo znači da su se aritmetičke sredine osnovnih skupova vrednosti prečnika cvetnih glavica đubrenih blokova, razlikovale od kontrolnih blokova u 91,8% slučajeva, što se nije pokazalo kao statistički značajno, ali nije ni zanemarljivo mali procenat slučajeva. I kod ovog parametra očekivano su se, kao i kod prethodno posmatranih morfoloških osobina, statistički značajno razlikovale aritmetičke sredine osnovnih skupova vrednosti prečnika rozete u drugoj i trećoj vegetaciji (Grafik 35A). Takođe je i faktor vremena sadnje značajno je uticao na variranje vrednosti ovog svojstva (Grafik 35B), gde su biljke iz jesenje sadnje formirale veće cvetne glavice u poređenju sa biljkama iz proćnog plotu sadnje. Faktor vrste sadnica se u rezultatima trofaktorske analize varijanse, za treću vegetaciju (2010) nije pokazao kao statistički značajan, ali je u isto vreme statistički veoma značajna bila interakcija ovog faktora sa faktorom vremena sadnje (Tabela 23). Ova interakcija je uticala na neispoljavanje statističke značajnosti faktora vrste sadnica, kako se u izolovanim t-testovima pokazalo (Grafik 36), gde su na proćnom plotu sadnje veće prečnike cvetnih glavica formirale biljke iz vegetativne propagacije, a na jesenjem plotu obrnuto, iz generativne propagacije (Prilog 4 E i F). Ova nedoslednost je uticala na neispoljavanje statističke značajnosti kakva je pokazana u t-testovima.

Prečnik cvetne glavice je u prvoj godini ostvario statistički značajne negativno korelisane veze sa prečnikom rozete, visinom cvetnog izdanka i brojem cvetnih glavica po biljci, koje su ocenjene korelacionim koeficijentima $r=-0.55$, $r=-0.62$ i $r=-0.53$ (Tabela 15), respektivno, ali se ti odnosi nisu ponovili u narednoj godini, tako da se gubi sledljivost pretpostavke da su prečnici cvetnih glavica arnike obrnuto srazmerni vrednostima komponenata prinosa. Faktorskom analizom je pokazano da se ova osobina

po faktorskom opterećenju, u 2009. godini, ne koreliše značajno ni sa jednim ekstrahovanim faktorom, dok se u 2010. godini značajno negativno koreliše sa Faktorom 4 (ostale osobine) sa kojim se značajno pozitivno koreliše faktorsko opterećenje broja sekundarnih rozeta (Grafici 89 i 91). Za ovu ovu osobinu se na ovom nivou istraživanja ne može izvesti jasan zaključak čime je fiziološki uslovljena ni kakva je njena uloga u formiranju prinosa.

Broj sekundarnih rozeta

Vrednosti broja sekundarnih rozeta arnike su u 2009. godini varirale između 5,7 – 18,3 (Grafik 37), dok se u 2010. godini kretao od 25,3 – 35,0 (Grafik 38). Literaturnih podataka o broju formiranih sekundarnih rozeta ima veoma malo, što je i razumljivo obzirom na činjenicu da je za ispravno brojanje u drugoj i trećoj vegetaciji neophodno izvaditi, oprati biljku i pažljivo razdvajati formirane rozete. Tako su samo Evstatieva i saradnici (2012) prijavili da su na kraju treće vegetacije uspjeli da prikupe 4160 rozeta sa 20 m². To u proračunu daje oko 52 sekundarne rozete po biljci što je u proseku znatno više od broja sekundarnih rozeta na biljkama u našem ogledu na kraju treće vegetacije (od 25.3 – 35.0) (Grafik 38).

Na variranje ovog parametra u 2009. godini uticao je samo faktor vremena zasnivanja (Grafik 41A). To praktično znači da je broj sekundarnih rozeta u trećoj vegetaciji dostigao nivo broja rozeta prolećnog plota sadnje. Odavde se može zaključiti da variranje ovog parametra utiče na parametre koji su vezani za prinos samo u početnim fazama razvića, ali kada se biljka stabilizuje (u našem slučaju u trećoj vegetaciji) broj sekundarnih rozeta se ujednači na svim varijantama, pa između varijanti prestaju da postoje statistički značajne razlike. Razlog za pojavu ove asimetrije najverovatnije leži u post-žetvenoj biologiji biljke koja se ogleda u formiranju novih rozeta. Nakon branja cveta cvetna stabljika se suši, a biljka usmerava svu prikupljenu energiju na formiranje novih rozeta. Iz tog razloga su biljke posađene na proleće, koje su cvetale u 2009. godini, formirale veći broj sekundarnih rozeta na kraju te godine. U narednoj godini su sve biljke na ogledu cvetale i sve su nakon branja cveta pristupile formiranju novih rozeta. Optimalan broj rozeta je najverovatnije uslovljen gustom sadnje biljaka, tako da su biljke koje su sađene na proleće i one koje su sađene na jesen

u trećoj vegetaciji dostigle svoj optimum gustine i tako se izjednačile po broju sekundarnih rozeta (Grafik 38). U trećoj vegetaciji (2010), ni jedan od indukovanih faktora na ogledu nije statistički značajno uticao na variranje vrednosti ove osobine, ali se statistički veoma značajnom pokazala interakcija između faktora vremena sadnje i vrste sadnica (Tabela 23). Ova interakcija je očekivana i prisutna kod svih proučavanih nadzemnih parametara arnike, upravo zbog lošijeg razvića biljaka iz vegetativne propagacije na prolećnom plotu sadnje. Biljke arnike su u 2010. godini formirale, na oba plotu sadnje, očekivano statistički značajno veći broj sekundarnih rozeta nego u 2009. godini (Grafik 40 A i B). Uticaj vrste sadnica na broj sekundarnih rozeta na jesenjm plotu sadnje u obe posmatrane godine nije bio statistički značajan (Grafik 42). Od odnosa sa drugim morfološkim osobinama broj sekundarnih rozeta, u 2009. godini, ostvaruje značajne pozitivne korelacione veze sa većinom prethodno proučavanih parametara, osim sa prečnikom cvetne glavice sa kojim gradi negativno korelisan odnos (Grafik 43 i Tabela 16). Međutim te značajne veze u narednoj godini (2010) slabe, tako da se na ovom nivou israživanja ne može izvesti pouzdan zaključak o pravilnosti uzajamnih odnosa broja sekundarnih rozeta i ostalih merenih osobina na ogledu. Faktorkom analizom, u 2009. godini, ovaj parametar po svom faktorskom opterećenju nije bio značajno korelisan ni sa jednim od ekstrahovanih faktora, dok se u 2010. godini grupisao u elemente Faktora 4 – odnosno ostale osobine.

7.2. Prinosi

Prinos cvetnih glavica

Prinos cvetnih glavica na ogledu gajenja arnike u 2009. godini se kretao od 5.2 – 143.6 kg/ha (Grafik 45), dok se u 2010. godini kretao od od 3,7 – 258,7 kg/ha (Grafik 47). Dobijeni prinosi su, u svojim maksimalnim vrednostima, u skladu sa ranije publikovanim rezultatima i najslabiji su nalazima iz Italije (Bezzi i Ghidini, 1988), dok su znatno niži od prinosa postignutih u Nemačkoj (Bomme i Daniel, 1994). Pregled literaturnih podataka o visinama prinosa u dosadašim istraživanjima dat je u Tabeli 41.

Tabela 41. Literaturni podaci o visinama prinosa suve cvetne glavice *A. montana*

Zemlja istraživanja	Prinos kg/ha	Izvor
Italija	94 - 284	Bezzi i Ghidini, 1988
Nemačka	1330*	Bomme i Daniel, 1994
Finska	110 - 530	Galambosi, 2004
Novi Zeland	223 - 570	Douglas <i>et al.</i> , 2004
Novi Zeland	200 - 700	Smallfield i Douglas, 2008
Nemačka	570 - 1140	Bomme <i>et al.</i> , 1995
Nemačka	150 - 1100	Bomme, 1999
Španija	600 - 750	Munoz, 1987
Nemačka	500 - 1000	Marquard i Kroth, 2001
Nemačka	500 - 1000	Dachler i Pelzmann, 1999
Nemačka	500 - 1000	Heeger, 1956
Srbija	30 - 340	Radanović <i>et al.</i> , 2007
Bugarska	310 - 470	Evstatieva <i>et al.</i> , 2012
Austrija	570 - 1100	Seeber <i>et al.</i> , 1997

* posebno selektovane biljke

Veliko variranje prinosa cveta *A. montana* u literaturi, kakvo je prikazano u Tabeli 41, je posledica više faktora, ali je najverovatnije najznačajniji uticaj staništa. Prirodno stanište arnike su visokoplaninske livade i verovatno je da uticaj visokih temperatura negativno utiče na razviće biljaka, pri čemu se smanjuje prinos. Variranja prijavljene visine prinosa unutar istog istraživanja je u većini slučajeva posledica nejednakog doprinosa prve i druge godine cvetanja (druga i teća vegetacija), gde autori najčešće izdvajaju drugu godinu kao prinosniju. Ovo je opet posledica formiranja većeg broja organa, u drugoj godini cvetanja, koji posredno učestvuju u prinosu cvetne glavice. Najveći prinosi su prijavljeni u Nemačkoj, dok su najniži u Srbiji i Italiji. Prethodna istraživanja na kultivaciji arnike u našem klimatu na planini Tara (Radanović *et al.*, 2007), dala su slične rezultate kao što su nalazi u ovom radu, odnosno 30 kg, 340 kg, 200 kg i 100 kg, u prvoj, drugoj, trećoj i četvrtoj godini cvetanja, respektivno.

Sa Grafika 44 i 46, kao iz Tabela 17 i 18, može se zaključiti da je ritmika branja cvetnih glavica, u ukupnom trajanju od oko 20 dana bila podeljena u 6 – 8 berbi, a da je najveća količina ubranih cvetnih glavica (preko 70%) smeštena u tri glavne berbe. Glavne berbe vegetativno razmnoženih varijanti su u obe posmatrane godine su otpočinjale ranije nego kod ostalih varijanti na ogledu. Uticaj svih indukovanih faktora na prinos cvetne glavice, u obe posmatrane godine je bio značajan (Tabela 23), ali su

takođe bile značajne i interakcije faktora vrsta sadnica i vrsta đubriva, u obe godine, i vreme sadnje i vrsta sadnica u 2010. godini. Interakcije faktora vrste sadnica sa vrstom đubriva su dalje uticale na prikrivanje statističke značajnosti uticaja faktora vrste đubriva na prinos cvetne glavice arnike. Tako zbog losijeg prijema i slabijeg razvića biljaka iz vegetativne propagacije prolećnog plotu sadnje, faktor vrste đubriva nije u svom ukupnom dejstvu na ogledu statistički značajno uticao na prinos cvetne glavice ni u jednoj od posmatranih godina (Grafik 48). Interakcije faktora vrste sadnica sa vrstom đubriva su dalje uticale na prikrivanje statističke značajnosti uticaja faktora vrste đubriva na prinos cvetne glavice arnike. Kada se uticaj faktora vrste đubrenja proučava izolovano, po varijantama vrste sadnica, uočava se da postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina osnovnih skupova đubrenih blokova i kontrolnih blokova kod generativno razmnoženih varijanti u obe posmatrane godine (Grafik 45 i 47). Prethodno publikovani podaci uglavnom govore o skromnom ili nikakvom doprinosu đubrenja u stvaranju većeg prinosa cvetnih glavica *A. montana*. Prema Bomme *et al.* (1995) na plodnim zemljištima arnika se može uzgajati bez primene velike količine đubriva. Ista grupa autora pokazala je da su prinosi cveta arnike, u tri uzastopne godine, bili viši na neđubrenim (356 – 755 kg/ha) nego na đubrenim varijantama (266 – 635 kg/ha). Seeber *et al.* (1997) prijavljuju veće prinose u varijantama đubrenim mineralnim đubrivom (850 – 1100 kg/ha) u odnosu na kontrolu (575 - 870 kg/ha). Nasuprot ovim nalazima istraživanja rađena u našem klimatu pokazuju da uticaj đubrenja može znatno unaprediti prinos cveta, gde su varijante đubrene mineralnim đubtivom dale za 20.5%, a varijante đubrene stajnjakom za 9.4%, veće prinose cveta u odnosu na kontrolnu varijantu (Radanović *et al.*, 2007). Valja napomenuti da je ovo istraživanje rađeno na malč folijama, pa se bolja reakcija usvajanja hraniva može pripisati posebnim ekološkim uslovima u kojima su biljke gajene. Biljke iz generativno razmnoženih varijanti na prolećnom plotu sadnje su imale očekivano statistički značajno veći prinos cvetne glavice u 2010. godini u poređenju sa 2009. godinom (Grafik 49A). Takođe su i biljke sa jesenjeg plotu sadnje u proseku postigle statistički značajno veće prinose od generativno razmnoženih biljaka sa prolećnog plotu sadnje (Grafik 49B). Faktor vrste sadnica je statistički veoma značajno uticao na visinu prinosa cvetne glavice (Grafik 50), što je i očekivano obzirom da je ovaj faktor uticao na variranje vrednosti svih posmatranih komponenti prinosa, osim na prečnik cvetne glavice u 2010. godini, pa

samim tim i na prinos cvetne glavice kao super-svojstva. Radi boljeg pregleda prinosnog potencijala svih proučavanih varijanti na ogledu, uvedene su dve teoretske vrednosti: prinos cvetnih glavica po biljci i teoretski prinos cvetnih glavica (Tabela 19). Iz ovakvog pregleda se može zaključiti, da bi biljke iz jesenjeg plota sadnje, i bez masovnog propadanja vegetativno razmnoženih biljaka iz prolećnog plota sadnje, bile superiornije po prinosu cvetne glavice. Takođe se iz ovog pregleda može pretpostaviti da bi najveći prinos cvetnih glavica (417,1 kg/ha), u trećoj vegetaciji, postigla generativno razmnožena varijanta u bloku mineralnog đubrenja posađena na jesen (JMG).

Sudeći po jačini veze najveći uticaj na visinu prinosa imale su osobine: prečnik rozete, visina cvetnog izdanka, broj cvetnih izdanaka i broj cvetnih glavica po biljci, čije su jačine veze sa prinosom cvetne glavice ocenjene korelacionim koeficijentima koji su se kretali, u obe posmatrane godine, od $r = 0,82$ do $r = 0,94$ (Grafici 51-54). Prečnik cvetne glavice je bio negativno korelisan sa prinosom cvetne glavice u 2009. godini ($r = -0.60$), ali se ta veza nije zadržala i u narednoj godini ($r = 0.06$) (Tabela 20). Takođe se i osobina broj sekundarnih rozeta u drugoj vegetaciji statistički veoma značajnoo pozitivno koreliše sa visinom prinosa ($r = 0.75$), ali se u trećoj vegetaciji ta veza gubi. Faktorskom analizom je utvrđeno da su upravo pobrojane osobine, sa visokim koeficijentima korelacije sa prinosom cvetne glavice, u obe posmatrane godine, po svojim faktorskim opterećenjima delile zajedničku varijansu sa Faktorom 1 – prinos i komponente prinosa (Grafik 89 i 91). Ovakvo grupisanje je bilo očekivano obzirom da je za izradu faktorske analize korišćena korelaciona matrica.

Na ovom nivou istraživanja može se zaključiti da su biljke iz jesenje sadnje dale značajno veće prinose, da je uticaj faktora vrste đubrenja osetan samo kod generativno razmnoženih biljaka, da faktor vrste sadnica ima uticaj na prinos samo kod biljaka sađenih u proleće i da variranje vrednosti većine odabranih komponenti prinosa u velikoj meri utiče na visinu prinosa.

Prinos rizoma i korena

Rezultati merenja masa podzemnih organa arnike su se pokazali jako heterogeni (Grafik 19 i 20). U svakoj posmatranoj godini mereni parametri su imali izuzetno velike

koeficijente varijacije (CV%) koji su u svojim maksimalnim vrednostima kod prinosa rizoma iznosili 38,8%, u 2009. godini (odnosno 48,1%, u 2010. godini), a u slučaju prinosa korena 82,2% (48,2%). Ovakva neujednačenost u vrednostima uticala je veliki raspon masa, gde je u 2009. godini minimalna vrednost mase rizoma (57.1 kg/ha) bila skoro 10 puta manja od maksimalne vrednosti (502.1 kg/ha), a isto tako i minimalna vrednost mase korena (85,0 kg/ha) skoro 10 puta manja od maksimalne vrednosti (822.8 kg/ha). U drugoj posmatranoj godini (2010) se smanjuje raspon između ekstremnih vrednosti na oko 4 puta u slučaju rizoma i oko 2 puta u slučaju korena (Tabela 31). Prinosi rizoma su se u 2009 godini kretali od 106.3 – 373.7 kg/ha (odnosno 475.9 – 897.5 kg/ha u 2010. godini) (Grafici 55 i 56), a prinosi korena od 194.3 – 426.4 kg/ha (odnosno 420.7 – 614.7 kg/ha) (Grafici 62 i 63). Podaci o prinosima podzemnih organa dobijeni sa oglada su u skladu sa literaturnim podacima. Autori koji su obrađivali ovu temu nisu pridavali posebnu pažnju razdvojenom posmatranju podzemnih organa nego su jednim terminom “koren” ili “rizom” objedinjavali oba organa u jedan pojam. Podaci o tako prikazanom prinosu (zajedno rizom i koren) na našem ogledu se kreću od 0.8 – 1.5 t/ha, a u prethodno objavljenim studijama se prinos kretao od oko 1 t/ha (Bezzi i Ghidini, 1988), preko 0.8 – 2.8 t/ha (Bomme *et al.*, 1995; Heeger 1956) do 3 t/ha i više (Marquard i Kroth, 2001; Dachler i Pelzmann, 1999). Naši nalazi su najsličniji podacima dobijenim sa oglednog gajenja arnike u Italiji (Bezzi i Ghidini, 1988), dok su naši prinosi u svom maksimumu dvostruko niži od prijavljenih prinos podzemnih organa arnike gejene u Nemačkoj (Marquard i Kroth, 2001; Dachler i Pelzmann, 1999). Ovakva različitost je, kao i kod prinosa cvetnih glavica, najverovatnije posledica povoljnijih agroekoloških uslova za gajenje ove biljke u zemljama Centralne Evrope.

Uticao faktor đubrenja ni u jednoj posmatranoj godini nije ispoljio statističku značajnost u pogledu variranja vrednosti prinosa podzemnih organa (Grafici 57 i 64) (Tabela 23). Biljke su u 2009. godini imale očekivano statistički manje prinose podzemnih organa u odnosu na biljke iz 2010. godine, na oba plotu sadnje (Grafik 58 i 65). Uticaj vremena zasnivanja je u drugoj vegetaciji bio statistički veoma značajan na variranje prinos rizoma, dok je u trećoj vegetaciji uticaj ovog faktora bio značajan na variranje prinosa i rizoma i korena (Grafik 59 i 66). Uzrok ovim razlikama je najverovatnije dužina vegetacionog perioda, gde su biljke posađene na proleće imale u prethodnoj godini (2008) jednu čitavu vegetaciju više (Slika 22), u kojoj su formirale

veći broj sekundarnih rozeta (Grafik 41). Jačina veze između ove dve prinosa rizoma i broja sekundarnih rozeta se može okarakterisati u 2009. godini kao jaka ($r = 0.80$), a u 2010. godini kao osrednja ($r = 0.54$) (Grafik 61). Između prinosa rizoma i prinosa korena u obe posmatrane godine postoji statistički značajna pozitivna korelaciona veza. Ta veza je u 2009. godini ocenjena kao jaka koeficijentom korelacije $r = 0.88$, dok je u 2010. godini ocenjena kao osrednja koeficijentom $r = 0.49$. Prinosi korena sa dela ogleđa posađenog na proleće su bili viši u odnosu na vrednosti ovog parametra dobijenih sa dela ogleđa sađenog na jesen. Takođe, na jesenjem delu ogleđa, viši prinos korena su imale biljke koje su razmnožene generativno od biljaka koje su razmnožene deobom bokora. U drugoj posmatranoj godini (2010) na prinos rizoma ima uticaj samo faktor vremena zasnivanja i interakcija svih indukovanih faktora (Tabela 23). To praktično znači da su se na kraju treće vegetacije, u pogledu vrednosti ovog parametra, oslabljeni uticaji faktora vrste đubriva i vrste sadnica ujednačili, ali da je očuvan bonitet povoljne kombinacije faktora i to upravo: prolećne sadnje (zbog duže vegetacije u trenutku posmatranja), đubrenja stajnjakom i vegetativnog načina razmnožavanja (varijanta POG = 897,5 kg/ha; Tabela 31), ali da razlike između sredina plotova vremena sadnje, blokova đubrenja i varijanti razmnožavanja ponaosob nisu pokazale statističku značajnost. U istoj godini na prinos korena utiče faktore vremena sadnje, gde je prolećna sadnja favorizovana zbog duže vegetacije prolećno sađenih biljaka u trenutku posmatranja (Grafik 66B). Po faktorskim opterećenjima podzemni organi arnike su se u obe posmatrane godine gupisale u poseban Faktor 3. To znači da su sa veoma malim delom varijanse ove dve osobine učestvovala u variranju osobina koje su uticale na visinu prinosa cvetne glavice.

Prinos etarskog ulja korena i rizoma

Prinos etarskog ulja iz korena gajene arnike u 2009. godini kretao se od 1.05 – 3.15% (1.71 – 2.40% u 2010. godini), dok se prinos etarskog ulja rizoma kretao od 3.98 – 4.83% (2.09 – 3.07% u 2010. godini) (Grafici 69 i 70). Dobijene vrednosti prinosa su u saglasnosti sa već publikovanim rezultatima, gde većina autora navodi vrednost od 1,5% kao maksimalnu (Willuhn, 1969; Dachler i Pelzmann, 1999; Bomme *et al.*, 1995;

Munoz, 1987; Heeger, 1956), izuzev Fenaroli (1963) koji navodi maksimalnih 6,3% ulja (Bezzi i Ghidini, 1989).

Uticao faktor vrste đubrenja na prinos etarskog ulja korena i rizoma nije bio značajan ni u jednoj od posmatranih godina (Tabela 22), što je u suprotnosti sa nalazima Chang i sar. (1998), gde pri povećanju koncentracije pristupačnih hraniva u zemljištu dolazi do povećanja sadržaja etarskog ulja u korenu korejske valerijane (*Valeriana fauriei* var. *dasycarpa* Hara). Takođe, Ezz El-Din i Hendawy (2010) navode da postoji pozitivna korelacija između količine unetog hraniva u zemljište i sadržaja etarskog ulja u korenu selena (*Levisticum officinale*). U obe posmatrane godine u rizomima arnike akumulirala se statistički značajno veća količina etarskog ulja (Grafik 71). Ovakva raspodela ulja je najverovatnije posledica različite morfologije ova dva organa, što se može uočiti na poprečnim presecima (Slike 34 i 37), gde rizomi razvijaju veće šupljine u intercelularima koje im služe za skladištenje ulja (Slika 36). Uticao starenja na prinos etarskog ulja je bio izraženiji kod rizoma nego kod korena, gde su biljke iz druge posmatrane godine (2010) imale niži sadržaj etarskog ulja od biljaka iz prve posmatrane godine (2009) (Grafik 72), što je najverovatnije posledica formiranja većeg broja sekundarnih rozeta u trećoj vegetaciji u odnosu na drugu. U prilog ovoj tvrdnji ide ranije pokazana pozitivno korelisana veza broja sekundarnih rozeta i prinosa rizoma (Grafik 61), a takođe i negativno korelisana veza sadržaja etarskog ulja u rizomu i prinosa rizoma (Grafik 75). Uticao faktor vremena zasnivanja je bio statistički značajan samo na variranje vrednosti prinosa ulja u korenu prve posmatrane godine (Grafik 73). Ova značajnost je očekivana budući da su biljke iz prolećne sadnje imale čitavu jednu vegetaciju duže razviće (Slika 22). Uticao vrste sadnica na jesenjem plotu sadnje nije bio značajan u pogledu variranja prinosa ulja u podzemnim organima (Grafik 74), što je bilo za očekivati obzirom na ujednačenost u prijemu i formiranju svih ostalih organa oba tipa sadnica.

7.3. Mikroskopska i hromatografska karakterizacija droga

Makroskopska analiza

Makroskopska identifikacija biljne droge *Arnicae flos* u poređenju sa pretpostavljenim falsifikatima, *Calendule flos* i cvetnom glavicom *Doronicum columne*, je izvodljiva golim okom do nivoa osušenih cvetnih glavica (Slika 25 A i B), dok je u sprašenom obliku identifikacija otežana čak i pod lupom (x40) (Slika 25 B i C). Da bi se sa sigurnošću ustanovilo o kojoj sprašenoj drogi je reč, moraju se koristiti veća mikroskopska uveličanja.

Mikroskopska analiza

Mikroskopski pregled delova cvetnih glavica (Slika 26) otkriva specifičnosti pojedinih delova koji bi mogli poslužiti za brzu identifikaciju droge *Arnicae flos*. Tako su dlačice na ahenijama kod *A. montana* i *D. columnae* dvostruke, bez glave i providne dok su kod *C. officinalis* kratke, sa glavičastim savršetkom i ispunjene saržajem (Slika 26A). Kod vrsta *A. montana* i *D. columnae* debljina papusa se veoma razlikuje (Slika 26D). Tako *A. montana* ima papuse debljine oko $69 \pm 16 \mu\text{m}$, što je u skladu sa već publikovanim rezultatima (Deutschmann et al., 1979; Eschrich, 1979), dok *D. columnae* ima oko $30 \pm 7 \mu\text{m}$. Ovo je u isto vreme i najlakše uočljiva razlika u sprašenom obliku cvetnih glavica, koja može poslužiti kao ključ za razlikovanje ove dve vrste pod mikroskopskim uveličanjem. Povoljna karakteristika papusa je da mu se retko narušava struktura po dužini, tako da i u samlevenom obliku zadržava dimenziju debljine. Prašnici svih posmatranih vrsta su veoma slični s tim što su prašnici vrste *D. columnae* uži (Slika 26E). Ova karakteristika se nažalost ne može koristiti kao ključ za identifikaciju vrsta u sprašenom obliku obzirom da se prašnici cepkaju na sitne komade gubeći pri tom informaciju o početnim dimenzijama. Žigovi tučaka ove tri vrste na slici 26F izgledaju potpuno različito, ali je to najverovatnije posledica nejednake razvijenosti u toku faze punog cvetanja. Žigovi tučaka sve tri vrste su u svom punom razviću mnogo sličniji nego što je to prikazano na ovoj slici. Ove tri vrste, kao i ostale biljke iz familije Asteraceae, razvijaju dvodelni žig tučka sa lastavičasto savijenim krajevima. Takođe se,

zbog narušavanja strukture prilikom mlevenja cvetnih glavica, eventualne razlike u strukturi žiga tučka ne bi mogle koristiti za identifikaciju vrsta.

Vrste *A. montana* i *C. officinalis* se mogu razlikovati i po dlakama koje su prisutne u bazi kruničnih listića Slika 27, ali je pouzdaniji pokazatelj debljina papusa (Slike 28 i 30). Primese cveta nevena u drogi *Arnica flos* mogu biti uočene već pod uveličanjem x5 preko karakterističnih žlezdanih dlaka sa baze kruničnih listića i sa listića involukruma (Slika 29). Opisane anatomske karakteristike arnike su u skladu sa literaturnim podacima (Deutschmann et al., 1979; Pfänder, 2002; Eschrich, 1979).

Iz sumiranih mikroskopki uočljivih razlika između posmatrane tri biljne vrste predstavljene u Tabeli 24, možemo izvesti zaključak da se na osnovi prisustva i debljine papusa može najbrže i najlakše identifikovati biljna droga *Arnicae flos*.

Tankoslojna hromatografija

Iz prezentovanih rezultata HPTLC analize ekstrakata cvetnih glavica *A. montana* i dva pretpostavljena falsifikata, *C. officinalis* i *D. columne* (Slika 32) može se zaključiti da je ova tehnika pogodna za brzu identifikacija droge *Arnicae flos*. Dobijeni hromatogrami *A. montana* i *C. officinalis* su u skladu sa ranije publikovanim rezultatima (Wagner et al., 1984). Jasna diskrecija cvetnih glavica *A. montana* i *D. columnae* u odnosu na *C. officinalis* je moguća zahvaljujući sadržaju rutina. U prethodnim istraživanjima je pokazano da arnika u svom fenolnom kompleksu ne sadrži rutin (HagerROM, 2002; Merfort, 1992; Kohlmünzer, 2000; Reyes-Salas et al., 2002; Ganzera et al., 2008; Spitaler et al., 2008; Albert et al., 2009; Schilcher et al., 2007). Nasuprot ovim istraživanjima, Craciunescu i sar. (2012) prijavljuju značajne količine rutina u ekstraktima cvetnih glavica *A. montana* i nadzemnom delu biljke *Artemisia absinthium*. Ovakvo ne slaganje u rezultatima je verovatno posledica nepodudaranja metodskih postupaka u analizama fenolnog kompleksa. U našem istraživanju tehnikom tankoslojne hromatografije u ekstraktu cvetne glavice arnike nije bila vidljiva zona koja bi po položaju odgovarala standardu rutina (Slika 32).

Lokalizacija etarskog ulja u rizomu i korenu

Sekretorni kanali u korenu arnike u kojima se nakuplja etarsko ulje verovatno služe kao odbrambeni mehanizam od zemljišnih štetočina. Dobro je poznato da sekretorne strukture koje su prisutne kod viših biljaka imaju važnu ekološku ulogu u odbrani biljaka od biljojeda i patogena (Cury and Appezzato-da-Glória, 2009; Werker, 1993). Sekretorni kanali smešteni u sub-epidermalnoj zoni rizoma arnike, takođe mogu imati ulogu rezervoara etarskog ulja, koje biva oslobođeno samo kada je rizom fizički ozleđen.

Miris koji se oslobađa prilikom povređivanja korena i rizoma može služiti kao repelent ili kao otrov za larve insekata koje bi bile položene u sam koren ili ostale za ostale biljojede, kao što je, recimo, slučaj sa sekretornim kanalima u listovima biljke *Rustia Formosa* (Vieira *et al.*, 2001). Etarsko ulje može služiti i kao nematocid (Oka *et al.*, 2000, Choi *et al.*, 2007) ili da ima antifungalne komponente kao što su nađeni kod estragona (Meepagala *et al.*, 2002). Za ulje rizoma *Solidago canadensis* se pretpostavlja da ima potencijal u alelopatskoj supresiji kompetitora (Curtis and Lersten, 1990; Johnson *et al.*, 2010)

Unutrašnji sekretorni prostori ispunjeni uljem ili smolom su široko rasprostranjeni kod glavočika i najčešće se na zivaju 'dukti' ili 'kanali'. Združivanje sekretornih rezervoara sa floemom, kao što je slučaj u rizomu *A. montana*, je takođe uobičajeno kod biljaka iz porodice Asteraceae (Lotočka i Geszprych, 2004; Lersten i Curtis, 1988; Curtis i Lersten, 1990). Međutim, postoje samo par objavljenih studija koje opisuju prisustvo uljnih rezervoara u korenovima i adventivnim korenovima. Uljni kanali i šupljine su detaljno anatomske analizirane u korenovima *Mikania cordifolia* i *M. sessilifolia*, *Trixis nobilis*, *Pterocaulon alopecuroides*, *Vernonia elegans* i *V. megapotamica* (Asteraceae) (Cury and Appezzato-da-Glória, 2009) i u rizomima vrsta *Rhaponticum carthamoides*, *Eupatorium rugosum* i *Solidago canadensis* (Lotočka and Geszprych, 2004; Curtis and Lersten, 1986, 1990; Lersten and Curtis, 1987, 1989). U rizomu vrste *Rhaponticum carthamoides* sekretorni rezervoari su opisani kao kanali (Lotočka and Geszprych, 2004), dok se uljem ispunjeni sekretorni prostori u rizomu vrste *Eupatorium rugosum* smatraju tubularnim, obzirom da su značajno kraći od dukta, a očigledno duži od sferične ili ovalne šupljine (Curtis and Lersten, 1986). Ponekad se

oblici rezervoara mogu menjati u toku razvića, kao na primer u rizomu i korenu vrste *Solidago altissima* (Lersten and Curtis, 1987, 1989; Curtis and Lersten, 1990), gde se inicijalne tubularne šupljine u odmaklim fazama razvoja spajaju u jednu cev zahvaljujući distorziji i raskidu septi.

Šupljine koje su prethodno opisivane u podzemnim organima familije Asteraceae su obično poravnate sa epetelom, kao što je slučaj u rizomima vrsta *Solidago canadensis* (Curtis and Lersten, 1990) i *Eupatorium rugosum* (Curtis and Lersten, 1986). Lotocka i Geszprych (2004) su u rizomu vrste *Rhaponticum carthamoides* pronašli sva sloja ćelija, epitel i omotač, koji okružuju rezervoare. Upoređujući stare i mlade rizome vrste *Solidago canadensis*, Curtis and Lersten (1990) su primetili da su epitelijalne ćelije u nivou uljnih šupljina u različitim fazama mitoze. Isti autori su takođe primetili da su mlade uljane šupljine, čak i samo delimično otvorene, sadržale sekterotne produkte, odakle su izvukli zaključak da se deobe ćelajia i proces sekrecije najverovatnije odvija simultano. Šizogeni intercelulari, obzirom da su inicijalno nastali deobom žlezdane ćelije, prostorno su poravnati sa sekretornim epitelijalnim ćelijama.

Uljani rezervoari u korenu arnike su verovatno takođe šupljine, ali lumen intercelulara u korenovima nije okružen epitelijanim ćelijama. Kod korena vrste *Solidago canadensis*, takođe se nisu mogle uočiti epitelijalne ćelije oko uljanih šupljina (Curtis and Lersten, 1990).

Šupljine u rizomu arnike su najverovatnije šizogenog porekla. U familiji Asteraceae, sekretorni rezervoari su najčešće karakterisani kao šizogeni (Curtis and Lersten, 1986), npr. u rizomima vrsta *Solidago canadensis* (Curtis and Lersten, 1990) i *Eupatorium rugosum* (Curtis and Lersten, 1986), ali je i lizogeno poreklo takođe prijavljeno (Rossi-Monteiro *et al.*, 1994).

Histohemijska analiza

Histohemijski testovi su potvrdili uljanu strukturu sekterornih produkata u podzemnim organima arnike. Uljane naslage svežih preseka korena i rizoma ispitivanih pod UV zaciama emitovale su difuznu i slabo svetlo-žutu autofluorescenciju, ukazujući time na prisustvo fenolnih jedinjenja u svom sastavu (Ruzin, 1999). U pogledu UV

autofluorescencije postoje samo nekoliko izveštaja rađenih na rizomu i korenu biljaka iz familije Asteraceae i svi oni pokazuju različite rezultate. Preseci korena *Tagetes patula* pokazali su plavo-žutu fluorescenciju pod UV spektrom, obzirom da sadrži tiofene u etarskom ulju (Poli *et al.*, 1995). Takođe, u korenu vrste *Santolina insularis* epitelijum unutrašnjih sekretornih rezervoara i sami sekretorni produkti su emitovali svetlu žuto-plavufluorescenciju pod UV (365 nm), zahvaljujući prisustvu kumarina i flavonoida (Sacchetti *et al.*, 1997).

Autofluorescencija ispitivanih ulja bila je intenzivnija na talasnim dužinama od 450–490 nm i 515–580 nm nego pod UV spektrom (340–380 nm), što može biti objašnjeno hemijskim sastavom ulja. Obzirom da je hemijska analiza etarskih ulja u podzemnim organima arnike pokazala se sastoje uglavnom od aromatičnih ugljovodonika, koji su u osnovi fenolni (timolni) derivati, moguće je da ove komponente daju bolju fluorescenciju na drugim talasnim dužinama. Ovo otvara mogućnost za dalja istraživanja koja bi imala za cilj upotrebu ostale dve talasne dužine kao alatke za brzu detekciju srodnih komponenti u histohemijskim istraživanjima.

7.4. Hemijska analiza droga

Određivanje sadržaja ukupnih seskviterpenskih laktona

Analiza sadržaja ukupnih seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici arnike je urađena HPLC tehnikom po metodi opisanoj u VI evropskoj farmakopeji (PhEur 6.0). Identifikacija jedinjenja je izvršena poređenjem retencionih vremena (Slika 39), molekulskih masa dobijenih tehnikom tečno-masene hromatografije (Tabela 25) i UV spektara (Tabela 26) sa referentnim jedinjenjima iz prethodnih studija (Willuhn i Leven, 1991; Perry *et al.*, 2009; Heldmaier, 2007; Douglas *et al.*, 2004; Bilia *et al.*, 2006, Staneva *et al.*, 2010).

Količine ukupnih seskviterpenskih laktona, izražene preko dihidrohelenalin tiglata (DHHT), su se u cvetnoj glavici arnike kretale od 7,7 – 13,2 mg/g (Grafik 76), u 2009. godini, odnosno od 4,6 – 13,9 mg/g (Grafik 77), u 2010. godini. Minimalne vrednosti DHHT u obe posmatrane godine bile su iznad farmakopejskog minimuma

kvaliteta od 4 mg/g (PhEur 6.0). Dobijeni podaci o sadržaju seskviterpenskog laktona u cvetnoj glavici arnike su u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima (Tabela 42).

Tabela 42. Literaturni podaci o sadržaju ukupnih seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici *A. montana*

Izvor	Ukupni sadržaj seskviterpenskih laktona
	mg/g
Hager ROM, 2002	2 - 8
Willuhn et al., 1995	3,1 – 10,2
Heldmaier, 2007	6,44 ± 0,15
Douglas et al., 2002	~ 8,54
Seemann et al., 2010	5,9 – 11,0
Staneva et al., 2011	~ 9,5
Spitaler et al., 2006	7,96 – 12,95
Seeber et al., 1997	7,5 – 13,4
Bomme, 1999	~ 8,0

Maksimalni ukupni sadržaj DHHT u ispitivanim uzorcima cvetnih glavica arnike sa ogleđa (13.9 mg/g) prevazilazi najvišu literaturnu vrednost (13.4 mg/g) (Seeber et al., 1997). Ova maksimalna vrednost je dostignuta u uzorcima cvetnih glavica sa morfološki slabije razvijene varijante, vegetativno razmnožene biljke u bloku mineralnog đubrenja na prolećnom plotu sadnje (Grafik 77). Biljke vegetativno razmnoženih varijanti posađenih u proleće su se, kako je ranije objašnjeno (Diskusija 5.1.), slabije razvile od ostalih varijanti na ogleđu. Takođe su biljke ovih varijanti formirale i najmanji broj cvetnih glavica po biljci (Grafik 28). Pojava da je sadržaj sekundarnih metabolita u biljnom materijalu negativno korelisan sa prinosom nije retka. Tako su Yang i sar. (2005) na primeru biljke *Chisantemum coronarium* pokazali da sa opadanjem prinosa dolazi do procentualno veće akumulacije seskviterpenskog laktona u cvetnoj glavici. Takođe, Sulpice i sar. (2009) ističu da je nivo većine biljnih metabolita u negativnoj korelaciji sa biomasom, a Ibrahim i sar. (2011) logiku veće akumulacije sekundarnih metabolita nalaze u poremećenom C/N odnosu, gde biljke usled nemogućnosti sinteze proteina, nakupljene organske materije iz fotosinteze akumuliraju u vidu sekundarnih metabolita. U našem slučaju, gde su se biljke vegetativno razmnožene varijante u prolećnoj sadnji loše ukorenile, slabije koristile hranivo iz zemljišta i formirale mali broj organa, verovatno je da je došlo do veće akumulacije sekundarnih metabolita u malom broju formiranih cvetnih glavica.

Od indukovanih faktora na ogledu u 2009. godini statistički značajan uticaj na sadržaj DHHT je imao samo faktor vrste sadnica (Tabela 31). Uticaj đubrenja na variranje ukupnog sadržaja seskviterpenskih laktona nije bio značajan ni u jednoj od posmatranih godina (Grafik 78). Sličan kvalitativni odgovor dobili su Bomme i sar. (1995) u oglecima arnike sa azotnim đubrivima gde takođe nisu postojale statistički značajne razlike između tretmana. Izolovani odgovor u sadržaju DHHT na primenjena đubriva uočljiv je samo na primeru vegetativno razmnoženih biljaka u prolećnom plotu sadnje u trećoj vegetaciji (Grafik 77), ali pošto sledljivost takve značanosti nije bila zastupljena u prethodnoj godini (Grafik 76), niti je podržana značajnim razlikama između đubrenih blokova u prinosu cvetnih glavica ove varijante u 2010. godini (Grafik 47), verovatno je u pitanju slučajnost. U 2010. godini od faktora na ogledu statistički značajno su na variranje parametra sadržaja DHHT u cvetnoj glavici uticali vreme sadnje i vrsta sadnica (Tabela 31). Između posmatranih godina nije bilo statistički značajnih razlika u pogledu sadržaja DHHT (Grafik 79A), ali je faktor vremena sadnje statistički značajno uticao na variranje sadržaja DHHT u cvetnim glavicama arnike (Grafik 79B). Ova značajnost je očekivana obzirom na utvrđeni veći sadržaj DHHT u cvetnim glavicama slabije razvijenih biljaka iz vegetativne propagacije na prolećnom plotu sadnje (Grafik 77). Uticaj faktora vrste sadnica na variranje ukupnog sadržaja seskviterpenskih laktona bio je značajan samo na prolećnom plotu sadnje (Grafik 80), što je posledica prethodno opisanog fenomena veće akumulacije DHHT u slabije razvijenim biljkama u varijantama vegetativne propagacije na prolećnom plotu sadnje.

Ukupni sadržaj seskviterpenskih laktona u cvetnoj glavici arnike, u obe posmatrane godine, bio je u statistički značajno negativno korelisan sa nivoom prinosa cvetne glavice (Grafik 81), ali je isto tako bio u negativnim korelacijama i sa većinom komponenata prinosa (Tabela 27). Sadržaj DHHT je sa prečnikom cvetne glavice samo u prvoj godini bio u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji, ali se ta veza u narednoj godini gubi. Sa brojem sekundarnih rozeta i prinosom podzemnih organa, sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona ni u jednoj posmatranoj godini nije imao statistički značajne korelacione veze. Sadržaj DHHT se po faktorskim opterećenjima, u prvoj posmatranoj godini (2009) značajno korelirao sa Faktorom 2 – „hemijske karakteristike cvetne glavice“ (Tabela 33; Grafik 89), dok se u 2010. godini grupisao u Faktor 1 – „komponente prinosa cvetne glavice“, ali sa jakim negativnim koeficijentom korelacije

$r = -0.82$ (Tabela 34; Grafik 91). Odavde se može zaključiti da je u većini slučajeva pozitivna promena u varijansi komponenti prinosa i prinosa cvetne glavice uticala na opadanje sadržaja DHHT. Sa priloženog hromatograma (Slika 39) takođe se može zaključiti da su dominantna seskviterpenska jedinjenja helenalinskog tipa (helenalin metakrilat (2), helenalin izobutirat (3), helenalin tiglata (5) i helenalin-2-metilbutirilata (6)). Proporcije helenalinskih i dihidro helenalinskih estara mogu varirati u odnosu na geografsku širinu, tako arnika iz centralne Evrope sadrži uglavnom helenalinske estere, dok biljke iz španskih kolekcija sadrže uglavnom dihidro helenalinske estere (Willuhn *et al.*, 1994). Perry i sar. (2009) upravo na španskim samoniklim arnikama pokazuju da su varijacije u sadržaju ova dva tipa seskviterpenskih laktona posledica nadmorske visine, gde biljke sa viših nadmorskih visina sadrže uglavnom helenalinske estere, a biljke iz nižih predela dihidrohelenalinske estere. Ovo je važno sa stanovišta farmakologije obzirom da se helenalin i dihidrohelenalin razlikuju i po antiinflamatornoj aktivnosti i po alergenim sporednim efektima (Perry *et al.*, 2009). Tinktura arnike sa većim sadržajem helenalina se u nekoliko antiinflamatornih studija pokazala aktivnijom od tinkture sa visokim sadržajem dihidrohelenalina (Klaas *et al.*, 2002).

I u drugim biljkama porodice asteraceae moguće je pronaći seskviterpenske laktone pseudoguanolidnog tipa. Tako je iz listova biljke *Vernoniopsis caudata* izolovan je 11 α ,13-dihidrohelenalin-[2-(1-hidroksietil)acrilat] čiji je ekstrakt pokazao antiplazmodijalnu aktivnost (Ramanandraibe *et al.*, 2005), kao i helenalin iz vrsta *Helenium sp.* (Seaman, 1982).

Sadržaj dominantnih fenolnih komponenti

Fenolna jedinjenja su identifikovana poređenjem sa autentičnim referentnim jedinjenjima izolovanim iz arnike u prehodnim studijama (Merfort, 1984; Merfort i Wendisch, 1987; Spitaler *et al.*, 2006) (Tabela 28). Od identifikovanih jedinjenja za određivanje sadržaja odabrana je jedna fenolna kiselina (hlorogenska kiselina) i dva dominantna flavonoida (kvercetin-3-*O*-glukozid i kempferol-3-*O*-glukozid).

Pregled sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u cvetnoj glavici arnike dat je u Tabeli 29. Sadržaj hlorogenske kiseline se kretao od 3.1 – 6.0 mg/g (1.9 – 6.57 mg/g) u drugoj (odnosno trećoj) vegetaciji, kvercetin-3-*O*-glukozida od 8.4 – 13.9 mg/g (7.8 –

12.5 mg/g), a kemferol-3-*O*-glukozida od 2.1 – 4.7 mg/g (2.1 – 4.5 mg/g). Naši podaci su u saglasnosti sa prethodno publikovanom studijom Albert i sar. (2009) gde se sadržaj hlorogenske kiseline kretao od 4,4 – 6,7 mg/g, kvercetin-3-*O*-glukozida od 9,7 – 11,7 mg/g, a kemferol-3-*O*-glukozida od 2,2 – 3,7 mg/g. Ostali literaturni podaci koji se tiču sadržaja flavonoida i fenolnih kiselina u cvetnoj glavici arnike (Spitaler et. al., 2006; Ganzera et al., 2008; Aiello et al., 2012) navode samo sume sadržaja te dve grupe jedinjenja. Spitaler i sar. (2008) ispitivali su zavisnost nadmorske visine i sadržaja fenolnih komponenti u cvetnim glavicama gajene arnike. Pokazano je da se ukupni sadržaj fenola se povećava sa povećanjem nadmorske visine, a takođe se povećava i potencijal neutralizacije slobodnih radikala. Kvantifikovana jedinjenja su uobičajene komponente penolnog kompleksa biljaka iz familije Asteraceae, njihovo prisustvo je potvrđeno u prethodnim studijama (Krimplstätter et al., 2011; Lin and Harnly, 2010; Lai et al., 2007). Pojedini autori navode 3,5-dikafeoilhina kiselinu kao dominantnu fenolnu komponentu (Gouveia et al., 2013; Kim et al., 2012) koja je takođe identifikovana i u našim ekstraktima (Tabela 28), ali zbog teškoća u izolaciji čistog jedinjenja (standarda) nije kvantifikovana.

Od indukovanih faktora na ogledu, faktor vrste sadnica je u 2009. godini statistički značajno uticao variranje svih fenolnih jedinjenja (Tabela 31), ali je interakcija između ovog faktora i faktora vrste đubrenja uticala na neispoljavanje statističke značajnosti u slučaju sadržaja kemperol-3-*O*-glukozida (Tabela 30). Faktor vrste đubrenja je, u ovoj godini, statistički značajno uticao na variranje sadržaja hlorogenske kiseline i kvercetin-3-*O*-glukozida (Tabela 31), međutim statistički veoma značajne su se pokazale i interakcije faktora vrste sadnica sa faktorom vrste đubrenja, tako da u pojedinačnoj analizi uticaj faktora đubrenja u ovoj godini nije bio statistički značajan (Grafici 82 i 83). U 2009. godini biljke arnike na ogledu su imale statistički veoma značajno viši sadržaj hlorogenske kiseline i kvercetin-3-*O*- β -D-glukozida, nego u 2010. godini, dok u slučaju sadržaja kemperol-3-*O*- β -D-glukozida nije bilo statistički značajnih razlika između posmatranih godina (Grafik 85). U trećoj vegetaciji (2010) faktor vremena sadnje nije imao uticaj na variranje sadržaja ni jednog od posmatranih fenolnih jedinjenja (Tabela 31) (Grafik 86). Uticaj faktora vrste sadnica, u ovoj godini, bio je statistički značajan samo na sadržaj hlorogenske kiseline i kvercetin-3-*O*-glukozida (Tabela 29). Faktor vrste đubrenja je, u 2010. godini, imao statistički

značajan uticaj na sadržaj svih proučavanih fenolnih jedinjenja (Tabela 31), ali se zbog značajne interakcije sa faktorom vrste sadnica, u slučaju kvercetin-3-*O*-glukozida, statistička značajnost ovog faktora nije ispoljila (Grafik 82). Uticaj faktora vrste đubrenja na variranje sadržaja fenolnih jedinjenja u cvetnim glavicama arnike je bio statistički značajan u drugoj posmatranoj godini, ali ne može izvući kvalitetan zaključak o uzročno-posledičnoj vezi đubrenja i ovog svojstva, obzirom da biljke đubrenih blokova, po sadržaju fenolnih jedinjenja, ni u jednoj godini nisu statistički značajno prevazilazile biljke iz kontrolnih varijanti, niti su kontrolne varijante bile prinosnije od đubrenih. Ibrahim i sar. (2011) navode da između sadržaja fenolnih jedinjenja u cvetnoj glavici *Labisia pumila* i dostupnosti azota u zemljištu postoji značajna negativna korelacija. Na osnovu naših rezultata nije se mogla izvući slična zakonitost u odnosu unetih hraniva u zemljište i sadržaja fenolnih jedinjenja u cvetnoj glavici arnike.

Faktor đubrenja je statistički značajano uticao samo na variranje sadržaja hlorogenske kiseline u drugoj posmatranoj godini (Grafik 82), gde sa varijanta iz bloka đubrenja stajskim đubrivom statistički značajno razlikovala od varijanti bloka mineralnog đubrenja i bloka kontrole. Većina istraživanja (Ibrahim *et al.*, 2011;) dovodi ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja i koncentraciju mineralnog azota u zemljištu u negativnu korelaciju (Ibrahim *et al.*, 2011), tako da se u ovom slučaju ne može izvući jasan zaključak. Takođe je uočena i statistička značajnost uticaja faktora đubrenja na sadržaj kempferol-3-*O*-glukozida u 2010. godini, ali su u ovom slučaju biljke iz kontrolnog bloka imale viši sadržaj od biljaka iz bloka đubrenja stjanjakom, tako da se ova uslovljenost može smatrati nelogičnom, a uzroke treba tražiti u drugim indukovanim ili slučajnim faktorima i njihovim interakcijama.

Faktor vremena sadnje nije značajno uticao na sadržaj ni jednog od posmatranih fenolnih jedinjanja (Grafik 19). U obe posmatrane godine faktor vrste sadnica je značajno uticao na variranje sadržaja hlorogenske kiseline i kvercetin-3-*O*-glukozida, gde su u oba slučaja generativno razmnožene varijante u proseku imale veći sadržaj u odnosu na varijante iz vegetativne propagacije (Grafik 19).

Fenolna jedinjenja su se po svojim faktorskim opterećenjima, kako je pokazano u faktorskoj analizi (Grafici 89 i 91), izdvajala u poseban Faktor 2. U 2009. godini njima je bio pridružen i ukupni sadržaj seskviterpenskih laktona, ali se taj parametar u 2010. godini po svom faktorskom opterećenju jako negativno korelisao sa Faktorom 1,

koji objašnjava varijansu prinosa i komponenata prinosa cvetne glavice (Tabela 33). Odavde se može zaključiti da na variranje tri kvantifikovane fenolne komponente nisu značajno uticale promene ostalih merenih parametara na ogledu.

Jedinjenja koja su u ovom istraživanju kvantifikovana takođe su prisutna i u drugim biljkama porodice Asteraceae (Apáti *et al.*, 2004; Maas *et al.*, 2008; Romani *et al.*, 2002; EMEA 2008; Landa *et al.*, 2009; Mendiondo *et al.*, 2011; Saleh i Bohm, 1971), kao i u drugim porodicama (Plazonić *et al.*, 2009; Trute i Nahrstedt, 1997; Barros *et al.*, 2012).

Hemijski profili etarskih ulja rizoma i korena

Rezultati hemijskog sastava ulja pokazuju da se dva jedinjenja 2,5-dimetoksi-*p*-cimen i timol metil etar mogu izdvojiti kao dominantna i oba su prepoznata kao derivati timola. Ovi nalazi su uskladu sa prethodno objavljenim podacima gde je prijavljeno da se glavna frakcija etarskog ulja sastoji uglavnom (82,5%) od etara, estara i tercijarnih alkohola, a prijavljeno je i prisustvo timol metil etra (Willuhn, 1972b). Ipak postoje velika neslaganja između hemijskog sastava ulja podzemnih organa *A. montana* prepoznatog u ovom radu (Tabela 32) i literaturnih podataka. Tako je Rohloff (2003) identifikovao manji broj komponenti (20) sa timol izobutiratom kao dominantnim jedinjenjem (20%), dok je timol metil etar bio prisutan u veoma maloj količini (1,6%). Ova neslaganja mogu biti posledica različitih tehnika korišćenih prilikom analize ulja. Do ovih nalaza, najkompletiniji izveštaj o etarskom ulju korena arnike dali su Weremczuk-Jezyna *et al.* (2011) gde su dve glavne komponente ulja bile prepoznate kao 10-izobutiriloksi-8,9-didehidro-timol izobutirat i 10-izobutiriloksi-8,9-didehidro timol metil etar.

Slični hemijski sastavi etarskih ulja, sa ista dva aromatična ugljovodonika kao glavnim komponentama, su objavljeni za nadzemne delove različitih vrsta iz porodice Asteraceae (Alilou *et al.*, 2008; Owolabi *et al.*, 2010; Tabanca *et al.*, 2010). Za timolne derivate je poznato da ispoljavaju antimikrobnu i insekticidnu aktivnost (Stojakowska *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010, Tabanca *et al.*, 2010). Etarsko ulje biljke *Eupatorium capillifolium* sa timol metil etar i 2,5-dimetoksi-*p*-cimen kao glavnim

komponentama je pokazalo insekticidnu aktivnost (Tabanca *et al.*, 2010). Jaka antifungalna aktivnost je zabeležena kod etarskog ulja biljke *Bubonium imbricatum* koja ima sličan hemijski sastav kao ulje arnike (Alilou *et al.*, 2008). Aeschbach *et al.* (1994) su pokazali da timol poseduje korisna antioksidativna svojstva nakon čega su predložili da se uvrsti u dodatke hrani. Svi pomenuti rezultati ukazuju na mogućnost da i etarsko ulje podzemnih delova *A. montana* poseduju antimikrobnu, insekticidnu i antioksidativnu aktivnost.

Prema literaturnim podacima, arnika u cvetnim glavicama sadrži manje od 0.1 % etarskog ulja, čije su glavne komponente seskviterpeni (oko 50%), dok su aromatična jedinjenja slabije zastupljena (Ristic *et al.* 2007). Ovakva velika hemiska različitost između etarskog ulja nadzemnih i podzemnih organa nije neobična u porodici Asteraceae. Prema Metcalfe i Chalk (1950) sekretorni kanali kod glavočika, koji se javljaju u stabljici i korenu iste vrste, nastaju kao dva odvojena sistema i do uginuća ostaju razdvojeni do kraja životnog ciklusa biljke.

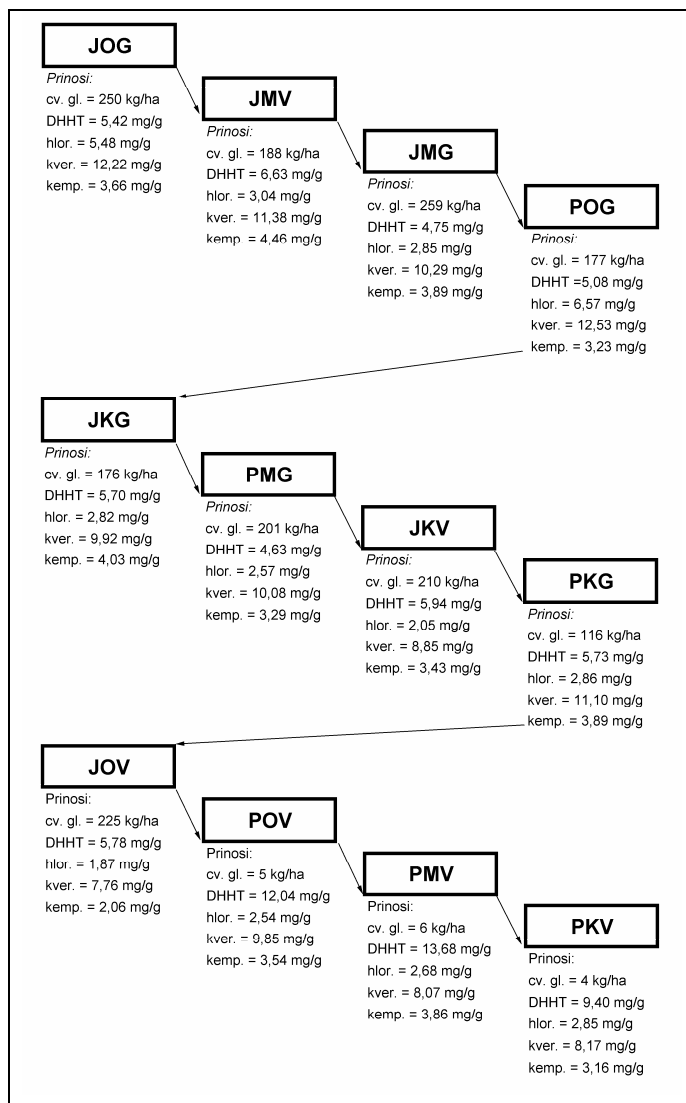
7.5. Međusobni odnosi testiranih karakteristika

Faktorskom analizom prinosa, morfoloških i hemijskih parametara, utvrđeno je da pojedine osobine dele zajedničku varijansu (Tabele 33 i 35). Od najvećeg značaja u ovom istraživanju je svakako parametar prinosa cvetne glavice, uz koji se grupisao određeni broj merenih svojstava. Obzirom da je polazna matrica za izradu faktorske analize bila korelaciona, za očekivati je bilo da su parametri sa visokim vrednostima korelacionih koeficijenata u vezi sa prinosom cvetne glavice odgovorni za variranje ovog svojstva. U grafičkim prikazima faktorskih opterećenja, obe posmatrane godine, moguće je uočiti grupisanje određenih morfoloških parametara oko parametra prinosa cvetne glavice (Grafici 89 i 91). Iz ove analize se može zaključiti da u formiranju prinosa cvetne glavice najveći doprinos daju parametri: prečnik rozete, visina cvetnog izdanka, broj cvetnih izdanaka i broj cvetnih glavica po biljci.

Sekvencionalno razdvajanje svih varijanti zasnivanja po poželjnim osobinama prinosa i hemijskog sastava cvetne glavice rezultiralo je rangiranjem u kojem prva tri mesta zauzimaju đubrene varijante iz jesenjeg zasnivanja (Tabela 37). Već na ovom nivou moguće je uočiti relativan doprinos faktora vrste sadnica na jesenjem plotu sadnje,

obzirom na činjenicu da je prvi rang (I) dodeljen generativno razmnoženoj varijanti (JOG), a već drugi (II) varijanti vegetativne propagacije (JMV). Na sledeća dva rangirana mesta nalaze se generativno razmnožena varijanta u bloku đubrenja stajskim đubrivom iz prolećnog zasnivanja (POG) i varijanta generativnog razmnožavanja u kontrolnom bloku đubrenja na jesenjem plotu sadnje (JKG). Ova dva ranga (IV i V) ukazuju na prekid kontinuiteta ranga jesenjeg plotu sadnje uplivom prolećno sadene varijante (POG) koja odskače po visokom sadržaju kvantifikovanih fenolnih jedinjenja (Tabela 29), ali takođe i na visoko rangiranu varijantu iz kontrolnog bloka đubrenja (JKG) koja se odlikuje visokim sadržajem kvantifikovanih flavonoida (F1 i F2) (Tabela 29). Najslabije rangirane su bile varijante vegetativnog razmnožavanja u prolećnom terminu sadnje (X – XII), što je bilo i očekivano obzirom na odabir prinosa kao najvažnije osobine u ovoj sekvencijalnoj klasifikaciji i nivo postignutih prinosa ove tri varijante (Grafici 45 i 47).

U donošenju odluke za preporučeni model gajenja može se koristiti i princip izolovanog posmatranja prinosa, budući da su sve varijante zasnivanja zadovoljile farmakopejski minimum kvaliteta (Grafici 76 i 77). Kao rezultat ovakvog pristupa u drugoj godini posmatranja (2010), mogli bi se odlučiti za najprinosnije varijante (JMG, JOG i JOV), a kao tehnološki najjeftinija varijanta zasnivanja sa visokim prinosom cvetne glavice mogla bi se izdvojiti varijanta vegetativnog razmnožavanja biljaka đubrena stajskim đubrivom u jesenjem roku sadnje (JOV). Prinosi podzemnih organa arnike i sadržaj etarskokg ulja nisu uzimani u obzir prilikom opredeljivanja za preporučeni model, obzirom da se radi o sporednim sirovinama. Sistematizovan prikaz rangiranja po prinosima cvetnih glavica i kvantifikovanih sekundarnih metabolita dat je na Slici 50.



Slika 50. Rangirani modeli zasnivanja plantaže arnike po prinosima u 2010. godini

7.6. Biološki efekti

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

U ispitivanju antioksidativne aktivnosti ekstrakata cvetnih glavica arnike veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala imao je ekstrakt sa maksimalnom vrednošću sadržaja ukupnih seskviterpenskih laktona (SL max) u odnosu na ekstrakt sa

minimalnom vrednošću (SL min), dok su razlike u antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata sa maksimalnom (F max) i minimalnom (F min) vrednošću sadržaja tri kvantifikovana fenolna jedinjenja su bile neznatne. Na ovom nivou istraživanja se može zaključiti da ekstrakt sa većom koncentracijom seskviterpenskih laktona poseduje veći potencijal neutralizacije slobodnih radikala.

Budući da su fenolna jedinjenja ispoljavaju širok spektar aktivnosti (Janković, 2005; Zheng i Wang, 2001; Hossein Goli et al. 2012; Saravanakumar et al. 2009; Wojdylo et al. 2007) i zbog sposobnosti flavonoida da redukuju slobodne radikale kao što su superoksid, peroksil, alkosil i hidrokasil radikali (Pietta, 2000), očekivalo se da razlika između antioksidativne aktivnosti ekstrakta koji je imao najveću sumu kvantifikovanih jedinjenja (F max) i ekstrakta sa najmanjim sadržajem (F min) biti izražena. Međutim aktivnosti ova dva ekstrakta su bile gotovo ujednačene. Razlog ovako slabo izraženoj razlici u aktivnostima najverovatnije leži u sumi nekvantifikovanih fenolnih jedinjenja u oba ekstrakta, koje su takođe iskazivale aktivnost. Utoliko pre što nije utvrđen sadržaj ranije prijavljenog najaktivnijeg fenolnog jedinjenja, hispidulina (Schilcher *et al.*, 2007).

Antimikrobna aktivnost

U poređenju antimikrobnih aktivnosti ekstrakata cvetne glavice arnike može se zaključiti da su ekstrakti seskviterpenskih laktona i ekstrakti fenolnih jedinjenja pokazali približno istu aktivnost. Razlike u aktivnostima između ekstrakata sa maksimalnim i minimalnim sadržajem određene grupe jedinjenja su bile očigledne (Tabela 39). U slučaju ekstrakta sa maksimalnim sadržajem ukupnih seskviterpenskih laktona (SL max) MIC vrednosti za sve posmatrane mikroorganizme su bile niže od MIC vrednosti za ekstraks sa minimalnim sadržajem (SL min), što je bilo i očekivano obzirom na ranije prijavljenu antimikrobnu aktivnost SL (Giesbrecht et al. 1990; Neerman, 2003; Chaturvedi, 2011) Ekstrakt sa maksimalnim sadržajem tri kvantifikovana fenolna jedinjenja (F max) je pokazao veću antimikrobnu aktivnost od ekstrakta sa minimalnom vrednošću (F min) kod osam od dvanaest mikroorganizama, dok je za tri Gram pozitivne bakterije (*B. subtilis*, *M. luteus*, *M. flavus*) ispoljio nižu aktivnost. Iz Tabele 39 takođe se može zaključiti da je koliformna (indikator fekalnog zagađenja) bakterija *E. coli* ujednačeno reagovala na sve testirane ekstrakte i da je MIC uniformno iznosila 5 ul/ml. Ovo nam ukazuje da bi se testirani ekstrakti potencijalno mogli koristiti kao prirodno antimikrobno sredstvo u eliminaciji ove patogene bakterije

koja je u ranijim istraživanjima izolovana i identifikovana sa pojedinog lekovitog bilja. Stević (2009) je konstatovala čestu kontaminaciju uzoraka koprive, zdravca, pitome nane i drugih biljaka, ovom bakterijom. Pretpostavka je da kontaminacija potiče od sporadičnih tečnih ekskremenata domaćih životinja tokom ispaše (S. Tasić, usmena komunikacija).

Literaturni podaci takođe potvrđuju da ekstrati cvetne glavice arnike mogu ispoljiti baktericidna svojstva protiv *Listeria monocytogenes* i *Salmonella typhimurium* (Leung, 1980). Takođe je utvrđeno da helenalin i srodni seskviterpeni poreklom iz arnike imaju antimikrobno djelovanje protiv *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium insidiosum*, *Micrococcus roseus*, *Mycobacterium phlei*, *Sarcinia lutea* i *Proteus vulgaris* (Lee et al., 1977). Ista grupa autora navodi da helenalin pokazuje antifungalnu aktivnost protiv *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermaphyton spp.* i *Botrytis cinerea*.

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja rizoma i korena arnike prikazana u Tabeli 40 je bila očekivana utoliko što su fenolna jedinjenja poznata kao antimikrobni agensi. Komponente fenolnih struktura, kao što su karvakrol, eugenol i timol, važe za vrlo aktivne u antimikrobnim testovima (Dorman i Deans, 2000). Jedinjenja koja pripadaju ovoj klasi su poznate kao baktericidni ili bakteristatični agensi zavisno od primenjene koncentracije (Pelczar et al., 1988). Ova jedinjenja su jako aktivna uprkos njihovoj relativno maloj rastvorljivosti u vodi, što je u potvrđeno u prethodnim istraživanjima (Shapiro et al., 1994; Meena i Sethi 1994; Jeongmok et al., 1995). Jaku aktivnost fenolnih jedinjenja je moguće objasniti alkilnom supstitucijom u fenolnom jezgru, za koju je poznato da povećava antimikrobnu aktivnost fenola (Pelczar et al., 1988). Budući da su se testirana ulja u ovom istražianju razlikovala u sumi fenolnih jedinjenja oko 10% kod ulja rizoma (12,6% kod ulja korena), očekivana veća antimikrobna aktivnost se ispoljila na sve testirane mikroorganizme, osim na *C. albicans* (Tabela 40). Odavde se može zaključiti da ulja korena i rizoma arnike mogu poslužiti kao dobri baktericidi, ali ne i kao dobri fungicidi.

8. ZAKLJUČAK

Kultivacija alohtone vrste *Arnica montana* u cilju dobijanja kvalitetne sirovine *Arnicae flos* za farmaceutsku industriju, u agroekološkim uslovima Srbije je moguća. Testirajući različite modele zasnivanja plantaže nakon trogodišnjeg posmatranja i analize dobijenih sirovina doneti su sledeći zaključci:

- #1 Plantažnim gajenjem arnike u agroekološkim uslovima Srbije može se dobiti do **300 kg/ha kvalitetne sirovine *Arnicae flos*** i oko 1000 kg/ha podzemnih organa iz kojih se može destilacijom dobiti oko 30 l etarskog ulja bogatog aromatičnim jedinjenjima.
- #2 Hemijskom analizom ekstrakata cvetne glavice utvrđeno je da ukupni sadržaj seskviterpenskih laktona kod svih testiranih varijanti **zadovoljava kriterijum kvaliteta propisan Evropskom farmakopejom**, ali i da poseduju značajan nivo pojedinih fenolnih jedinjenja (hlorogenske kiseline, kvercetin-3-*O*-glikozida i kempferol-3-*O*-glukozida).
- #3 Proučavajući biologiju formiranja prinosa cvetne glavice, ustanovljene su mnoge jake korelacione veze između posmatranih osobina, a kao **komponente prinosa** prepoznata je grupa osobina čije variranje vrednosti u velikoj meri utiče na variranje prinosa cvetne glavice. U tu grupu spadaju sledeća svojstva: prečnik rozete, visina cvetne stabiljike, broj cvetnih stabljika i broj cvetnih glavica po biljci.
- #4 Mikroskopskom analizom sprašene droge i tehnikom tankoslojne hromatografije ustanovljena je **brza i jednostavna metoda za identifikaciju** cvetne glavice arnike u odnosu na dva pretpostavljena falsifikata *C. officinalis* i *D. columnae*. Po istom principu u daljem istraživanju može se obraditi serija biljaka koje se u prometu lekovitih sirovina makroskopskim pregledom teško razlikuju od *Arnicae flos*.
- #5 U ispitivanju **antioksidativne aktivnosti** ekstrakata cvetnih glavica arnike veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala imao je ekstrakt sa maksimalnom vrednošću sadržaja ukupnih seskviterpenskih laktona u odnosu na ekstrakt sa minimalnom vrednošću, dok su razlike u antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata sa maksimalnom i minimalnom vrednošću sadržaja tri kvantifikovana fenolna jedinjenja su bile neznatne. Testirani ekstrakti ispoljili su i **antimikrobu**

aktivnost, gde su minimalne vrednosti za inhibiciju rasta devet sojeva bakterija i jednog kvasca u većini slučajeva bile niže kod ekstrakata sa većim sadržajem sekundarnih metabolita. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja je bila selektivna, gde su MIC vrednosti za određene mikroorganizme bile izuzetno male, dok je kvasac *Candida albicans* bio visoko rezistentan na sva testirana etarska ulja. Budući da odabrani ekstrakti sa maksimalnim sadržajem tri odabrana fenolna jedinjenja nisu imala značajno veću biološku aktivnost u odnosu na ekstrakt sa minimalnim sadržajem, a da je to sudeći po literaturnim podacima bilo za očekivati, u daljim istraživanjima trebalo bi akcenat staviti na izolovanje i kvantifikaciju preostalih jedinjenja iz fenolnog kompleksa, kao i njihove pojedinačne antioksidativne i antimikrobne aktivnosti.

- #6 Podzemni organi arnike sadrže **značajne količine etarskog ulja** u kojima dominiraju fenolna jedinjenja. Ulje se sintetiše u epitelijalnim ćelijama kortikalnog parenhima odakle se izlučuje u intercelulare koji se u daljem razviću spajaju u kanale.
- #7 Model zasnivanja plantaže arnike na proleće iz vegetativnih sadnica se pokazao kao nepoželjan zbog unapredovale generativne faze razvića sadnica koja je uslovlila lošije ukorenjavanje ovih varijanti i veliki procenat uginuća biljaka. Kao **najpovoljniji model zasnivanja** pri sekvencijalnoj klasifikaciji, baziranoj na visini prinosa i kvalitetu cvetne glavice, izdvojena je varijanta generativnog razmnožavanja u bloku đubrenja stajskim đubrivom posađena na jesen. Obzirom da je nivo postignutog prinosa cvetne glavice ispod svetskog proseka, a da se u ovom istraživanju pokušalo odgovoriti samo na neka od agrotehničkih pitanja, dalja istraživanja bi trebalo da obuhvate testove gajenja na različitim nadmorskim visinama i različitim tipovima zemljišta. Takođe, u cilju pojeftinjenja proizvodnje, poželjno bi bilo razmotriti opcije mehanizovane berbe cvetnih glavica specijalizovanim beračima, obzirom da utrošak radne snage prilikom ručnog branja nije zanemarljiv.

9. LITERATURA

- Adams, R.P. (2007) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry*. 4th ed. Allured Publishing Corp., Carol Stream, Illinois.
- Albert, A., Sareedenchai, V., Heller, W., Seidlitz, H.K. and Zidorn, C. (2009) Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO, *Oecologia*, 160, pp. 1-8.
- Apáti, P., Houghton, P.J. and Kéry, A. (2004) HPLC investigation of antioxidant components in Solidago herba, *Acta Pharm Hung.*, 74, pp. 223-31.
- Assyov, B., Petrova, A., Dimitrov, D. and Vassilev, R. (eds) (2006) *Conspectus of the Bulgarian vascular flora, Distribution maps and floristic elements*, p 452., Bulgarian—Swiss Biodiversity Conservation Program, 2nd edn. BSBCP, Sofia.
- Austin, D.F. (2004) *Arnica* in: *Florida Ethnobotany*, pp. 110 – 111, CRC Press.
- Balabanova, V., Vitkova, A. (2010) Peculiarities in ontogenesis of *Arnica montana* L. in Bulgaria. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, 2, pp. 1301-1306.
- BAz (1984) *Arnica flos*, Arnikablüten, *Bundesanzeiger*, 5.12.1984., Heftnummer: 228., ATC-Code: D03CA. Monographie BGA/BfArM (Kommission E).
- Baricevic, D. and Rode, J. (2000) Directives of the national program on medicinal and aromatic plants in Slovenia, Proceedings, pp. 12-14, 1st CMAPSEEC, May 29 - June 3, 2000, Arandjelovac, FR Yugoslavia.
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C. and Santos-Buelga, C. (2012) Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal, *Food Chem Toxicol.*, 50, pp. 1576-82.
- Bentham, G. (1873). Notes on the classification, history, and geographical distribution of Compositae, *J. Linn. Soc. Bot.*, 13, pp 335-557.
- Bezzi, A. and Ghidini, G. (1989) *Prime esperienze di coltivazione di Arnica montana L. sulle Alpi meridionali e sull'Appennino settentrionale*, Estratto Dagli Annali, Vol. XI, pp. 306-320, Nuova Stampa Rapida, Trento.

- Bilia, A.R., Bergonzi, M.C., Mazzi, G. and Vincieri F.F. (2006) Development and stability of semisolid preparations based on a supercritical CO₂ Arnica extract, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, pp. 449-454.
- Bioforce Monograph: *Arnica montana* L. (AtroMed/Rheuma-Gel), A. Vogel, Switzerland, Source: <http://www.avogel.ca/downloads/Studies/Monography-Absolut-Arnica.pdf>
- Blatt für Sortenwesen (2010), Bundessortenamt, pp. 80, Osterfelddamm, Hannover.
- Bomme, U. (1991) Arnika kann jetzt auch feldmäßig angebaut werden, *Aktuelles für den Landwirt.*, 1, pp. 5.
- Bomme, U. (1999) Anbau und Züchtung von *Arnica montana* L. *Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen*, 4, pp. 202-203.
- Bomme, U., Mittermeier, M., Regenhardt, I. (1995) Ergebnisse zur Entwicklung eines Verfahrens für den feldmäßigen Anbau von *Arnica montana* L. (2. Mitteilung), *Drogenreport*, 8, pp. 3-11.
- Bomme, U. and Daniel, G. (1994) First results on selection breeding of *Arnica montana* L. *Gartenbau- wissenschaft*, 59, pp. 67-71.
- Bown, D. (2001) *Herbal: the essential guide to herbs for living*. Pavillion, London.
- Bruelheide, H. (2003) Translocation of a montane meadow to simulate the potential impact of climate change, *Applied Vegetation Science*, 6, pp. 23-34.
- Bruelheide, H. and Scheidel, U. (1999) Slug herbivory as a limiting factor for the geographical range of *Arnica montana*, *Journal of Ecology*, 87, pp. 839-848.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Science*, 74, pp. 2157-84.
- Candolle, A.P. (1837) *Prodromus systemati naturalis regni vegetabilis sive enumeratio contracta ordinum, generum specierumque plantarum huc usque cognitarum, juxta methodi naturalis normas digesta*, 6, pp. 316-318, Treuttel et Würtz., Paris.
- Carmines, E. and Zeller, R. (1979) *Reliability and Validity Assessment*, Sage Paper Series on Quantitative Applications No. 07-017, Beverly Hills, CA: Sage Publications Inc.

- Chang, H.C., Ouk, K.H., Young H.C., Seung G.Y. (1998) Effect of fertilization rates on growth, root yield and essential oil composition in Korean valerian (*Valeriana fauriei* var. *dasycarpa* Hara), *Korean Journal of Crop Science*, 42, pp. 814–820.
- Chaturvedi, D. (2011) Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities. In: Tiwari, V., Mishra, B., (eds.) *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, pp. 313–334, Kerala, India, Research Signpost.
- Choi, I.H., Park, J.Y., Shin, S.C., Kim, J. and Park, I.K., (2007) Nematicidal activity of medicinal plant essential oils against the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*), *Applied Entomology and Zoology*, 42, pp. 397-401.
- Clark, G. (1981) *Staining procedures*. Williams&Wilkins, Baltimore.
- Craciunescu, O., Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E and Moldovan L. (2012) Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts, *Chemistry Central Journal*, 6, pp. 97.
- Curtis, J.D. and Lersten, N.R. (1986) Development of Bicellular Foliar Secretory Cavities in White Snakeroot *Eupatorium rugosum* (Asteraceae), *American Journal of Botany*, 73, pp. 79-86.
- Curtis, J.D. and Lersten, N.R. (1990) Oil reservoirs in stem, rhizome, and root of *Solidago canadensis* (Asteraceae, tribe Astereae). *Nordic Journal of Botany*, 10, pp. 443-449.
- Cury, G. and Appezzato-da-Glória, B. (2009) Internal secretory spaces in thickened underground systems of Asteraceae species, *Australian Journal of Botany*, 57, pp. 229-239.
- Dachler, M und Pelzmann, H. (1999) *Arznei- und Gewürzpflanzen Anbau, Ernte, Aufbereitung*. Klosterneuburg: Oesterreichischer Agrarverlag.
- Deutschmann, F., Hohmann, B., Sprecher, E. und Stahl E. (1979) *Arnicae flos - Arnikablüten* In: *Pharmazeutische Biologie 3, Drogenanalyse I: Morphologie und Anatomie*, pp. 101-104, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart – New York.
- Delabays, N. and Mange, N. (1991) Culture of *Arnica montana* L.: the agronomy and plant protection, *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic.*, 23, pp. 313–319.

- Dioscoridis, P. (1552) Anazarbei, De medicinali materia libri sex /Ioanne Ruellio Suessionensi interprete, s.3.p.144, Publication info: Lugduni :Apud Balthazarem Arnolletum.
- Dobelis, I. (1986) *Magic and Medicine of Plants*, Pleasantville, NY: Reader's Digest Association, Inc.
- Dorman, H.J.D. and Deans S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*, 88, pp. 308–316.
- Douglas, J.A., Smallfield, B.M., Burgess, E.J., Perry, N.B., Anderson, R.E., Douglas, M.H., Glennie, V.L. (2004) Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: a rapid analytical method and the effects of flower maturity and simulated mechanical harvesting on quality and yield, *Planta Medica*, 70, pp. 166-170.
- Duke, J., Bogenschutz, du Cellier, and Duke, P (2002) *Handbook of Medicinal Herbs 2nd ed.*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Džamić, R.A., Stevanović, D., Jakovljević, M. (1996) *Praktikum iz agrohemije*. Beograd: Poljoprivredni fakultet.
- Ebert, M., Merfort, I. and Willuhn, G. (1988) Flavonoid Distribution in *Arnica* Subgenera Montana and Austromontana, *Phytochemistry*, 27, pp. 3849-52.
- Ekenäs, C. (2008) Phylogenies and Secondary Chemistry in *Arnica* (Asteraceae), Dissertation, Faculty of Science and Technology, Universitatis Upsaliensis, Uppsala, Sweden.
- EMA (2008) European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use: ASSESSMENT REPORT ON SOLIDAGO VIRGAUREA L., HERBA, Doc. Ref. EMA/HMPC/285759/2007, Canary Wharf, London, E14 4HB, UK.
- Eschrich, W. (1979) *Flores Arnicae - Arnikablüten* In: *Pulver-Atlas der Drogen des Deutschen Arzneibuches*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
- Evstatieva, Lj.N., Todorova, M.N. and Petrova, M.I. (2012) Vegetative cultivation of *Arnica montana* L. in Bulgaria, *Proceedings of 7th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (CMAPSEEC)*, 27-30 May 2012, Subotica, Serbia.
- Ezz El-Din, A. and Hendawy, S.F. (2010) Comparative Efficiency of Organic and Chemical Fertilizers on Herb Production and Essential Oil of Lovage Plants Grown in Egypt, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 8, pp. 60-66.

- Fenaroli, G. (1963) *Sostanze aromatiche naturali*, (Vol. I), [Ed.] Ulrico Hoepli, Milano.
- Ferguson, I. K. (1976) *Arnica*. L. In: Tutin, T.G. et al. [Eds.] *Flora Europaea*, pp. 189–190. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fernandez, G. (2007) Design and analysis of commonly used comparative horticultural experiments, *HortScience* 42, pp. 1052–1069.
- Furr, Y., Mahlberg, P.G. (1981) Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*, *Journal of Natural Products*, 44, pp. 153-159.
- Gajić, M. (1975) Fam. Asteraceae u: *Flora SR Srbije* (Redakcioni odbor: Josifović, M., Stjepanović, L., Kojić, M. i Nikolić, V), VII tom, str. 1-465, Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd.
- Galambosi, B. (2000) Acclimatization studies with cold tolerant medicinal plants in Finland. In: *Speciality chemicals for the 21st century*, ADEME/IENICA International Seminar: Intermediary products, Cosmetics and perfumes, Medicinal applications, 16 - 17 September 1999, Valbonne, France, pp. 104-113.
- Galambosi, B. (2004) Introduction of *Arnica montana* L. in Finland. *Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen*, 4, pp. 174-180.
- Galambosi, B., Sz-Galambosi, Zs., Svoboda, K.P. and Deans, S.G. (1998) Flower Yield and Antioxidant Properties of *Arnica montana* L. Grown in Finland, *Drogenreport*, Jg.11, 19, pp. 10-13.
- Ganzera, M., Egger, C., Zidorn, C. and Stuppner, H. (2008) Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Anal Chim Acta*, 614, pp. 196–200.
- García-Piñeres, A.J., Castro, V., Mora, G., Schmidt, T.J., Strunck, E., Pahl, H.L. and Merfort, I. (2001) Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones, *J. Biol. Chem.*, 276, pp. 39713-20.
- Gawlik-Dziki, U., Swieca, M., Sugier, D. and Cichočka, J.(2011) Comparison of in vitro lipoxygenase, xanthine oxidase inhibitory and antioxidant activity of *Arnica montana* and *Arnica ahamissonis* tinctures, *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 10, pp. 15-27.
- Giesbrecht, A.M., Davino, S.C., Nassis, C.Z., Young, M.C., Lopes, J.L.C., Rodrigues, D.C., Vichnewski, W., Nasi, A.M.T.T., Dias, D.A. and Lopes, J.N.C. (1990). Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones. *Quím. Nova*, 13, pp. 312-314.

- Geissman, T.A. and Griffin, T.S. (1971) Sesquiterpene lactones: acid - catalysed color reactions as an aid in structure determination, *Phytochemistry*, 10, pp. 2475-2485.
- Gouveia, S., Gonçalves, J. and Castilho C.P. (2013) Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts from flowers of *Andryala glandulosa* ssp. *varia* (Lowe ex DC.) R.Fern., an endemic species of Macaronesia region, *Industrial Crops and Products*, 42, pp. 573–582.
- Guerin, H.P., Delaveau, P.G. and Paris, R.R. (1971) Localisations histochemiques 11: procedes simples de localisation de pigments Bavoniques. Application a quelques Phanerogames, *Bulletin de la Sociiiti botanique de France*, 118, pp. 29-36.
- Güntzel, U., Seidel, F. and Kating, H. (1967) Studies on the contents of Arnica-species. I. Content on essential oil in the flowers of different Arnica-species, *Planta Med*, 15, pp. 205–214.
- Hadživuković, S., (1991) Statistički metodi s primenom u poljoprivredi i biološkim istraživanjima. Drugo prošireno izdanje, *Ogledi s višegodišnjim zasadima*, pp. 328., Poljoprivredni fakultet, Institut za ekonomiku poljoprivrede i sociologiju sela, Novi Sad.
- HagerROM (2002) Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe: [Eds.] W. Blaschek, S. Ebel, E. Hackenthal, U. Holzgrave, K. Keller, J. Reichling, [Ass.] H.-D., Höltje, Mehrplatzversion/Windows/Update (German Edition) [CD-ROM]
- Heeger, E.F. (1956) Handbuch de Arznei- und Gewürzpflanzenbaus, pp. 19-42, Berlin: Deut-scher Bauernverlag.
- Heldmaier, M. (2007) Phytochemische Charakterisierung öliiger Extrakte aus pflanzlichen Drogen. *Dissertation*. Hamburg.
- Herz, W. and Sosa, V.E. (1988) Sesquiterpene lactones and other constituents of *Arnica acaulis*, *Phytochemistry*, 27, pp. 155-159.
- Hochmuth, D. (2006) *MassFinder 3: GC/MS visualisation, interpretation, and library Administration mass spectral library "Terpenoids and related constituents of essential oils"*, 1999–2006, Hamburg, Germany.
- Hoffmann, O. (1894) *Compositae* In: Engler A, Prantl K (Hrsg.) Die natürlichen Pflanzenfamilien, Bd. 4, pp. 87–391, Verlag W. Engelmann, Leipzig.

- Hossein Goli, S., Mokhtari, F. and Rahimmalek, M. (2012) Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petal, *Journal of Agricultural Science*, 4, pp. 175-181.
- Hulland, J. (1999) Use of Partial Least Squares (PLS) in Strategic Management Research: A review of four recent studies, *Strategic Management Journal*, 20, pp. 195-204.
- Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z., Rahmat, A., Rahman, Z.A. (2011) Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacip fatimah (*Labisia pumila* blume), *International Journal of Molecular Sciences*, 12, pp. 5238-5254.
- Iauk, L., Lo Bue, A.M., Milazzo, I., Rapisarda, A. and Blandino, G. (2003) Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria, *Phytother Res.*, 17, pp. 599–604.
- Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z., Rahmat, A., Rahman, Z.A. (2011) Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacip fatimah (*Labisia pumila* Blume). *Int. J Mol. Sci.*, 12, pp. 5238-54.
- Ivanović B. (1977) *Classification Theory*, Institut za ekonomiku industrije, Beograd, (in Serbian).
- Janković, T. (2005) Uredno ispitivanje hemijskog sastava biljnih vrsta roda *Gentianella*, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Jensen, W.A. (1962). *Botanical Histochemistry - principles and practice*. W. H. Freeman and Co., University of California, Berkeley.
- Jenelten, U. and Feller, U. (1992) Mineral nutrition of *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* ssp. *foliosa* maguire: Differences in the cation acquisition., *Journal of Plant Nutrition*, 15, pp. 2351 – 2361.
- Jeongmok, K., Marshall, M.R. and Wei, C. (1995) Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, pp. 2839–2845.
- Johansen, D.A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York, London.
- Johnson, R.H., Halitschke, R. and Kessler, A. (2010) Simultaneous analysis of tissue- and genotype-specific variation in *Solidago altissima* (Asteraceae) rhizome

- terpenoids, and the polyacetylene dehydromatricaria ester, *Chemoecology*, 20, pp. 255-264.
- Kalynyak, P.P., Trofymyak, T.B., Komisarenko, M.F. and Blyum, Y.B. (1995) Production of callus lines for plants from Arnica genus and analysis of their biosynthetic activity, *Dopov Natsional Akad Nauk Ukrayiny*, 9, pp. 107–110.
- Kathe, W. (2006) Conservation of Eastern-European Medicinal Plants: Arnica montana in Romania in R.J. Bogers, L.E. Craker and D. Lange (eds.), *Medicinal and Aromatic Plants*, pp. 203-211. © 2006 Springer. Printed in the Netherlands.
- Kating, H. and Seidel, F. (1967) Cultivation experiments with Arnica species. II. Vegetative propagation of Arnica montana L., *Planta Medica*, 15, pp. 420-429.
- Kating, H., Rinn, W. and Willuhn, G. (1970) Studies on the substance of species of Arnica. 3. Fatty acids in etheric oils of the flowers of various species of Arnica, *Planta Med*, 18, pp. 130–146.
- Kim, S.M., Jeon, J.S., Kang, S.W., Jung, Y.J., Ly, L.N. and Um, B.H. (2012) Content of antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in field-grown *Ligularia fischeri* (Ledeb.) Turcz and responses to sunlight, *J Agric Food Chem.*, 60, pp. 5597-603.
- Klaas, C.A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Della Loggia, R., Bomme, U., Pahl, H.L., Merfort, I. (2002) Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers, *Planta Medica*, 68, pp 385-391.
- Kohlmünzer, S. (ed) (2000) Farmakognozja. Pharmacognosy. Guide for pharmacy students. pp. 669, PZWL, Warszawa.
- Köhler, F.E. (1883-1914) *Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica*, Gera - Untermyhaus, Germany.
- Kolodziej, H. (1993) Sesquiterpenlactone – Biologische Aktivitäten, *Deutsche Apotheker Zeitung*, 133, pp 15-25.
- Krimplstätter, R., Ma, B., Spitaler, R., Ellmerer, E. and Zidorn, C. (2011) Phenolics from *Rhagadiolus stellatus* (Asteraceae, Cichorieae). *Sci Pharm.*, 79, pp. 175-9.

- Krushe, M. und Kusterer, A. (2010) Genehmigungen/Zulassungen der Pflanzenschutzmittelanwendungen im Arznei- und Gewürzpflanzenbau, Stand 22.12.2009, *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen*, 15, pp.
- Lai, J.P., Lim, Y.H., Su, J., Shen, H.M. and Ong, C.N. (2007) Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS, *J. Chromatogr.*, 848, pp. 215–225.
- Landa, A., Casado, R. and Calvo, M.I. (2009) Identification and quantification of flavonoids from *Chuquiraga spinosa* (Asteraceae), *Nat Prod Commun.*, 4, pp.1353-5.
- Lange, D. (1998) Europe's Medicinal and Aromatic Plants: Their Use, Trade and Conservation. A TRAFFIC Species in Danger Report, TRAFFIC International, Cambridge, United Kingdom.
- Lee, K-H., Toshiro, I., Wu, R-Y. and Geissman T.A. (1977) Structure–antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds. *Phytochemistry*, 16, pp. 117–118.
- Lersten, N.R. and Curtis, J.D. (1987) Internal secretory spaces in Asteraceae. A review and original observations on *Conyza canadensis* (tribe Astereae). *La Cellule*, 74, pp. 179-196.
- Lersten, N.R. and Curtis, J.D. (1988) Secretory reservoirs (ducts) of two kinds in giant ragweed (*Ambrosia trifida*; Asteraceae), *American Journal of Botany*, 75, pp. 1313-1323.
- Lersten, N.R. and Curtis, J.D. (1989) Foliar oil reservoir anatomy and distribution in *Solidago canadensis* (Asteraceae, tribe Astereae), *Nordic Journal of Botany*, 9, pp. 281-287.
- Leung, A.Y. (1980) *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*. New York-Chichester: Wiley.
- Lin, L.Z. and Harnly, J.M. (2010) Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat), *Food Chemistry*, 120, pp. 319–326.
- Linnaei, C. (1732) *Flora Lapponica*, pp. 248-250, Itinere Impenfis Soc. Reg. Scient. Usalaliensis.

- Linnaei, C. (1745) *Flora Suecica: exhibens plantas per regnum Sveciae crescentes, systematice cum differentiis specierum, synonymis autorum, nominibus incolarum, solo locorum, usu pharmacopaeorum*. (DORONICUM - No. 684.), pp. 245-246, Publication info: Stockholmiae :Sumtu & literis Laurentii Salvii.
- Linnaei, C. (1753) *Species plantarum :exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*, 2, pp. 884-885, Publication info: Holmiae : Impensis Laurentii Salvii.
- Lison, L. (1960) *Histochemie et cytochemie animales:principes et methodes*. Gauthier-Villars, Paris.
- Lopez-Anton, N., Hermann, C., Murillo, R., Merfort, I., Wanner, G., Vollmar, A.M. and Dirsch, V.M. (2007) Sesquiterpene lactones induce distinct forms of cell death that modulate human monocytederived macrophage responses, *Apoptosis*, 12, pp. 141–153.
- Lotocka, B. and Geszprych, A. (2004) Anatomy of the vegetative organs and secretory structures of *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae), *Botanical Journal of the Linnean Society*, 104, pp. 207-233.
- Lyss, G., Schmidt, T.J., Merfort, I., Pahl, H.L. (1997) Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF- κ B, *Biological Chemistry* 378 (9), pp. 951-961.
- Maas, M., Petereit, F. and Hensel, A. (2008) Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L., *Molecules*, 14, pp. 36-45.
- Mace, M.E. and Howell, C.R. (1974). Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings, *Canadian Journal of Botany*, 52, pp. 2423-2426.
- Macêdo, S.B., Ferreira, L.R., Perazzo, F.F. and Carvalho, J.C. (2004) Anti-inflammatory activity of *Arnica montana* 6cH: preclinical study in animals, *Homeopathy*, 93, pp. 84-87.
- Maguire, B. (1943) A monograph of the genus *Arnica* (Senecioneae, Compositae), *Brittonia*, 4, pp. 386-510.
- Marquard, R. und Kroth, E. (2001). Arnika In: *Anbau und Qualitätsanforderungen ausgewählter Arzneipflanzen*, pp. 24- 33. AgriMedia, Bergen Dümme.

- Mattioli, P. A. (1570) *Commentarii in libros sex Pedacii Dioscoridis. Anazarbei de medico materia*, p. 604, Vincent Valgrisum, Venice.
- Mayer, J.G. and Czygan, F.C. (2000) *Arnica montana* L. oder Bergwohlverleigh - Ein kulturhistorischer Essay - und über die Schwierigkeiten einen solchen zu verfassen, *Zeitschrift für Phytotherapie*, 21, pp. 30-36.
- Meena, M.R. and Sethi, V. (1994) Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *Journal of Food Science and Technology Mysore*, 31, pp. 68–70.
- Meepagala, K.M., Sturtz, G. and Wedge, D.E. (2002) Antifungal Constituents of the Essential Oil Fraction of *Artemisia dracunculus* L. Var. *dracunculus*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 6989-6992.
- Mendiondo, M.E., Juárez, B.E., Zampini, C., Isla, M.I. and Ordoñez, R. (2011) Bioactivities of *Chuquiraga straminea* sandwich, *Nat Prod Commun.*, 6, pp. 965-8.
- Merfort, I. (2003) Arnika: Neue Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus einer traditionellen Heilpflanze, *Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkunde*, 10 (Suppl. 1), pp. 45-48.
- Merfort, I. and Wendisch, D. (1985) Flavonoids from *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*, *Planta Med*, 51, pp. 136–138.
- Merfort, I. and Wendisch, D. (1987) Flavonoid glycosides from *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*, *Planta Med*, 53, pp. 434–437.
- Merfort, I. and Wendisch, D. (1988) Flavonoid glucuronides from the flowers of *Arnica montana*, *Planta Med*, 54, pp. 247–250.
- Merfort, I. and Wendisch, D. (1992) New flavonoid glycosides from *Arnicae flos* DAB 9., *Planta Med*, 58, pp. 355–357.
- Michler, B., Fischer, H., Pacurar, F., Stoie, A., Rotar, I., Reif, A. (2008) Monitoring sustainable use of medicinal plants: The case study of *Arnica montana* in the Apuseni Mountains in Romania, *Community Ecology*.
- Muñoz, F. (1987) *Arnica montana* in: *Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado*, pp. 130-106, Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- NCCLS (1997) National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*, Approved Standard M27-A, Villanova, PA.

- NCCLS (1998) National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters*, Tentative guideline M23-T3, Villanova, PA.
- Neerman, M.F. (2003) Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties, *International Journal of Aromatherapy*, 13, pp. 114-120.
- Nordenstam, B. (1977) Senecioneae and Liabeae - systematic review. In: The biology and chemistry of the Compositae, V.H. Heywood, J.B. Harborne, and B.L. Turner [eds.], vol. II, pp. 799–830, Academic Press, London, UK.
- Oberdorfer, E., Müller, T. and Korneck, D. (1994) *Pflanzensoziologische Exkursionsflora*, Stuttgart: Ulmer.
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z. and Spiegel, Y. (2000) Nematicidal Activity of Essential Oils and Their Components Against the Root-Knot Nematode, *Phytopathology*, 90, pp. 710-715.
- PaBreiter, C.M., Willuhn, G., Röder, E. (1992) Tussilagine and Isotussilagine: two pyrrolizidine alkaloids in the genus *Arnica*. *Planta Med.*, 58, pp. 556–557.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R. (1988) Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents In: *Microbiology* pp. 469–509. New York: McGraw-Hill International.
- Perry, N.B., Burgess, E.J., Guitián, M.A.R., Franco, R.R., Mosquera, E.L., Smallfield, B.M., Joyce, N.I. and Littlejohn, R.P. (2009) Sesquiterpene Lactones in *Arnica montana*: helenalin and dihydrohelenalin chemotypes in Spain. *Planta Med.*, 75, pp. 660–666.
- Peterson, R.L., Peterson, C.A., Melville, L.H. (2008) *Teaching Plant Anatomy Through Creative Laboratory Exercises Science*. NRC Press, Ottawa, Ontario.
- Petrova, M., Zayova, E., Vassilevska-Ivanova, R. and Vlahova, M. (2012) Biotechnological approaches for cultivation and enhancement of secondary metabolites in *Arnica montana* L., *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, pp. 1597-1606.
- Pfänder, H.J. (2002) Blütendrogen - Arnicae flos In: Farbatlas zur Drogenanalyse unter Verwendung des Stereomikroskops, pp. 39, Deutscher Apotheker Verlag.

- Ph. Eur. 6.0 (2008) Arnica flower In: *European Pharmacopoeia*, 6th ed., pp. 3400-3403, Council of Europe, Strasbourg.
- Ph. Jug. IV, 1984. *Pharmacopeia Jugoslavica*. 4th ed. Federal Institute for Health Care, Belgrade.
- Pietta P.G. (2000) Flavonoids as Antioxidants, *Journal of Natural Products*, 63, pp 1035–1042.
- Pinchon, T.M. and Pinkas, M. (1988) The genus *Arnica* [LE GENRE ARNICA] *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, 22, pp. 124-156.
- Plazonić, A., Bucar, F., Males, Z., Mornar, A., Nigović, B. and Kujundzić, N. (2009) Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry, *Molecules*, 14, pp. 2466-90.
- Poli, F., Sacchetti, G. and Bruni, A. (1995) Distribution of internal secretory structures in *Tagetes patda* (Asteraceae), *Nordic Journal of Botany*, 15, pp. 197-205.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N. (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *Afr. J. Biotechnol.*, 5, pp. 1142-1145.
- Prommersberger, S. und Dapper, H. (1995) Kultivierungsmöglichkeiten von *Arnica Montana*, *Bumschulpraxis*, 25, pp. 210-213.
- Rabinovič, M.I. (1987) *Лекарственные растения в ветеринарной практике*, Агропромиздат, Moskva, Rusija
- Radanović, D., Nastovski, T., Pljevljakušić D., Jevđović R. (2006) Growing results of some MAP species at mountaneous region of Serbia, III Conference on MAP of Southeast European Countries, 5 – 8. 9. 2004, Nitra, Slovak Republic, *Proceedings*, pp. 84 - 93.
- Radanović, D., Pljevljakušić, D., Nastovski, T., Ristić, M. (2007) Influence of fertilization model and PE mulch on yield and quality of *Arnica (A. montana)* at dystric cambisol, *Zemljište i Biljka*, 56 (3), pp. 85-95.
- Ramanandraibe, V., Martin, M.-T., Rakotondramanana, D.L., Mambu, L., Ramanitrahasimbola, D., Labaïed, M., Grellier, P. *et al.* (2005) Pseudoguanolide

- sesquiterpene lactones from *Vernoniopsis caudata* and their in vitro antiplasmodial activities, *Journal of Natural Products*, 68, pp. 800-803.
- Razavi, S.M., Zahri, S., Zarrini, G., Nazemiyeh, H. and Mohammadi, S. (2009) Biological activity of quercetin-3-*O*-glucoside, a known plant flavonoid, *Bioorg Khim.*, 35, pp 414-416.
- Reyes-Salas, O., Rangel-Ordoez, L., Manzanilla-Cano, J.A., Barcel-Quintal, M.H. and Dosal-Gmez, M.A. (2002) Voltammetric determination of caffeic acid in Arnica Montana, *Analytical Lett.* 35, pp. 971–984.
- Ristić, M., Krivokuća-Đokić, D., Radanović, D., Nastovski, T., (2007) Essential oil of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*, *Hemijska industrija*, 61, pp. 272-277.
- Robinson, H. (1981) A revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae), *Smithsonian Contributions to Botany*, 51, pp. 1–102.
- Roki, D., Menković, N., Šavikin-Fodulovic, K., Krivokuća-Đokić, D., Ristić, M., Grubišić, D. (2001) Flavonoids and essential oil in flower heads of introduced *Arnica chamissonis*. *Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants*, 8(4): 19-27.
- Romani, A., Pinnelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A. and Heimler, D. (2002) Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce, *Food Chem.*, 79, pp. 337-342.
- Rossetti, V., Lombard, A., Sancin, P., Buffa, M., Di Stefano, R. (1984) Characterization of Arnica-Montana Dried Roots, *Int. J Crude Drug Res.*, 22, pp. 53-60.
- Rossi-Monteiro, W., Morales, C.M., Fahn, A. and Caldeira, W. (1994) Observations on the development of the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* (Asteraceae), *Nordic Journal of Botany*, 15, pp. 69-76.
- Ruzin, S.E. (1999) *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press., Oxford, New York.
- Rüngeler, P., Castro, V., Mora, G., Goren, N., Vichnewski, W., Pahl, H.L., Merfort, I. and
Rupp, H.B. (1718) *Flora Jenensis*, p. 163, Francofvrti & Lipsiae: apud Ernestvm Clavd. Bailliar.
- Sacchetti, G., Romagnoli, C., Ballero, M., Tosi, B. and Poli, F. (1997) Internal Secretory Structures and Preliminary Phytochemical Investigation on Flavonoid

- and Coumarin Content in *Santolina insularis* (Asteraceae). *Phyton*, 37, pp. 219-228.
- Saleh, N.A. and Bohm, B.A. (1971) Flavonoids of *Arctium minus* (Compositae), *Experientia*, 27, pp. 1494.
- Santer, J.O. and Stevenson, R. (1962) Arnidiol and faradiol, *J Org Chem*, 27, pp. 3204-3208.
- Santos, M.D., Almeida, M.C., Lopes, N.P. and de Souza, G.E. (2006) Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull*, 29, pp 2236-2240.
- Saravanakumar, A., Venkateshwaran, K., Vanitha, J., Ganesh, M., Vasudevan, M. and Sivakumar, T. (2009) Evaluation of antibacterial activity, phenol and flavonoid contents of *Thespesia populnea* flower extracts, *Pak J Pharm Sci.*, 22, pp. 282-6.
- Schilcher, H., Kammerer, S., Wegener, T. (2007) *Leitfaden Phytotherapie*, 3rd Edition, pp. 43-44, Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH, München.
- Schmidt, T.J. (1999). Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action, *Bioorg. Med. Chem.*, 7, pp. 2343-2352.
- Seaman, F.C. (1982) Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae, *Bot. Rev.*, 48, pp. 121-595.
- Seeber, H., Abraham, H., Santer, H. und Stupner, H. (1997) Kulturversuche in Südtirol mit *Arnica montana* L., *Drogenreport*, 10, 16, pp. 10-16.
- Seemann, A., Wallner, T., Poschlod, P. and Heilmann, J. (2010) Variation of sesquiterpene lactone contents in different *Arnica montana* populations: influence of ecological parameters, *Planta Medica*, 76, pp. 837-42.
- Shapiro, S., Meier, A. and Guggenheim, B. (1994) The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 9, pp. 202-204.
- Shimp, T. and Sharma, S. (1987). Consumer ethnocentrism construction and validation of the CETSCALE, *Journal of Marketing Research*, 24. pp. 280-289.
- Schulte, K.E., Rücker, G. and Reithmayr, K. (1969) Certain constituents of *Arnica chamissonis* and other *Arnica* species, *Lloydia*, 32, pp. 360-368.
- Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O., and Dias, A.C. (2005). Phytochemical and

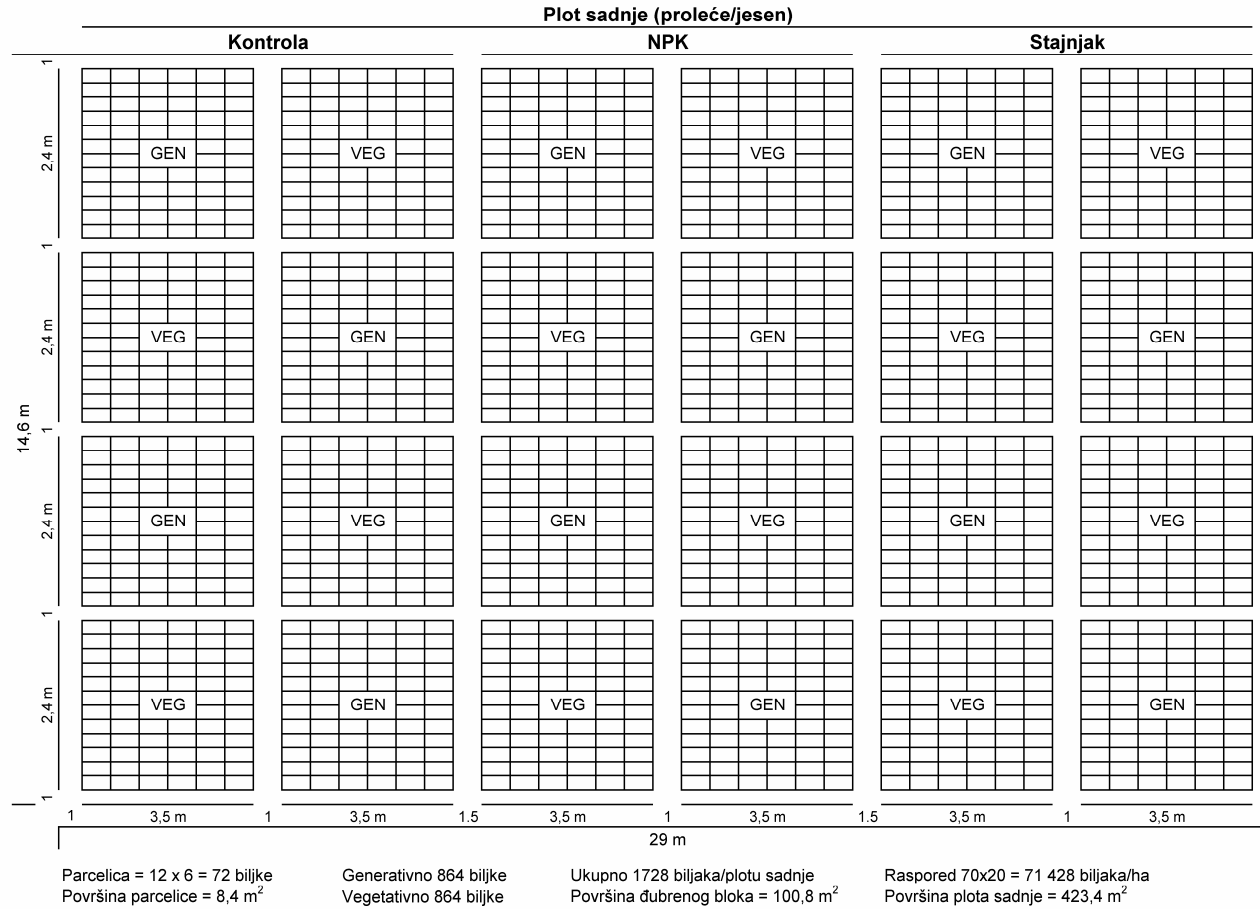
- antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*, 90, pp. 157–167.
- Simonović, D. (1959) *Arnica* (L.) Rupp. In: Botanički rečnik, pp. 47-48, SANU, Beograd.
- Smallfield, B.M. and Douglas, M.H. (2008) *Arnica montana* a grower's guide for commercial production in New Zealand. A report prepared for New Zealand Arnica Growers' Group, pp. 2, New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited, Christchurch, New Zealand.
- Schmidt, T.J., Paßreiter, C.M., Wendisch, D. and Willuhn, G. (1992) First diterpens from Arnica, *Planta Med.*, 58(Suppl 1), A713.
- Schmidt, T.J., Stausberg, S., von Raison, J., Berner, M. and Willuhn, G. (2006) Lignans from Arnica species, *Nat Prod Res*, 20, pp. 443–453.
- Spitaler, R., Schlorhauser, P.D., Ellmerer, E.P., Merfort, I., Bortenschlager, S., Stuppner, H., Zidorn, C. (2006) Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica Montana* cv. ARBO. *Phytochemistry*, 67, pp. 409–417.
- Spitaler, R., Winkler, A., Lins, I., Yanar, S., Stuppner, H. and Zidorn, C. (2008) Altitudinal Variation of Phenolic Contents in Flowering Heads of *Arnica montana* cv. ARBO: a 3-Year Comparison, *Journal of Chemical Ecology*, 34, pp. 369-375.
- Staneva, J., Denkova, P., Todorova, M. and Evstatieva L. (2011) Quantitative analysis of sesquiterpene lactones in extract of *Arnica montana* L. by ¹H NMR spectroscopy, *J Pharm Biomed Anal.*, 54, pp. 94-99.
- Stepanović, B., Radanović, D., Turšić, I., Nemčević, N., Ivanec, J. (2009) *Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja*, pp. 67-72, Jan Spider, Pitomača, Hrvatska.
- Stević, T. (2009) *Mikrobiološka kontrola lekovitog bilja*, Specijalistički rad, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Tabernaemontanus Jacobus Theodorus (1613) *Neuw vollkommentlich Kreuterbuch :mit schoönen und kunstlichen Figuren aller Gewachs der Bäümen, Stauden und Kräütern so in teutschen und welschen Landen, auch in Hispanien, Ostund West Indien oder in der Newen Welt - Das andere Theil*, Vol. 2, p. 48, Publication info: Franckfurt am Mayn :Durch Paulum Jacobi in Verlegung Johann Dreytels.

- Tornhamre, S., Schmidt, T.J., Näsman-Glaser, B., Ericsson I. and Lindgren, J.A. (2001) Inhibitory effects of helenalin and related compounds on 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells, *Biochem. Pharmacol.*, 62, pp. 903-911.
- Trute, A. and Nahrstedt, A. (1997) Identification and quantitative analysis of phenolic compounds from the dry extract of *Hedera helix*, *Planta Med.*, 63, pp. 177-9.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore D.M. and Valentine D.H (eds.) (1964-1980) *Flora Europaea*. Vol. 4, Plantaginaceae to Composite, Cambridge University Press, Cambridge.
- Vanhaelen, M. (1973) Identification of carotenoids in *Arnica montana*, *Planta Med.*, 23, pp. 308–311.
- Vieira, R.C., Delprete, P.G., Leitao, G.G. and Leitao, S.G. (2001) Anatomical and chemical analyses of leaf secretory cavities of *Rustia formosa* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 88, pp. 2151-2156.
- Wagner, S. and Merfort, I. (2007) Skin penetration behaviour of sesquiterpene lactones from different Arnica preparations using a validated GC-MSD method, *J Pharm Biomed Anal*, 43, pp. 32–38.
- Wagner, H., Bladt, S. and Zgainski, E.M. (1984) *Arnicae flos* in: *Plant Drug Analysis — A Thin Layer Chromatography Atlas*, pp.177, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo.
- Wagner, S., Suter A. and Merfort, I. (2004) Skin penetration studies of Arnica preparations and of their sesquiterpene lactones, *Planta Medica*, 70, pp. 897–903.
- Walter, H., Harnickell, E., and Mueller-Dombois, D. (1975) *Climate-diagram maps of the individual continents and the ecological climatic regions of the earth*. Springer-Verlag, Berlin.
- Werker, E. (1993) Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae: A review, *Flavour and Fragrance Journal*, 8, pp. 249-255.
- White, C.A., Kennedy, J.F., Lombard, A. and Rossetti, V. (1985) Analysis of a homologous series of non-reducing oligosaccharides from *Arnica montana* L Roots, *Brit Polym J*, 17, pp. 327–329.

- Wijnsma, R., Woerdenbag, H.J. und Busse, W. (1995) Die Bedeutung von Arnika - Arten in der Phytotherapie, *Z. Phytotherapie*, 16, pp. 48 - 62.
- Willuhn, G. (1989) Arnikablüten. In: Wichtl M (Hrsg.) Teedrogen, 2. Aufl., S. 66–69, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Germany.
- Willuhn, G. (1972a) Studies on the contents of Arnica species. V. Content and variations in content of volatile oils in the various organs of Arnica species, *Planta Med.*, 21, pp. 221–245.
- Willuhn, G. (1972b) Studies on the components of arnica species. VI. Characterization and preparative separation of volatile oils from roots, rhizoma, leaves and flowerheads of various arnica species, *Planta Medica*, 21, pp. 329-42.
- Willuhn, G. i Leven, W. (1991). Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Sesquiterpenlactone von Arnikabluten. *Pharm. Ztg. Wiss.* 136, pp. 32-39.
- Willuhn, G., Leven, W., Luley, C. (1994) Arnica flowers. German Pharmacopeia 10 (DAB 10): investigation of the qualitative and quantitative variability of sesquiterpene lactone contents of official Arnica crude drugs. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 134, pp. 49-59.
- Willuhn, G., Merfort, I., PaBreiter, C.M. and Schmidt T.J. (1995) Chemistry and systematics of the genus Arnica, In: D. J. N. Hind. C. Jeffrey & G. V. Pope [eds.], *Advances in Compositae systematics*, pp. 167-195, Chapman & Hall, London.
- Willuhn, G., Röttger, P.M. und Quarck, W. (1982) Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität der Sesquiterpenlactone der Arnikablüten. *Pharmazeutische Zeitung*, 127, pp. 2183-2185.
- Woerdenbag, H.J., Merfort, I., Passreiter, C.M., Schmidt, T.J., Willuhn, G., Van Uden, W., Pras, N., Kampinga, H.H. and Konings, A.W.T. (1994) Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC-4 and the COLO 320 cell lines, *Planta Med.*, 60, pp. 434–437.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J. and Czemerys, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chemistry*, 105, pp. 940–949.
- Zheng, W. and Wang, S.Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J Agric Food Chem.*, 49, pp. 5165-70.

10. PRILOZI

10.1. Prilog 1 – Šema ogleda



10.2. Prilog 2 – reagensi za histohemijske analize

Pregled upotrebljenih reagenasa za histohemijske analize podzemnih organa *A. montana*

Bojena procedura	Ciljana jedinjenja	Uočena boja	Rezultati
Sudan Crna B	masti	crna	++
Sudan III	masti	narandžasta do crvena	++
Fuksin kiselina	proteini	pink-crvena	-
Rutenijum crvena	pektini (polisaharidi)	pink- crvena	-
Lugol	sktob	tamno-plava do crna	-
Feri-sulfat (gvožđe III sulfat)	tanini (fenolna jedinjenja)	tamno-plava	-
Feri-hlorid	tanini (fenolna jedinjenja) (o-dihidroksi fenoli) polifenoli	tamno-zelena	-
Hidrohlorni vanilin	fenolna jedinjenja (flavonoidi) (tanini)	pink-crvena	-
Floroglucinol- <i>HCl</i>	lignin	crvena	-
Autofluorescencija nebojenih sekcija A: BP 340-380	lignin i fenolna jedinjenja	svetlo-plava do beličasta	±
Autofluorescencija nebojenih sekcija I3: BP 450-490	lignin i fenolna jedinjenja	svetlo-žuta	++
Autofluorescencija nebojenih sekcija N2.1: BP 515-580	fenolna jedinjenja	svetlo-crvena	++
Vagnerov reagent	alkaloidi	crveno-braon	-
Ditmarov reagent	alkaloidi	crveno-braon	-
Sumporna kiselina	seskviterpenski laktoni	crvena	-
Aluminium trihloride pod UV	flavonoidi	plavo-zelena	-

Results: (-) odsutno, (±) neznatno, (+) intenzivno, (++) veoma intenzivno

10.3. Prilog 3

Pregled vrednosti svih agronomskih parametara na ogledu u 2009. i 2010. godini

	Precnik rozete ^a [cm]	Visina cvetnog izdanka [cm]	Broj cvetnih izdanaka	Broj cvetnih glavica po biljci	Prečnik cvetne glavice [cm]	Prinos cveta [kg/ha]	Prinos cveta po biljci [g]	Broj sekundarnih rozeta	Prinos korena [kg/ha]	Prinos rizoma [kg/ha]	Et.u. KOR [%]	Et.u. RIZ [%]
2009												
POG	21.69 ± 3.98 b	31.15 ± 5.38 b	4.80 ± 2.98 a	10.13 ± 2.87 a	5.98 ± 0.81 b	143.55 ± 22.07 a	2.21 ± 0.42 a	18.25 ± 2.06 a	423.03 ± 269.65	373.75 ± 90.31 a	2.55	3.98
PMG	23.40 ± 4.35 a	34.17 ± 5.17 a	5.02 ± 3.24 a	10.47 ± 3.23 a	6.13 ± 0.55 b	136.39 ± 64.79 a	2.11 ± 0.93 a	17.25 ± 3.95 ab	312.50 ± 106.80	302.32 ± 103.69 ab	2.50	4.81
PKG	15.64 ± 4.21 c	28.25 ± 5.50 c	2.24 ± 1.69 b	3.14 ± 1.00 b	5.91 ± 0.33 b	59.84 ± 35.58 b	0.98 ± 0.52 b	13.25 ± 3.86 b	235.89 ± 127.25	231.43 ± 97.66 a-d	3.15	5.22
POV	12.38 ± 3.42 d	19.72 ± 6.14 e	1.50 ± 1.26 b	1.47 ± 0.29 c	7.15 ± 0.78 a	5.18 ± 2.73 c	0.86 ± 0.39 b	-	-	-	-	-
PMV	13.85 ± 3.39 d	23.15 ± 5.58 d	1.48 ± 0.71 b	1.28 ± 0.16 c	7.47 ± 0.78 a	15.38 ± 6.40 bc	0.67 ± 0.10 b	-	-	-	-	-
PKV	13.16 ± 3.35 d	21.49 ± 4.43 de	1.46 ± 0.90 b	1.23 ± 0.13 c	7.23 ± 0.72 a	13.13 ± 8.18 bc	0.43 ± 0.03 b	-	-	-	-	-
JOG	-	-	-	-	-	-	-	6.50 ± 1.29 c	399.10 ± 85.29	142.50 ± 47.29 d	2.51	4.58
JMG	-	-	-	-	-	-	-	6.00 ± 0.82 c	426.43 ± 207.11	128.39 ± 50.35 d	1.05	4.62
JKG	-	-	-	-	-	-	-	8.25 ± 1.71 c	295.35 ± 152.16	106.25 ± 19.66 d	2.02	4.03
JOV	-	-	-	-	-	-	-	8.00 ± 5.60 c	299.82 ± 141.65	239.46 ± 183.56 a-d	1.62	4.25
JMV	-	-	-	-	-	-	-	6.00 ± 1.41 c	367.68 ± 140.36	190.89 ± 57.61 bcd	1.99	4.19
JKV	-	-	-	-	-	-	-	5.75 ± 0.50 c	194.28 ± 45.13	156.25 ± 56.65 cd	1.50	4.83
2010												
POG	26.67 ± 4.18 ab	37.56 ± 1.90 bc	9.73 ± 1.42 b	20.46 ± 1.42 bc	7.05 ± 0.84 def	176.90 ± 20.67 b	3.31 ± 0.64 de	28.50 ± 6.56	614.75 ± 75.35 a	897.49 ± 254.58 a	2.11	2.88
PMG	27.68 ± 4.62 a	38.00 ± 1.89 abc	9.08 ± 2.03 b	25.19 ± 6.89 b	6.89 ± 0.51 ef	200.69 ± 71.87 ab	3.75 ± 1.20 cd	35.25 ± 4.57	613.68 ± 88.61 a	707.14 ± 306.23 ab	1.90	2.74
PKG	20.93 ± 3.42 c	34.65 ± 3.15 c	6.00 ± 0.67 c	16.00 ± 6.14 c	6.38 ± 0.61 f	116.25 ± 50.89 c	2.28 ± 1.05 e	27.50 ± 8.23	558.17 ± 118.28 ab	644.64 ± 46.17 ab	2.17	3.07
POV	18.60 ± 5.14 d	29.83 ± 1.67 d	3.08 ± 1.01 d	15.38 ± 2.75 c	7.86 ± 0.95 bcd	5.40 ± 1.16 d	1.90 ± 0.51 e	-	-	-	-	-
PMV	16.65 ± 5.70 d	30.17 ± 4.48 d	2.50 ± 1.03 d	14.30 ± 5.46 cd	8.17 ± 0.54 abc	5.64 ± 4.36 d	2.04 ± 0.27 e	-	-	-	-	-
PKV	14.47 ± 3.98 e	25.60 ± 2.62 e	2.72 ± 1.02 d	8.38 ± 3.84 d	7.80 ± 0.69 bcd	3.67 ± 2.38 d	1.40 ± 0.51 e	-	-	-	-	-
JOG	26.90 ± 3.66 ab	41.50 ± 0.91 ab	9.50 ± 1.58 b	37.12 ± 1.59 a	9.09 ± 0.44 a	250.86 ± 12.86 a	5.39 ± 0.21 ab	32.75 ± 7.04	496.59 ± 38.28 ab	575.53 ± 83.07 b	2.12	2.30
JMG	27.33 ± 3.28 ab	41.75 ± 1.68 a	9.50 ± 2.20 b	38.95 ± 4.90 a	8.49 ± 0.98 ab	258.69 ± 69.63 a	5.84 ± 0.92 a	26.75 ± 7.68	464.46 ± 79.17 ab	556.07 ± 53.00 b	1.73	2.09
JKG	25.03 ± 3.50 b	35.10 ± 0.72 c	9.13 ± 3.66 b	27.19 ± 2.62 b	7.86 ± 0.43 bcd	175.77 ± 38.79 b	4.20 ± 1.04 bcd	29.50 ± 11.93	605.47 ± 252.39 a	640.35 ± 301.81 ab	1.77	2.68
JOV	28.15 ± 4.72 a	39.30 ± 1.85 ab	12.73 ± 2.83 a	36.60 ± 6.27 a	7.86 ± 0.52 bcd	225.83 ± 29.41 ab	5.26 ± 0.76 ab	35.00 ± 4.97	521.04 ± 66.60 ab	754.28 ± 102.10 ab	1.81	2.58
JMV	27.28 ± 4.64 ab	38.33 ± 4.54 abc	9.45 ± 0.78 b	37.39 ± 4.26 a	8.12 ± 0.82 a-d	187.89 ± 53.68 b	4.87 ± 1.24 abc	25.25 ± 4.79	427.51 ± 74.81 b	570.53 ± 100.08 b	1.71	2.26
JKV	26.38 ± 4.49 ab	34.35 ± 2.24 c	8.85 ± 2.11 b	36.01 ± 4.65 a	7.19 ± 0.48 c-f	210.46 ± 18.44 ab	4.98 ± 0.55 abc	29.75 ± 12.12	420.72 ± 54.79 b	475.89 ± 92.39 b	2.40	3.01

^a Različita slova označavaju statističku značajnost Dankanovog testa na nivou p<0.05

10.4. Prilog 4



Prolećni plot sadnje u 2009. godini



Jesenji plot sadnje u 2010. godini



Sveže cvetne glavice arnike

Osušene cvetne glavice arnike - *Arnicae flos*Malobrojne, ali krupne cvetne glavice
na VEG biljkama prolećne sadnje

Pun sklop na GEN biljkama prolećne sadnje

VEG - biljke razmnožene deobom bokora (klonski, vegetativno)

GEN - biljke razmnožene semenom (generativno)

10.5. Prilog 5



Podzemni organi arnike zajedno



Različite debljine korena



Veza rizoma i korena



Uzdužni presek rizoma



Rizomi različitih veličina

10.6. Prilog 6**Изјава о ауторству**

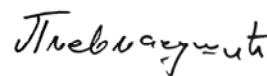
Потписани Дејан Пљевљакушић
број уписа 06/9

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај услова гајења на морфолошке и хемијске особине и биолошке ефекте екстракта *Arnica montana* L.,

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

Потпис докторанта

У Београду, 29.03.2012. године

10.7. Prilog 7**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Дејан Пљевљакушић
Број уписа 06/9
Студијски програм Воћарство и виноградарство - Помологија
Наслов рада „Утицај услова гајења на морфолошке и хемијске особине и биолошке ефекте екстракта *Arnica montana* L.“
Ментор Проф. др Зора Дајић Стевановић

Потписани Дејан Пљевљакушић

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

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

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

Потпис докторанта

Пљевљакушић

У Београду, 29.03.2012. године

10.8. Prilog 8**Изјава о коришћењу**

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

„Утицај услова гајења на морфолошке и хемијске особине и биолошке ефекте екстракта *Arnica montana* L.“, која је моје ауторско дело.

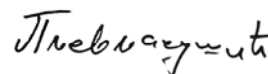
Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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.

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

Потпис докторанта

У Београду, 29.03.2012. године



11. BIOGRAFIJA AUTORA

Dejan (Stevan) Pljevljakušić rođen je 1975. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 1996/1997. godine na Odseku za ratarstvo, gde je diplomirao 2002. godine sa prosečnom ocenom ostvarenom u toku studija 8,17. Doktorske studije upisao je na studijskom programu Ekologija i agrotehnika lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja, školske 2006/2007 godine. Od 2003. godine uposlenik je Odseka za poljoprivredna istraživanja i razvoj Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, gde radi kao istraživač-saradnik. Kao koautor napisao je više naučnih radova od kojih su četiri publikovana u vrhunskim međunarodnim časopisima. Učestvovao je u realizaciji većeg broja naučnih projekata finansiranih od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj.