

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Датум: 26.09.2019. године

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Филипа Врањеша, мастер инжењера

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду бр. 32/10-8.3 од 25.09.2019. године именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације кандидата **Филипа Врањеша**, мастер инжењера под насловом „**Улога морфо-анатомске грађе у осетљивости *Chenopodium album L.* и *Abutilon theophrasti Medik.* према мезотриону**“. Комисија у саставу др Драгана Божић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду; др Сава Врбничанин, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Данијела Павловић, виши научни сарадник, Институт за заштиту биља и животну средину, Београд, др Драгана Ранчић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Веле Тешевић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, на основу прегледа докторске дисертације подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Филипа Врањеша написана је у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду, на 103 стране текста, укључујући 11 слика, 17 графика, 16 табела у тексту и 11 у прилогу, као и 190 литературних извора. Пре основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи седам основни поглавља: 1. Увод (стр.1-2), 2. Преглед литературе (стр. 3-23), 3. Материјал и методе (стр. 24-32), 4. Резултати (стр. 33-65), 5. Дискусија (стр. 66-79), 6. Закључак (стр. 80-81) и 7. Литература (стр. 82-103). На крају текста дисертације налазе се Прилози, Биографија, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу. Поголавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводном делу је указано да савремени концепт заштите биља подразумева примену интегралне заштите усева од штетних организама, укључујући и корове, али да је хемијско уништавање корова и даље најзаступљенији и најефикаснији начин њиховог сузбијања. Имајући у виду да је за ефикасно спровођење мера интегралне заштите неопходно добро познавање биологије усева, штетних организама и њихове интеракције са условима спољашње средине, осетљивост корова према хербицидима зависи од бројних абиотичких и биотичких фактора. У даљем тексту је указано на морфолошке карактеристике коровских врста *Chenopodium album* L. и *Abutilon theophrasti* Medik. које су значајне за усвајање хербицида, а тиме и за њихов ефекат у сузбијању. Такође, истакнуте су основне карактеристике хербицида мезотрион, који је подесан за сузбијање ових врста услед тога што је период његове примене у усеву кукуруза веома флексибилан, а наведене врсте одликује неуједначен и развучен период ницања. Даље је указано да се већ дуже време на тржиште не пласирају нови молекули хербицида, а нарочито не нови молекули са новим механизмом деловања, као и да хемијско сузбијање корова отежава развој резистентности популација корова према хербицидима. Наглашено је да све наведено намеће потребу за проучавањем биологије и екологије корова како би се та открића максимално искористила за повећање ефикасности постојећих хербицида.

Преглед литературе. Ово поглавље је подељено на девет потпоглавља, у којима су обрађени литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. У првом потпоглављу, ***Примена хербицида у савременој пољопривредној производњи***, дат је осврт на специфичности примене хербицида у савременој пољопривредној производњи које се огледају у настојањима да се смање количине примене и негативни ефекти по животну средину, као и да се спречи или бар одложи појава резистентности, услед чега се препоручује уништавање корова у складу са концептом интегралног сузбијања. У другом потпоглављу, ***Утицај различитих фактора на осетљивост корова према хербицидима***, дат је преглед абиотичких (светлост, температура, влажност ваздуха, падавине) и биотичких (дебљина кутикуле, присуство длака, физиолошко стање биљке, фенофаза развоја биљке) фактора, од којих зависи осетљивост корова према хербицидима. У трећем потпоглављу, ***Утицај фазе развоја на осетљивост корова према хербицидима***, дат је преглед претходних истраживања која су потврдила да осетљивост различитих коровских врста зависи од фазе развоја у време примене хербицида. У потпоглављу ***Утицај морфо-анатомске грађе листа на осетљивост корова према хербицидима***, указано је на морфо-анатомске карактеристике биљака које утичу на осетљивост према хербицидима, а у потпоглављу ***Утицај воскова листа на осетљивост корова према хербицидима*** дати су основни подаци о епикутуларним восковима листа, променама њихове дебљине и физичко-хемијских својстава са старењем листа и њиховој улози у усвајању хербицида. У шестом потпоглављу, ***Недеструктивне методе за испитивање реакција биљака према хербицидима***, дате су основне карактеристике три недеструктивне методе (очитавање реалтивног садржаја хлорофила SPAD-метром, очитавање параметара флуоресценције хлорофила и Раманова спектроскопија) које се могу користити за испитивање реакција биљака према хербицидима. У седмом потпоглављу, ***Chenopodium album* L.** и осмом потпоглављу, ***Abutilon theophrasti* Medik.**, дат је детаљан опис биологије, екологије и сузбијања врста *C. album* и *A. theophrasti*, а у потпоглављу ***Мезотрион***, основне карактеристике хербицида мезотрион.

Материјал и методе. Ово поглавље садржи три потпоглавља са седам поднаслова. У првом потпоглављу, *Биљни материјал*, дате су основне информације о семенском материјалу врста *C. album* и *A. theophrasti* и начину гајења биљака које су коришћене као почетни материјал за реализацију истраживања. У другом потпоглављу, *Хербицид*, дати су основни подаци о препарату Скаут. Потпоглавље *Методе* са седам поднаслова садржи детаљно описане методе коришћене у истраживањима. У овом потпоглављу описан је поступак испитивања ефеката препоручене количине ($120 \text{ g a.c. ha}^{-1}$) хербицида мезортион на биљке *C. album* и *A. theophrasti* у пет различитих фаза развоја. Ефекат је утврђен на основу редукције суве масе биљака у односу на нетретиране биљке исте фазе развоја. Биљке *C. album* и *A. theophrasti* у фази која се показала као најосетљивија према мезотриону (*C. album* - четири развијена листа; *A. theophrasti* - два развијена листа) су коришћене за утврђивање ефективних доза хербицида (ED_{50} , ED_{90} , ED_{95}) након примене шест различитих количина хербицида мезотрион (3,75; 7,5; 15; 30; 60 и $120 \text{ g a.c. ha}^{-1}$) на основу мерења суве масе, флуоресценције хлорофила и садржаја хлорофила. Садржај каротеноида у листовима третираних и контролних биљака *C. album* и *A. theophrasti* помоћу Раман спектрометра XploRA, очитаван је првог, другог, трећег и седмог дана након примене мезотриона. Добијени Раманови спектри су анализирани помоћу PCA analyze (*Principal Component Analysis*), а осим тога садржај каротеноида у листовима је одређен и спектрофотометријски након екстракције из листова. За проучавање анатомске грађе листови *C. album* и *A. theophrasti* су узети са различитих позиција на биљци (што симулира различите фазе развоја биљака) и коришћени за израду трајних микроскопских препарата за светлосну микроскопију. Са ових препарата мерени су следећи параметри: дебљина епидермиса лица и наличја листа, дебљина палисадног и сућерастог ткива, дебљина мезофила и укупна дебљина листа. Осим тога на листовима различите старости су анализирани површинске структуре и то број воштаних жлезда и стома на лицу и наличју листа *C. album*, односно броја длака и стома на лицу и наличју листа *A. theophrasti*. Промене хемијског састава епидукуларних воскова са старењем листова *C. album* и *A. theophrasti* су, такође, анализирани на листовима различите старости (*C. album* у фази десет, односно *A. theophrasti* у фази пет развијених листова) помоћу GC-FID и GC/MS анализе након екстракције у хексану, а компоненте су идентификоване поређењем EI масених спектра са спектрима из библиотека Wiley и NIST коришћењем софтвера NIST MS Search 2.0 и AMDIS, као и поређењем израчунатих ретенционих индекса са ретенционим индексима библиотека. Статистичка обрада података је урађена у софтверу STATISTICA 5.0 (*LSD* и *t* – тест, корелациона анализа) за сва испитивања изузев за утврђивање ефективних доза хербицида. За израчунавање ефективних доза хербицида коришћени су статистички софтвер R (R Development Core Team 2011) и *drc* пакет (Ritz and Streibig 2005), а подаци анализирани коришћењем логаритамског модела од три параметра (Knezevic et al. 2007).

Резултати. Резултати истраживања приказани су јасно и прегледно у шест потпоглавља са више поднаслова, уз прецизна текстуална тумачења, табеле, графике и слике.

У првом потпоглављу, *Осетљивост C. album и A. theophrasti према мезотриону у зависности од фазе развоја биљака*, приказани су резултати који, на основу редукције суве масе биљака, показују да се са старењем осетљивост испитиваних врста према препорученој количини мезотриона смањује. Реакције биљака *C. album* и *A. theophrasti* у

фази која се показала као најосетљивија према мезотриону (*C. album* – четири развијена листа; *A. theophrasti* – два развијена листа) су описане у потпоглављу **Реакције биљака *C. album* и *A. theophrasti* према мезотриону**. Ефективне дозе хербицида (ED₅₀, ED₉₀, ED₉₅) израчунате на основу редуције суве масе биљака, параметара флуоресценције хлорофила (маскимальни принос флуоресценције PSII - Fv / Fm; ефективни принос флуоресценције PSII - Ф_{PSII}) и параметара који се односе на садржај хлорофила (SPAD вредности; релативни садржај хлорофила- RSH) су показале да је сува маса најосетљивији параметар за утврђивање реакција биљака према мезотриону. Осим тога, показало се да су параметри флуоресценције хлорофила, такође, подесни за исту намену, док су параметри добијени читавањем помоћу хлорофилметра SPAD-502 (SPAD вредности и RSH) знатно мање осетљиви на утицај мезотриона. Процењене ефективне дозе за све параметре изузев параметара који се односе на садржај хлорофила су биле значајно ниже (ED₅₀, ED₉₀, ED₉₅: 0,56-84,62 g a.c. ha⁻¹, зависно од врсте и параметра) од препоручене количине примене за мезотрион (120 g a.c. ha⁻¹), што указује на могућност примене знатно ниже количине овог хербицида за сузбијање испитиваних врста. У потпоглављу **Утицај мезотриона на садржај каротеноида у листовима *C. album* и *A. theophrasti***, приказани су резултати читавања садржаја и састава каротеноида помоћу Рамановог спектрометра у листовима *C. album* и *A. theophrasti* након примене мезотриона, који су показали да се промене у садржају каротеноида овом методом могу детектовати пре него што се на листовима уоче јасни симптоми избељивања листова. Осим редуције укупног садржаја каротеноида (*C. album*: 32,69%; *A. theophrasti*: 19,36%) уочене су и промене у саставу каротеноида, при чему су као доминантне компоненте детектовани β-каротен и лутеин. У четвртом потпоглављу, **Анатомска грађа листа *C. album* и *A. theophrasti***, приказани су резултати анализе анатомске грађе листова *C. album* и *A. theophrasti* различите старости (листови са пет различитих позиција на биљци, што симулира различите фазе развоја биљака), који су потврдили да се са старењем листова дебљина параметара анатомске грађе (дебљина епидермиса лица и наличја листа, дебљина палисадног и суђерастог ткива, дебљина мезофила и укупна дебљина листа) повећава, док је за површинске структуре листа (*C. album*: број воштаних жлезда и стома на лицу и наличју листа; *A. theophrasti*: броја длака и стома на лицу и наличју листа) утврђено да се са старењем, односно са развојем листова смањује број ових параметара по јединици површине листа (потпоглавље **Површинске структуре листа *C. album* и *A. theophrasti***). Осим тога, све мерене површинске структуре листа биле су бројније на наличју него на лицу листа у свим анализираним фазама. У потпоглављу **Епикутикуларни воскови листа *C. album* и *A. theophrasti***, приказана је анализа епикутикуларних воскова листа, при чему је утврђено да је удео епикутикуларних воскова у листовима *C. album* био највећи у најстаријим, а најмањи у најмлађим листовима, док су код *A. theophrasti* разлике између листова различите старости биле мање изражене, при чему је удео воскова био најмањи у најстаријим листовима. Анализом хемијског састава који укључује већи број једињења из класа алдехиди, алкани, алкохоли, естри, етри, кетони, стероли, тритерпени, масне киселине, лактони и витамин Е, потвђено је да се са старењем листова мења састав воскова.

Дискусија. Дискусија је подељена на шест потпоглавља, где су дата прецизна тумачења добијених резултата. У првом потпоглављу, **Осетљивост *C. album* и *A. theophrasti* према мезотриону у зависности од фазе развоја биљака**, дискутован је утицај фазе развоја испитиваних врста у време примене мезотриона на њихову осетљивост према овом хербициду. Установљено је да се са старењем биљака смањује њихова

осетљивост, што је у претходним истраживањима потврђено и за друге коровске врсте и хербициде. У оквиру потпоглавља **Реакције биљака *C. album* и *A. theophrasti* према мезотриону** дискутоване су реакције биљака наведених врста према овом хербициду на основу редукције суве масе биљака, параметара флуоресценције хлорофила и параметара који се односе на садржај хлорофила. Утврђене ефективне дозе мезотриона (ED_{50} , ED_{90} , ED_{95}) су показале да постоји могућност смањења количине његове примене испод препоручене, што је већ потврђено и за популације ових врста из других делова света. Иако се сува маса показала као најосетљивији параметар за процену реакција биљака према мезотриону, недеструктивне методе засноване на читавању флуоресценције хлорофила могу бити значајан алат за утврђивање реакција биљака према овом хербициду, услед тога што је његов механизам деловања повезан са нарушавањем процеса фотосинтезе услед смањења биосинтезе каротеноида. Предност ове методе је што омогућава процену осетљивости биљака на хербицид у кратком року након његове примене и не захтева жртвовање биљака, тако да се на истим биљкама могу пратити и други параметри. У трећем потпоглављу су дискутоване могућности примене Раманове спектроскопије за недеструктивно праћење промена у садржају каротеноида након примене мезотриона пре него што се уоче јасни симптоми његовог деловања. У потпоглављу **Улога анатомске грађе листа у осетљивости *C. album* и *A. theophrasti* према мезотриону** дискутовани су резултати који показују да се са старењем листова повећава дебљина параметара анатомске грађе листа испитиваних врста, али је корелација између дебљине ових параметара и старости листа ниска. Насупрот томе веза између осетљивости биљака према мезотриону и површинских структура листа је израженија (потпоглавље **Улога површинских структура листа у осетљивости *C. album* и *A. theophrasti* према мезотриону**), при чему се смањење осетљивости према хербицидима са старењем биљака може присписати смањењу броја стома по јединици површине, услед чега долази до смањења усвајања хербицида. Са старењем листова мења се садржај и дебљина епикутуларних воскова листа који такође имају улогу у усвајању хербицида, а познавање њихове грађе и састава може бити искоришћено за правилан одабир ађуваната, захваљујући чему се може смањити количина примене хербицида без смањења њихове ефикасности (потпоглавље **Улога епикутуларних воскова листа у осетљивости *C. album* и *A. theophrasti* према мезотриону**).

Закључак. На основу добијених резултата и њихове дискусије кандидат је правилно извео закључке који у потпуности произилазе из добијених резултата. Најбољи ефекат у сузбијању *C. album* и *A. theophrasti* применом хербицида мезотрион се може постићи у млађим развојним стадијумима (фазе два до четири листа *C. album*; један до два листа *A. theophrasti*), док у случају примене у каснијим фазама развоја долази до значајног смањења осетљивости ових коровских врста. Уколико се мезотрион примењује у раним фазама раста ове две врсте корова су веома осетљиве и на примену мање количине од препоручене, при чему је количина мања од $50 \text{ g a.c. ha}^{-1}$ довољна за постизање ED_{95} када је *C. album* у фази четири листа и *A. theophrasti* у фази два листа, што представља значајно смањење у односу на препоручену максималну количину примене од $120 \text{ g a.c. ha}^{-1}$. Од свих параметара укључених у истраживање, сува маса је најосетљивији параметар за утврђивање реакције биљака према хербициду мезотрион, а осим тога недеструктивне методе за читавање флуоресценције хлорофила и садржаја каротеноида омогућавају праћење промена у биљкама након примене хербицида без потребе да се биљке жртвују.

Овим методама се промене које је хербицид изазвао у биљци могу детектовати пре него што симптоми на биљкама буду јасно видљиви. Очитавања SPAD вредности су показала да ово није подесна метода услед знатно мање осетљивости у поређењу са другим недеструктивним методама. Услед тога што је механизам деловања мезотриона усмерен на смањење садржаја каротеноида у листовима третираних биљака, одређивање садржаја каротеноида помоћу Раманове спектроскопије, у комбинацији са РСА анализом, може да се користи као аналитичка техника за раздвајање нетретираних и биљака третираних мезотрионом. Са старењем листова *C. album* и *A. theophrasti* мења се њихова анатомска грађа, број површинских структура листа и садржај епикутуларних воскова, што се може довести у везу са променама у осетљивости биљака према хербицидима. На основу свих анализираних параметара, може се закључити да осетљивост коровских врста *C. album* и *A. theophrasti* према мезотриону зависи од фазе развоја биљака у моменту примене хербицида. То се објашњава променама у морфо-анатомској грађи листова до којих долази током развоја биљака, тј. променама у дебљини ткива листа, присуству стома и длака на листовима и саставу епикутуларних воскова. Захваљујући већој осетљивости биљака у раним фазама развоја, за постизање високог нивоа редукције анализираних параметара (суве масе, флуоресценције хлорофила и садржаја каротеноида) код *C. album* и *A. theophrasti* довољне су знатно ниже количине мезотриона од препоручених.

Литература. У дисертацији је на правилан начин цитирано 190 литературних извора, који су актуелни и у потпуности одговарају проблематици која је проучавана у дисертацији.

Прилози. Прилози садрже 11 табела, у којима су приказани додатни подаци који доприносе бољем разумевању ове дисертације

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Филипа Врањеша, мастер инжењера, под насловом „Улога морфо-анатомске грађе у осетљивости *Chenopodium album* L. и *Abutilon theophrasti* Medik. према мезотриону“, представља оригиналан научни рад, који је у сагласности са одобреним планом и програмом за израду дисертације. Добијени резултати у потпуности одговарају постављеним циљевима и представљају значајан допринос за науку и струку. Допринос ове дисертације састоји се у томе што су егзактно утврђени: (1) осетљивост *C. album* и *A. theophrasti* према хербициду мезотрион у различитим фазама почетног развоја биљака; (2) ефективне дозе (ED_{50} , ED_{90} и ED_{95}) мезотриона у односу на *C. album* и *A. theophrasti* у фази која се показала као најосетљивија и најподеснија за примену овог хербицида и (3) могућност употребе недеструктивних и брзих метода (очитавање релативног садржаја хлорофила помоћу хлорофилметра Minolta SPAD-502, флуоресценције хлорофила помоћу флуориметра РАМ-2100 и садржаја каротеноида помоћу RAMAN-ове спектроскопије) за утврђивање реакција биљака према мезотриону; (4) анатомске и морфолошке промене листова са старењем *C. album* и *A. theophrasti* и њихова улога у осетљивости ових биљака према мезотриону и 5) квалитивне и квантитативне промене епикутуларних воскова са старењем листова *C. album* и *A. theophrasti* и њихова улога у осетљивости ових биљака према мезотриону. Истраживања ове врсте су први пут реализована у нашој земљи, а таквих је веома мало и у свету, тако да резултати ове докторске дисертације дају значајан

допринос унапређењу сузбијања широколисних корова, а пре свега *C. album* и *A. theophrasti* помоћу мезотриона. Такође, дају и значајан допринос у расветљавању улоге фазе развоја биљака, морфо-анатомске грађе листова и квантитативног и квалитативног састава епидурикуларних воскова листа у испољавању осетљивости биљака према овом хербициду. Осим тога, допринос се огледа и у сагледавању могућности примене брзих недеструктивних метода за утврђивање реакција биљака на хербициде инхибиторе биосинтезе каротеноида, а нарочито примене Раманове спектроскопије која је до сада врло мало коришћена у испитивању интеракција корова и хербицида.

Имајући у виду напред наведено, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Филипа Врањеша, мастер инжењера, под насловом „Улога морфо-анатомске грађе у осетљивости *Chenopodium album* L. и *Abutilon theophrasti* Medik. према мезотриону“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да усвоји позитивну оцену ове докторске дисертације и тиме омогући кандидату да је јавно брани.

Чланови Комисије:

др Драгана Божић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Хербологија)

др Сава Врбничанин, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Хербологија)

др Данијела Павловић, виши научни сарадник
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд
(ужа научна дисциплина: Хербологија)

др Драгана Ранчић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Пољопривредна ботаника)

др Веле Тешевић, редовни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет
(ужа научна област: Органска хемија)

Прилог:

Објављен рад Филипа Врањеша, мастер инжењера, у научном часопису на SCI листи:

Vranjes F., Vrbnicanin S., Nedeljkovic D., Savic A., Bozic D. (2019): Response of *Chenopodium album* L. and *Abutilon theophrasti* Medik. to reduced doses of mesotrione. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 54(7): 615-621.

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Датум: 26.09.2019.

Након прегледа извештаја о провери оригиналности, достављеног од стране Универзитетске библиотеке, а на основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, који се примењује од 01.10.2018. године, ментор докторске дисертације кандидата Филипа Врањеша, мастер инжењера, под насловом: „**Улога морфо-анатомске грађе у осетљивости *Chenopodium album* L. и *Abutilon theophrasti* Medik. према мезотриону**“, доноси следећу

ОЦЕНУ

Извештај Универзитетске библиотеке о провери оригиналности докторске дисертације под насловом: „**Улога морфо-анатомске грађе у осетљивости *Chenopodium album* L. и *Abutilon theophrasti* Medik. према мезотриону**“, кандидата Филипа Врањеша, мастер инжењера, указује да је поменута дисертација оригинални научни рад кандидата, те да се, у складу с тим, прописани поступак за њену одбрану може наставити.

Ментор:

др Драгана Божић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област - Хербологија)