

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

На II редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13. 11. 2023. године, на основу молбе ментора, др Светлане Радовић, редовног професора Универзитета у Београду - Биолошког факултета и др Милице Богдановић, вишег научног сарадника, Универзитета у Београду - Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију (у даљем тексту ИБИСС), одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Катарине Б. Ћуковић, истраживача сарадника ИБИСС, под насловом: „Идентификација и анализа експресије гена укључених у соматску ембриогенезу кичице (*Centaurium erythraea Rafn.*)“, у саставу:

1. др Слађана Тодоровић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Институт од националног значаја за Републику Србију,
2. др Душица Јаношевић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет,
3. др Тијана Цветић Антић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата/кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација Катарине Б. Ћуковић под насловом „Идентификација и анализа експресије гена укључених у соматску ембриогенезу кичице (*Centaurium erythraea Rafn.*)“ садржи укупно 183 стране и састоји се од следећих поглавља: Увод (стр. 1-23), Циљеви рада (стр. 24), Материјал и методе (стр. 25-53), Резултати (стр. 54-110), Дискусија (стр. 111-138), Закључци (стр. 139), Литература (стр. 140-175) и Прилози (стр. 176-183). Додатно, докторска дисертација садржи насловну страницу на српском и енглеском језику, информације о менторима и члановима комисије, захвалницу, сажетак дисертације на српском и енглеском језику са кључним речима, листу скраћеница и

садржај. На крају дисертације приложени су следећи документи: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна). Докторска дисертација садржи укупно 66 слика (13 у поглављу Увод, 7 у поглављу Материјал и методе и 46 у поглављу Резултати) и 36 табела (19 у поглављу Материјал и методе и 17 у поглављу Резултати). Поглавље Литература садржи 558 цитата.

## Анализа докторске дисертације

Докторска дисертација **Катарине Б. Ђуковић** припада области физиологије и молекуларне биологије биљака.

Предмет истраживања ове докторске дисертације је идентификација и анализа експресије гена са потенцијалном улогом током соматске ембриогенезе (СЕ) код кичице, *in silico* анализа одабраног генског кандидата, као и успостављање система за секундарну, односно цикличну соматску ембриогенезу код кичице.

У поглављу **УВОД** кандидаткиња је кроз десет потпоглавља систематично дала преглед литературних података који сумирају релевантна истраживања за предмет своје докторске дисертације. У првом потпоглављу под насловом „**Регенерација биљака *in vitro***“, кандидаткиња је објаснила основу процеса регенерације биљака, факторе који утичу на овај процес, као и методе регенерације биљака *in vitro*. У посебном делу потпоглавља, „**Соматска ембриогенеза**“, пружен је детаљан преглед процеса соматске ембриогенезе, њених фаза, индукције са различитом биотехнолошком применом. У наредном потпоглављу, насловљеном „**Аспекти биосинтезе, транспорта, разградње и сигналних путева ауксина**“, дат је детаљан преглед улоге ауксина у биљкама, метаболизма и механизма регулације одговора. У трећем потпоглављу под насловом „**Ефекат ауксина на индукцију соматске ембриогенезе**“, кандидаткиња је обрадила улогу ауксина у процесу соматске ембриогенезе, укључујући његову функцију у формирању ембриона, и утицај на експресију гена у одговору на стрес. У посебном делу потпоглавља, названом „**Ефекат екзогене примене ауксина**“, објашњен је утицај употребе ауксина у култури *in vitro* на нивое ендогених ауксина, метаболизам индол-сирћетне киселине у ћелијама, експресију гена повезану са секундарном ембриогенезом. Такође је размотрен утицај синтетичких ауксина, укључујући 2,4-дихлорфеноксисирћетне киселине, на индукцију соматских ембриона. У четвртном потпоглављу описан је утицај регулатора растења биљака на експресију гена за транскрипционе факторе повезане са соматском ембриогенезом и молекуларне процесе укључене у ту регулацију, разматрајући улогу различитих гена за транскрипционе факторе и некодирајућих РНК, као и њихове интеракције у регулацији соматске ембриогенезе у различитим биљним врстама. У потпоглављу „**Епигенетичка регулација соматске ембриогенезе**“ кандидаткиња је описала епигенетичке модификације као што су метилација ДНК, модификације хистона и

ремоделирање хроматина, у различитим фазама развића биљака. У потпоглављу насловљеном „**Употреба функционалне геномике у циљу идентификације нових биљних гена**“ размотрен је значај секвенцирања генома модел организма *Arabidopsis thaliana* за развој биљне геномике, као и еволуција технологија секвенцирања. У потпоглављу „**Некодирајуће РНК и РНК интерференција**“ кандидакиња је описала различите класе некодирајућих РНК молекула, као што су рРНК, тРНК, мале нуклеусне РНК, мале нуклеолусне РНК и дугачке некодирајуће РНК, њихову улогу у синтези протеина и модификацијама РНК. Такође, описан је процес РНК интерференције и њена примена у истраживању функције гена и биотехнологији. У потпоглављу „**Gateway клонирање ради прављења генских конструката**“ сажето је описана технологија клонирања *Gateway*, која се ослања на реакције рекомбинације *att* места и омогућава истраживачима да лако клонирају своје жељене ДНК секвенце у векторе за ефикасан процес трансформације биљака. У наредном потпоглављу насловљеном „**Опште одлике *Centaurium erythraea Rafn.***“ описани су различити аспекти биљке рода *Centaurium*, укључујући њену морфологију, еколошку дистрибуцију, традиционалну употребу у медицини, фитохемијски састав и својства, као и потребу за очувањем природних популација ове биљке и развојем *in vitro* техника за масовну пропацију ради одрживе употребе и истраживања. У последњем потпоглављу **УВОДА** названом „**Истраживања соматске ембриогенезе код кичице**“ описани су литературни подаци у вези са досадашњим истраживањима соматске ембриогенезе код кичице.

У поглављу **ЦИЉ РАДА** кандидаткиња је јасно дефинисала циљеве: а) идентификација и анализа гена активних током соматске ембриогенезе кичице; б) секвенцирање, *de novo* реконструкција и функционална анотација транскриптома *C. erythraea*; в) одабир секвенци потенцијалних гена маркера из *de novo* транскриптома; г) идентификација диференцијално експримираних гена у различитим ткивима и стадијумима соматске ембриогенезе; д) евалуација утицаја генотипа на регенеративну способност ембриогеног калуса и експресије одабраних гена у ембрионом ткиву генотипова са различитом регенеративном способношћу; ђ) успостављање система за индукцију секундарне или цикличне соматске ембриогенезе. е) конструкција вектора за утишавање одабраног гена; ж) *in silico* карактеризација одабраног гена и његових протеинских продуката.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** кандидаткиња је описала технике *in vitro* културе, као и разноврсне молекуларно-биолошке и биоинформатичке методе које је користила у току израде докторске дисертације. Описан је процес стерилизације семена и гајења биљака у контролисаним условима ради покретања *in vitro* културе. Такође, описано је формирање колекције од 16 ткива и органа кичице, која је обухватала, како ткива индукована *in vitro* (укључујући органогена и ембриогена ткива), тако и органе цветалих биљака из природе. Додатно, по први пут је развијен и детаљно описан протокол за индукцију секундарне, односно цикличне секундарне ембриогенезе кичице, уз употребу

одговарајућих комбинација концентрација 2,4-дихлорфеноксисирћетне киселине и *N*-фенил-*N'*-(2-хлоро-4-пиридил) урее, а секундарни соматски ембриони су додатно хистолошки анализирани уз проверу клијавости. Ембриогена ткива, адвентивни пупољци, лист и корен розетастих биљака су подвргнути *RNA-seq* анализи која је обављена од стране компаније *Genomix4Life* (Салерно, Италија). Описане су биоинформатичке методе којима је анализиран обједињени, референтни транскриптом. Транскрипти су квантификовани у виду *FPKM* вредности помоћу *RSEM* софтвера, а транскриптом је функционално аотиран према *NCBI nt*, *Swissprot* и *PFAM* базама података са обogaћивањем према *KOG* и *GO* базама. За проналазак диференцијално експримираних гена током секундарне ембриогенезе коришћени су и приказани посебно осмишљени критеријуми везани за *FPKM* вредности на основу којих је издвојено 17 потенцијалних гена маркера соматске ембриогенезе. За успостављање *cDNK* колекције ткива и органа, кандидаткиња је користила палету молекуларно-биолошких метода као што су изолација РНК, третман дезоксирибонуклеазом, реверзна транскрипција, *end point PCR* (енгл. „*Polymerase chain reaction*“) и електрофореза на агарозном гелу. Објашњен је поступак дизајнирања прајмера за *housekeeping* и диференцијално експримиране гене и дате су њихове секвенце. Експресија ових гена евалуирана је методом квантитативног *RT-qPCR*-а у реалном времену. У анализи резултата *RT-qPCR* експеримената је коришћена релативна квантификација. За поступке клонирања коришћени су вектори *pRS300*, *pDONR221* и *pK7WG2D,1*. Могуће *amiRNA* секвенце су дизајниране на *WMD* веб-платформи, а најспецифичније за секвенцу транскрипта *CeNA1* су одабране помоћу *R* програмског језика. За конструкцију *amiRNA* фрагмената конструката коришћена је метода преклапајућих *PCR* реакција, за коју су наведене секвенце прајмера. Такође, ради примене у експериментима клонирања и припреме стандарда за *RT-qPCR* реакције коришћена је метода изолације ДНК производа из агарозног гела. Одговарајући продукти *PCR* реакција су путем *Gateway*<sup>®</sup> технологије убачени у *pK7WG2D,1* циљни вектор за трансформацију биљака. Бактерије су трансформисане методом електропорације, а за проверу бактеријских колонија након трансформације коришћена је метода колонијског *PCR*. Секвенце гена, протеина и промотора добијене су након секвенцирања генома кичице из листова младих биљака. Сличности у секвенцама међу генима и протеинима у оквиру *CeNA1* фамилије одређене су *in silico* помоћу *UniProt Align* алата. Могући распоред егзона, интрона и нетранслирајућих секвенци *CeNA1* гена, предиктован је помоћу *GSDS* софтвера. За издвајање промоторских секвенци у генима *CeNA1* коришћени су *Biostrings*, *rtracklayer* и *BSgenome* алати за манипулисање генским секвенцама у оквиру *R* пакета *BiocManager*. Везивна места и фамилије транскрипционих фактора који се могу везати за специфичне мотиве у *CeNA1* промоторима идентификовани су *in silico* помоћу софтвера *PlantRegMap*. Анализом протеина *CeNA1* комбинацијом различитих софтвера (*TargetP2* (верзија 2.0), *Cello* (верзија 2.0), *DeepLoc* (верзија 1.0) и *Light Attention* (верзија 1.0)) идентификовани су транзитни пептиди на *N*-терминусу, потенцијална унутарћелијска локализација протеина и везаност за ћелијску мембрану. Тродимензионална терцијарна структура протеина *CeNA1*

је предиктована помоћу софтвера *AlphaFold* (верзија 1.5) и визуелизована помоћу *UCSF ChimeraX* (верзија 1.5).

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** налази се осам потпоглавља у којима је кандидаткиња представила резултате својих истраживања. У потпоглављу „**Успостављање колекције ткива и органа кичице**“ илустративно је приказана колекција различитих развојних фаза кичице коју чини 16 органа и ткива биљака гајених *in vitro* и из природе. У другом потпоглављу названом „**Секвенцирање транскриптома *C. erythraea* Rafn.**“ истакнути су најважнији резултати секвенцирања и састављања транскриптома. Преко 30 милиона „сирових“ читавања по узорку прошло је кроз процес филтрирања, резултујући са укупно око 200 милиона „чистих“ читавања. *De novo* састављен транскриптом састојао се од 160839 транскрипата груписаних у 105726 гена, са високом прецизношћу и квалитетом секвенци. Анализа *BUSCO* показала је да је 94,9% комплетних гена карактеристичних за биљке било присутно у транскриптому кичице. Дистрибуција нивоа експресије у транскриптима показује сличне профиле *FPKM* за транскрипте са и без предвиђеног отвореног оквира читања (ОРФ, енгл. „*Open Reading Frame*“). Представљени су резултати упоређивања транскриптата са *NCBI nt* базом података, док је предвиђени протеом аотиран мапирањем према *Swissprot (NCBI nr)*, *KOG* и *PFAM30* базама података. Велики број функционално аотираних транскриптата уочен је у свим анализираним базама података, са преко 58,8% транскриптата идентификованих у најмање једној бази. *PFAM* домени протеома кичице су показали значајну варијабилност, са честим присуством протеин киназних домена и домена са пентатрикоепептидним понављањима. Класификација транскриптата на основу *KOG* базе података ортолога је открила више од 25 функционалних категорија, при чему је највећи број сврстан у категорију „Општа функција“ (3,67% транскриптата). Такође, укупно 75485 транскриптата је добило свој *GO* термин. У потпоглављу „**Избор адекватних референтних гена у различитим фазама развоја кичице**“ кандидаткиња је представила резултате анализе експресије 11 често коришћених *housekeeping* гена чије су секвенце пронађене у транскриптому кичице. Резултати су показали да гени за рибозомални протеин *L2 (RPL2)* и ТАТА-везујући протеин (*TBP1*) показују најстабилнију експресију у различитим групама узорака, док су гени за гвожђе-супероксид дисмутаза 2 (*Fe-SOD2*) и 18S РНК (*18S rRNA*) показали најнестабилнију експресију. Резултати *geNorm* и *NormFinder* алгоритама показали су да је *RPL2* један од најстабилнијих гена у свим групама узорака, док се *TBP1* такође показао као стабилан ген у већини група узорака. У наредном потпоглављу кандидаткиња је представила поступак идентификације гена са диференцијалном експресијом током органогенезе и соматске ембриогенезе у транскриптому и евалуацију њихове експресије у колекцији различитих развојних фаза кичице. Кроз пажљиво планирано филтрирање, издвојено је седам група гена са укупно 16748 погодака. Највећи број гена са диференцијалном експресијом пронађен је у листовима и кореновима розете. Што се тиче ембриогених ткива, највећи број гена са диференцијалном експресијом припада раној фази формирања соматских ембриона. Уочено је да се неки гени преклапају између различитих

услова, а највише јединствених гена (1439) пронађено је током ране фазе формирања соматских ембриона. Кандидаткиња је користећи информације из различитих база података, укључујући *SwissProt*, *nt*, *Pfam* и *GO* анотације транскриптома, заједно са анализом одговарајуће литературе, идентификовала 17 потенцијалних молекуларних маркера соматске ембриогенезе у транскриптому кичице. Међу идентификованим генима, откривено је осам гена који представљају добро познате маркере соматске ембриогенезе (*CeSERK1* и *CeSERK*), гене повезане са синтезом, метаболизмом и сигналним путевима ауксина (*CeTAR1*, *CeYUC7*, *CeGH3.6*, *CeIAA32* и *CeAGL65-like*), као и ген повезан са синтезом етилена (*CeACS3*). Поред ових гена који су већ били повезани са соматском ембриогенезом у другим врстама, кандидаткиња је идентификовала девет кандидата који су специфично активни током соматске ембриогенезе у кичици. Међу њима су гени као што су *CeRNS3*, *CeDC2.15-like* и *CeGRP3-like* (који кодирају протеине богате пролином и глицином), *CePR10* и *CeTLP1-like* (протеини одбране), *CePCC13-62-like* (учествује у процесу десикације), и три кандидата који немају доступну анотацију, али показују диференцијалну експресију током соматске ембриогенезе (*CeNA1*, *CeNA2* и *CeNA4*). У даљем тексту кандидаткиња описује резултате експерименталне потврде диференцијалне експресије гена који су претходно одабрани путем *in silico* анализе *RNA-seq* података. Детаљно је описан експресиони профил сваког од испитиваних гена у различитим ткивима, укључујући и узорке из природе, и наведена је статистичка значајност промена у експресији. Такође је приказана топлотна мапа на којој су визуелно представљене корелације између релативне експресије гена и различитих узорака ткива. Показано је да већина испитиваних гена показује сличан образац експресије као у *RNA-seq* анализи, иако су постојала одступања код одређених гена. Ово додатно потврђује улогу ових гена у процесу соматске ембриогенезе у кичици. Утврђено је да ген *CeNA1* (*ID:TR23240|c0\_g1\_i1*) показује високу и диференцијалну експресију током соматске ембриогенезе. Овај ген је био значајно експримиран у свим ембрионим ткивима у поређењу са контролним узорком листа розете. Најупечатљивија промена била је у ембрионом калусу, где је експресија *CeNA1* била више од милион пута већа у односу на контролу. Овај резултат наглашава улогу гена *CeNA1* током ране фазе соматске ембриогенезе код кичице. У потпоглављу „**Секундарна и циклична соматска ембриогенеза код *C. erythraea***“ кандидаткиња је представила резултате везане за индукцију секундарне и цикличне соматске ембриогенезе код кичице. Тако је показано да се добро развијени примарни ембриони у котиледонарном стадијуму који су се формирали на МС (*Murashige&Skoog*) подлози са додатком  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-дихлорфеноксисирћетне киселине и  $0,25 \text{ mg l}^{-1}$  *N*-фенил-*N'*-(2-хлоро-4-пиридил) урее, могу користити као примарни експлантати за индукцију секундарне соматске ембриогенезе на подлози са различитим концентрацијама 2,4-дихлорфеноксисирћетне киселине и *N*-фенил-*N'*-(2-хлоро-4-пиридил) урее. Секундарни соматски ембриони су се формирали на примарним експлантатима котиледонарних ембриона како индиректно, из ембрионог калуса, тако и директно на експлантату. Додатно, детаљно је илустрована морфолошка и хистолошка

карактеризација секундарних соматских ембриона. Утврђено је да је *N*-фенил-*N'*-(2-хлоро-4-пиридил) уреа неопходан за генерисање ембриогеног калуса, при чему се највећи број експлантата са ембриогеним калусом и секундарним ембрионима формирао на концентрацији од  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  *N*-фенил-*N'*-(2-хлоро-4-пиридил) уреа. Такође, показано је да концентрација регулатора растења биљака у подлози утиче на морфологију секундарних ембриона, при чему се на концентрацији  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-дихлорфеноксисирћетне киселине и  $0,25 \text{ mg l}^{-1}$  *N*-фенил-*N'*-(2-хлоро-4-пиридил) уреа индукује појава ембриона правилне морфологије. Ови секундарни ембриони су стављени на клијање на подлогу без регулатора раста, где је већина проклијалих ембриона на светлости имала добро развијене изданке а неки од њих су формирали коренове. Како би се испитало да ли соматска ембриогенеза може да се настави кроз више циклуса, тестиране су две комбинације:  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-дихлорфеноксисирћетне киселине и  $0,25 \text{ mg l}^{-1}$  *N*-фенил-*N'*-(2-хлоро-4-пиридил) уреа и  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-дихлорфеноксисирћетне киселине и  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  *N*-фенил-*N'*-(2-хлоро-4-пиридил) уреа и утврђено је да је соматска ембриогенеза на нижој концентрацији могла напредовати кроз три циклуса, док су само два циклуса била могућа на вишој концентрацији. Такође је испитан утицај циклуса секундарне соматске ембриогенезе и састава подлоге на индукцију калуса и секундарних ембриона на експлантатима када је утврђено да се број комплетно формираних ембриона у котиледонарној фази драстично смањило са прогресијом циклуса и при нижим и вишим концентрацијама регулатора растења биљака. Експресија *CeNA1* гена у ембриогеном ткиву на подлози са  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-дихлорфеноксисирћетне киселине и  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  *N*-фенил-*N'*-(2-хлоро-4-пиридил) уреа показује статистички значајан пораст приликом транзиције из примарне у први циклус секундарне соматске ембриогенезе, а затим се не мења значајније кроз циклусе. У потпоглављу „Евалуација утицаја генотипа на регенеративну способност ембриогеног калуса и експресије одабраних гена у ембриогеном ткиву генотипова са различитом регенеративном способношћу“ анализиран је потенцијал различитих генотипова кичице за формирање соматских ембриона током соматске ембриогенезе. Откривено је да генотипови различито реагују на индукцију соматске ембриогенезе – док су неки генотипови показали високу способност за формирање великог броја соматских ембриона у котиледонарном стадијуму, други су имали мање или готово никакву способност за формирање ембриона током истог временског периода. Број ембриона формираних на експлантатима листова био је веома варијабилан међу генотиповима и кретао се у распону од 1 до 30 ембриона по експлантату. Генотипови су према томе подељени у три категорије: висок капацитет за формирање ембриона (7-30 ембриона по експлантату), средњи капацитет (1,5-7) и ниски капацитет (мање од 1,5 ембриона по експлантату). Након тога, анализирана је експресија одабраних гена у генотиповима са ниским и високим потенцијалом за формирање ембриона. Уочено је да је експресија већине гена била обрнуто корелисана са диференцираношћу ембриогеног ткива, при чему је ниска диференцираност повезана са повећаном експресијом гена. Најизраженији пад у експресији запажен је код гена *CeNA1*, док се код неколико других гена приметно

статистички значајан пад експресије са повећањем броја ембриона. Ипак, код неколико испитиваних гена, укључујући *CePRI0*, *CeGRP3-like* и *CePCC13-62-like*, уочен је раст њихове експресије са порастом броја секундарних ембриона, мада овај тренд није био статистички значајан. У наредном потпоглављу „**Клонирање *CeNA1* *amiRNA* конструката**“ кандидаткиња је детаљно представила резултате дизајнирања *amiRNA* секвенце и конструкције вектора за утишавање *CeNA1* гена. *AmiRNA* секвенце специфичне за транскрипт *CeNA1* су предвиђене на *WMD3* веб-сајту, а затим оптимизоване како би биле што специфичније за *CeNA1*. Након *Gateway BP* реакције, када су добијени улазни клонови са *CeNA1* *amiRNA* инсертима, по шест колонија од обе *amiRNA* је послато на секвенцирање ради провере тачности клонирања, а резултати секвенцирања су потврдили успешну интеграцију обе *amiRNA* у вектор у свим колонијама. Након комплетирања реакција клонирања, целокупни *amiRNA* конструкт је убачен у *Gateway* циљни вектор *pK7WG2D,1*, који је из *E. coli* пребачен у *Agrobacterium tumefaciens*, што омогућава генетичку трансформацију биљака кичице и представља основу за даље истраживање функције гена *CeNA1* у процесу соматске ембриогенезе. У последњем потпоглављу **РЕЗУЛТАТА „*In silico* анализа гена и протеина *CeNA1*“** описане су предвиђене карактеристике гена и промотора *CeNA1*, идентификоване су фамилије транскрипционих фактора које се за њих везују и анализирани структуре протеина коришћењем података секвенцираног генома кичице. Мапирањем секвенце *CeNA1* транскрипта на геном откривено је постојање 11 *CeNA1* гена (са префиксом „Fungi\_“) различите дужине на контигу 96S. Анализом секвенци седам гена са интактним ОРФ-ом утврђено је да показују високу сличност (71,07%) и најчешће садрже два егзона раздвојена једним интроном. Функционалне анотације за ове гене нису уједначене и не указују на сличност са биљним врстама, већ са гљивама, људима, пацовима и вирусима, што доводи у питање њихову поузданост, и сугерише да су у питању гени до сада непознати за биљке. Анализа промоторских региона за седам *CeNA1* гена са ОРФ-ом открила је могућност везивања транскрипционих фактора из осам различитих фамилија, са варијабилним бројем везних места за сваки промотор. Промотори Fungi\_00002829 и Fungi\_00002830 имају већи број места за везивање транскрипционих фактора у односу на остале хомологе. Протеинске секвенце изведене из гена и транскрипта *CeNA1* су релативно кратке, већином око 100 аминокиселина, са изузетком Fungi\_00002828 који има дужи ланац од око 194 аминокиселине. Филогенетска анализа је показала висок степен сличности између транскрипта TR23240|c0\_g1\_i1 и гена Fungi\_00002824 и Fungi\_00002826, са 99% сличности, при чему се разликују само у једној аминокиселини, валину уместо изолеуцина. Fungi\_00002824 и Fungi\_00002826 кодирају идентичне протеинске секвенце. *In silico* предикцијом *N*-терминалног пептида и унутарћелијске локализације протеинских хомолога *CeNA1* утврђено је да сви протеини *CeNA1* садрже сигнални пептид на *N*-термину и претпостављено припадају екстрацелуларним протеинима и да су сви солубилни. Представници групе *CeNA1* протеина имају различите претпостављене терцијарне структуре, где модел за TR23240|c0\_g1\_i1 показује најуређенију структуру



сличну Fungi\_00002824 и Fungi\_00002826, док се Fungi\_00002822 разликује и показује мању уређеност, а модел за Fungi\_00002828 је највише неуређен и са ниским степеном поузданости предикције.

Поглавље **ДИСКУСИЈА** подељено је на осам потпоглавља у којима је кандидаткиња детаљно и критички упоредила своје резултате са литературним подацима. У оквиру прва два потпоглавља „**Опште карактеристике транскриптома *C. erythraea* Rafn.**“ и „**Функционална анотација транскриптома**“ кандидаткиња је детаљно објаснила опште особине и резултате функционалне анотације транскриптома. Установила је да су опште карактеристике транскрипта, као што су просечна вредност и медијана дужине контига и *N50* вредност, упоредиве са подацима добијеним у сличним пројектима. Поред тога, детаљно је појаснила принципе *BUSCO* анализе. Обзиром на то да се сматра да је транскриптом високог квалитета уколико садржи преко 80% *BUSCO* гена, кандидаткиња је закључила да је *C. erythraea* транскриптом изузетно високог квалитета са резултатом од 94,9%, независно од *N50* контигуитета, који слабо корелише са *BUSCO* анализом. У потпоглављу „**Процена стабилности експресије *housekeeping* гена у колекцији ткива и органа кичице**“, кандидаткиња је детаљно појаснила значај одабира адекватних референтних гена који се користе за нормализацију података у анализама експресије гена, посебно у овако великим експерименталним поставкама где варијације у експресији контролних гена могу значајно негативно утицати на интерпретацију добијених резултата. Иако су оба коришћена софтвера, *geNorm* и *NormFinder*, показала да су оптимални референтни гени у свим сетовима узорака *RPL2* и *TBP1*, услед примене различитих статистичких алгорита, уочене су одређене разлике у рангирању осталих тестираних гена. У следећем потпоглављу детаљно су размотрани резултати *RT-qPCR* анализе за сваки од 17 тестираних гена, уз детаљан преглед литературе. Кандидаткиња је истакла изузетан значај експресионог профила гена *CeNA1* у контексту истраживања соматске ембриогенезе кичице. Знатно виша експресија овог гена у ткиву ембриогеног калуса у односу на остале генске кандидате, која значајно превазилази ниво експресије у контролном узорку листових розета, упућује на то да је експресија овог гена карактеристична за прелаз из соматског у ембриогено стање током соматске ембриогенезе. Током развића ембриона, експресија гена *CeNA1* се постепено смањује са растом диференцијације ткива, што наводи на то да је овај ген карактеристичан за мање диференцирана ембриогена ткива. Додатно, ген *CeNA1* не показује детектовану експресију у потпуно формираним ткивима биљака у *in vitro* условима, што указује на повезаност између његове експресије и интензивне деобе ћелија. У складу са литературним подацима кандидаткиња указује на могућност да би *CeNA1* могао бити нови маркер најраније фазе соматске ембриогенезе кичице због његових необичних образаца експресије, и предлаже да се наставе додатна истраживања како би се дубље разумела улога овог гена током процеса развића. У наредном потпоглављу кандидаткиња указује на резултате различитих истраживања у контексту утицаја комбинације регулатора растења и стадијума развића примарних ембриона на формирање секундарних соматских ембриона у различитим

биљним врстама. Дискутује да је морфогенетски одговор током секундарне соматске ембриогенезе у кичици комплексан и да се може модулисати различитим комбинацијама регулатора растења биљака. Такође, директна соматска ембриогенеза кичице је била доминантна путања развића, што је у сагласности са литературом, јер је код већине биљних врста порекло ембриона у секундарној соматској ембриогенези директно, без обзира на коришћене хормоне. Осим тога секундарни соматски ембриони кичице су вишећелијског порекла а процес секундарне ембриогенезе асинхрон, што је у складу са секундарном соматском ембриогенезом код других врста. Кандидаткиња је у даљем тексту дискутовала резултате везане за ефекте различитих комбинација регулатора растења биљака на ембриогени одговор током неколико циклуса соматске ембриогенезе. Кандидаткиња сматра да је одступање у броју експлантата који су формирали ембрионе било ког развојног стадијума и броја експлантата са формираним ембрионима у котиледонарном стадијуму развића у вези са брзином сазревања ембриона која се смањује током циклуса. Статистички значајан пораст у експресији *CeNA1* уочен приликом транзиције из примарне у први циклус секундарне соматске ембриогенезе, вероватно је последица промене састава ембриогеног ткива. У потпоглављу „Утицај генотипа на регенеративну способност ембриогеног калуса и експресија одабраних гена у ембриогеном ткиву генотипова са различитом регенеративном способношћу“ наведен је значај утврђивања утицаја генотипа на регенеративни потенцијал ембриогеног калуса, посебно када се планира покретање секундарне/цикличне соматске ембриогенезе у којој је добијање ембриона у котиледонарном стадијуму ограничавајући почетни фактор. Кандидаткиња је образложила да разлике у регенеративној способности ембриогеног калуса кичице могу произићи из више фактора, као што су ендогена концентрација хормона у ткиву експлантата или различита осетљивост ткива на примену регулатора растења. Указала је да су профили генске експресије повезани са варијацијама у капацитету за диференцијацију ембриогеног калуса. Чињеница да експресија *CeNA1* драстично опада са порастом диференцираности ембриогеног ткива потврђује предоминантну активност *CeNA1* гена у мање диференцираним ткивима. У потпоглављу „*In silico* анализа гена и протеина *CeNA1*“ кандидаткиња је дискутовала резултате *in silico* анализе генских, промоторских и протеинских секвенци *CeNA1*. С обзиром на то да се гени *CeNA1* налазе у непосредној близини у геному и да деле висок степен сличности у секвенцама и сличну организацију егзона и интрона, кандидаткиња закључује да се највероватније ради о фамилији гена. Поред тога, дискутовано је о могућности да су ови гени настали дупликацијом појединачних гена од којих су неки задржали функционалност, а други су постали псеудогени. Такође, наведено је да ниска дивергенција међу секвенцама гена указује на могућу синхронизовану еволуцију која дуплираним генима унутар исте фамилије омогућава да еволуирају заједно. Кандидаткиња је уз преглед литературе продискутовала да се за промоторе гена *CeNA1* везују неки од чланова фамилија транскрипционих фактора који и иначе регулишу гене повезане са соматском ембриогенезом и да они припадају различитим функционалним групама, а међу

њима су најчешћи они који регулишу одговоре на hormone и стрес, као и они који контролишу процесе развића, претежно развиће ембриона и цвета. Значајна варијабилност у броју мотива на промоторима за које се могу везати транскрипциони фактори је у највећој мери последица структуре промоторске секвенце *CeNA1* гена Fungi\_00002830 у којој су заступљени дугачки тандемски поновци. На основу предикције транзитног пептида на аминокиселинским секвенцама према којој су *CeNA1* протеини екстрацелуларни, кандидаткиња је претпоставља да би у том случају појачана активност *CeNA1* у раној фази соматске ембриогенезе током које се дешава дедиференцијација и интезивна пролиферација ћелија могла да указује на то да он делује као сигнални молекул или у модификацијама ћелијског зида. Коришћењем *AlphaFold* сервера, предвиђени су тродимензионални модели структуре протеина *CeNA1*, који претежно зависе од информација из аминокиселинских секвенци. Кандидаткиња указује да постоји ниска поузданост у предикцијама структуре за већи део протеина *CeNA1*, с посебним нагласком на регионе који су инхерентно неуређени. Ова неуређеност у структури протеина може омогућити флексибилне интеракције с различитим партнерима и многи процеси повезани у биљкама подразумевају протеине с ниским степеном конформационе стабилности. Такође, кандидаткиња наглашава да *AlphaFold* моделовање може бити изазовно када нема потврђених хомолога међу биљним врстама, што може довести до смањене поузданости предвиђених структура. Такође, истакнута је важност коришћења експерименталних метода како би се потврдила тачност предвиђених структура протеина *CeNA1* и створила комплетнија слика о њиховој структури и функцији. На основу свеобухватних експерименталних и *in silico* резултата који су приказани у овој докторској дисертацији, кандидаткиња указује на постојање индикације да маркер најраније фазе соматске ембриогенезе кичице, транскрипт *CeNA1*, припада класи дугачких некодирајућих РНК молекула. Наиме, ова класа РНК обухвата транскрипте који немају потенцијал за кодирање протеина или кодирају кратке пептиде (тзв. „микропептиде“). Поред тога, ове РНК врло често показују изразито ткивно-специфичну експресију и недостатак функционалне анотације. Конструкцијом *amiRNA* конструката омогућено је селективно утишавање гена *CeNA1* путем генетичке трансформације. Кандидаткиња је истакла да би се, захваљујући томе, на трансгеним биљкама могао пратити ефекат утишавања *CeNA1* на различите параметре соматске ембриогенезе и фенотип трансгених биљака, чиме би се омогућило даље проучавање улоге овог гена у процесу соматске ембриогенезе код кичице.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња је у складу са постављеним циљевима сумирала резултате добијене у оквиру ове дисертације. Кандидаткиња је извела осам закључака, а међу најважнијим је да је секвенцирани транскриптом кичице високог квалитета и покривености, у коме је пронађено 428 од 430 *BUSCO* гена. Анализом експресије често коришћених *housekeeping* гена чије су секвенце пронађене у транскриптому, утврђено да се гени *RPL2* и *TBP1* могу користити као адекватни референтни гени за нормализацију експресије гена у узорцима ткива и органа различитих развојних фаза. Анализом експресије гена са потенцијалном улогом у соматској

ембриогенези у ткивима и органима различитих фаза развоја, кандидаткиња је закључила да неки од њих активно учествују у раној или касној фази соматске ембриогенезе. Посебно значајан је ген *CeNA1* који показује високу експресију у најранијој фази соматске ембриогенезе током формирања ембриогеног калуса, када долази до дедиференцијације и интензивне пролиферације ћелија. На основу ових резултата, ген *CeNA1* се може предложити као маркер ране фазе соматске ембриогенезе код кичице. Током израде ове докторске дисертације, секундарна соматска ембриогенеза је први пут пријављена код кичице, при чему је закључено да комплексни морфогенетски одговор може бити модулисан различитим комбинацијама регулатора растења. Поред тога, експресија гена *CeNA1* се повећава у ембриогеном ткиву током транзиције из примарне ка првом циклусу секундарне соматске ембриогенезе, а онда се значајније не мења. Још један од закључака је да генотип има утицај на регенеративну способност ембриогеног калуса. Експресија гена *CeNA1*, *CeTLP1-like*, *CeDC2.15-like* и *CeSERK* опада са порастом диференцираности ембриогеног ткива. Користећи *in silico* приступ кандидаткиња је установила да се фамилија гена *CeNA1* састоји из 11 *CeNA1* чланова, од којих седам поседују комплетни ОРФ. Гени претежно имају два егзона и један интрон и претпостављено кодирају за мале пептиде са неуређеним регионима. На основу резултата *in silico* анализе гена и протеина *CeNA1* постоје индикације да транскрипт *CeNA1* припада класи дугачких некодирајућих РНК молекула. Напослетку, конструисани су вектори који носе *amiRNA* конструкте за утишавање *CeNA1* који су убачени у сој *GV3101 A. tumefaciens* и који представљају значајан ресурс за будуће генетичке трансформације кичице у циљу детаљније карактеризације функције овог гена током соматске ембриогенезе.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** обухвата 558 референци научних радова. У цитираним изворима обухваћене су важне научне публикације из престижних светских часописа у области науке о биљкама. Сви научни радови и извори су коректно наведени у самом тексту дисертације и у одељку Литература.

У поглављу **ПРИЛОЗИ** наведени су сирови подаци *RT-qPCR* анализе експресије одабраних гена из транскриптома у ембриогеном ткиву генотипова са варијабилним регенеративним потенцијалом ембриогеног калуса.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Ćuković, K.**, Dragičević, M., Bogdanović, M., Paunović, D., Giurato, G., Filipović, B., Subotić, A., Todorović, S., Simonović, A. (2020) Plant regeneration in leaf culture of *Centaureum erythraea* Rafn. Part 3: *De novo* transcriptome assembly and validation of housekeeping genes for studies of *in vitro* morphogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 141(2): 417-433., <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01801-w>. **M22**
2. Bogdanović, M., **Ćuković, K.**, Subotić, A., Dragičević, M., Simonović, A., Filipović, B., Todorović, S. (2021) Secondary somatic embryogenesis in *Centaureum erythraea* Rafn. Plants, 10(2): 199., <https://doi.org/10.3390/plants10020199>. **M21**

### Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Ćuković, K.**, Dragičević, M., Todorović, S., Bogdanović, M., Simonović, A., Selection of differentially expressed genes in *Centaureum erythraea* Rafn. during *in vitro* somatic embryogenesis, X International Scientific Agriculture Symposium, AgroSym, Book of Abstracts, p. 226 – 226, Jahorina, 3. - 6. Oct, 2019 **M34**
2. **Ćuković, K.**, Paunović, D., Bogdanović, M., Dragičević, M., Todorović, S., Subotić, A., Simonović, A., Selection of stable reference genes in *Centaureum erythraea* Rafn. during *in vitro* somatic embryogenesis and mechanical wounding, 3 rd International Conference on Plant Biology, Book of Abstracts, p. 28 - 28, Belgrade, 9. - 12. Jun, 2018 **M34**
3. Simonović, A., Dragičević, M., M., Giurato G., Filipović, B., Todorović, S., Bogdanović, M., **Ćuković, K.**, Subotić, A. Identification of genes involved in morphogenesis *in vitro* in *Cenaturium eryhraea* Rafn. as a model organism, BELBI 2016, Book of Abstracts, p. 97 - 97, Belgrade, 20. - 24. Jun, 2016 **M34**

### Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Simonović, A., Bogdanović, M., Dragičević, M., **Ćuković, K.**, Subotić, A., Paunović, D., Todorović, S., Identifikacija gena koji učestvuju u morfogenezi *in vitro* kod kičice (*Centaureum erythraea* Rafn.), Drugi kongres biologa Srbije, Book of Abstracts, p. 44 - 44, Kladovo, 25. - 30. Sep, 2018 **M64**

## Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Идентификација и анализа експресије гена укључених у соматску ембриогенезу кичице (*Centaurium erythraea* Rafn.)“, аутора Катарине Б. Ђуковић, утврђено је да подударање текста износи 2%. Овај степен подударности последица је поклапања личних имена, афилијација институција, скраћеница, облика цитација у тексту (фраза „и сар.“), веб-сајтова база података и алата, назива поглавља, стандардизованих метода и хемикалија, имена врста, гена и протеина, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са Правилником.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Катарине Б. Ђуковић, под насловом “Идентификација и анализа експресије гена укључених у соматску ембриогенезу кичице (*Centaurium erythraea* Rafn.)”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

На основу приказане анализе докторске дисертације Катарине Б. Ђуковић, под насловом „Идентификација и анализа експресије гена укључених у соматску ембриогенезу кичице (*Centaurium erythraea* Rafn.)“, Комисија сматра да дисертација представља актуелан и оригиналан научни рад у области физиологије и молекуларне биологије биљака.

У овој дисертацији су представљене карактеристике секвенцираног и *de novo* састављеног свеобухватног транскриптома кичице. Транскриптом је функционално аотиран и представља значајан ресурс секвенци које се у будућности могу користити у бројним истраживањима физиологије растења и развића биљака. Додатно, установљени су оптимални референтни гени који се могу употребљавати у анализима експресије гена, не само током ембриогеног развића, већ и у другим процесима растења и развића. У оквиру транскриптома, идентификовани су потенцијални гени маркери соматске ембриогенезе. Такође, у овој докторској дисертацији први пут је код кичице представљен процес секундарне и цикличне соматске ембриогенезе. Секундарни ембриони су показали високу стопу клијања и способност конверзије у биљке. Комисија је мишљења да ова докторска дисертација даје значајан допринос разумевању експресије гена током соматске ембриогенезе код кичице. Идентификација новог потенцијалног маркера ране фазе соматске ембриогенезе, *CeNA1* и представљена метода за индукцију секундарне и

цикличне соматске ембриогенезе имају изузетан значај у будућој биохемијској и молекуларној анализи соматске ембриогенезе.

Кандидаткиња је показала висок степен савладавања научних изазова, способност за самостално истраживање и критичку анализу, као и интерпретацију и дискусију добијених резултата.

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета да прихвати позитивну оцену Комисије и одобри кандидаткињи Катарини Б. Ђуковић јавну одбрану докторске дисертације под насловом: **„Идентификација и анализа експресије гена укључених у соматску ембриогенезу кичице (*Centaurium erythraea* Rafn.)“**.

**КОМИСИЈА:**

У Београду, 13. 11. 2023. године

---

др Слађана Тодоровић, научни саветник,  
Универзитет у Београду - Институт за биолошка  
истраживања „Синиша Станковић“, Институт од  
националног значаја за Републику Србију

---

др Душица Јаношевић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Тијана Цветић Антић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет