

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

**Датум:28. 04. 2016.**

**Предмет:** Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације мр Гордане Р. Здјелар

Одлуком Наставно – научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду од 30. 03. 2016. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације **мр Гордане Р. Здјелар**, дипл. биолога под насловом: “Физиолошке, биохемијске и молекуларне основе толерантности на сушу и осмотски стрес у раним вегетативним фазама развоја одабраних генотипова рода *Pisum*“.

На основу прегледа, анализе и оцене докторске дисертације Комисија у саставу: др Томислав Живановић, редовни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Радмила Стикић, редовни професор у пензији, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Гордана Шурлан-Момировић, редовни професор у пензији, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Биљана Вуцелић-Радовић, редовни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду и др Вук Ђорђевић, научни сарадник Института за ратарство и повртарство у Новом Саду, подноси следећи:

**ИЗВЕШТАЈ**

**1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДИСЕРТАЦИЈИ**

Докторска дисертација **мр Гордане Р. Здјелар**, под насловом “Физиолошке, биохемијске и молекуларне основе толерантности на сушу и осмотски стрес у раним вегетативним фазама развоја одабраних генотипова рода *Pisum*“ написана је на укупно 231 странице штампаног текста. На почетку текста се налази Абстракт на српском и енглеском језику са кључним речима. Дисертација садржи следећа поглавља: Увод (стр.1-3), Преглед литературе (стр. 4-34), Научни циљ истраживања и основне хипотезе (стр.35), Материјал и методе (стр.36-51); Резултати (стр. 52-135), Дискусија (стр.136-168), Закључци (стр.169-175), Литература (стр.175-217). Дисертација укључује и као Прилог 50 табела са подацима статистичке обраде резултата (стр. 218-229) и Биографију аутора (стр. 230-231). Такође су садржана и 3 посебна прилога – изјаве: изјава о ауторству, о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације, изјава о коришћењу и ауторству.

Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија имају више подпоглавља. У оквиру дисертације је приказано 66 табела, 53 графикана, 14 колор фотографија и 7 шема. Цитирано је 311 литературних извора.

## 2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** започиње са поделом дејства различитих фактора спољашње средине који по свом дејству на биљке могу бити примарни (абиотички и биотички) и секундарни. У групу примарних стресних фактора спада суша. Суша због климатских промена и смањења расположивих ресурса воде у многим земљама, као и у Србији, све више утиче на пољопривредну производњу и код великог броја култура, укључујући и сточни грашак ограничава њихов принос и квалитет приноса. Суша, као и други примарни стресни фактори, је често праћена секундарним стресним факторима (оксидативним и осмотским). То додатно утиче на редукцију развића биљака и њихов принос. Затим је указано и да се савремени концепт решавања проблема суше базира на 2 основна концепта и то: стварање генотипова гајених биљака отпорних на сушу и побољшање агротехничких мера. За први концепт је од посебног значаја фенотипска карактеризација реакција различитих генотипова на сушу у фази њихове највеће осетљивости на сушу што може да помогне у одабиру селекционог материјала. У складу са таквим приступом у дисертацији су испитане физиолошке и биохемијске реакције различитих генотипова сточног грашка у раним фазама њиховог развоја (клијање, развој поника, рана вегетативна фаза), а које су посебно осетљиве на дејство суше и осмотског стреса.

У поглављу **Преглед литературе** кандидаткиња наводи резултате савремених домаћих и страних аутора који су релевантни за област проучавања докторске дисертације. Ово поглавље је подељено у више подпоглавља. У уводном подпоглављу су представљене опште карактеристике које се односе на сточни грашак као изабрану културу за истраживања (историјско порекло, значај, услове гајења, принос). У следећем подпоглављу је дат преглед ефеката суше на пољопривредну производњу и то, посебно на принос грашка чији транспирациони коефицијент варира од 400 до 600 гН<sub>2</sub>О/г суве масе. Потом следи објашњење и преглед лтературних података о интеракцији суше и осмотског стреса (настаје као резултат дехидратације у ћелијама), као и оксидативног стреса, до кога долази услед настанка реактивних кисеоничких врста (ROS) које изазивају деградацију или инактивацију различитих једињења. Ту је дат преглед антиоксидативних ензима и антиоксидативних једињења. Посебно је разматрана и кључна улога стрес хормона абсцисинске киселине (АБА) у реакцијама биљака на сушу. Преглед литературе је обухватио и ефекте суше на физиолошке и биохемијске процесе код биљака, са објашњењем и процеса перцепције и трансдукције сигнала суше (хемијских и хидрауличних сигнала). На крају је дат преглед савремених истраживања која се односе на молекуларни одговор биљака на сушу, са посебним освртом на улогу гена из категорија брзог и спорог одговора на сушу.

У поглављу 3. **Научни циљ и основне хипотезе** истакнуто је да је **циљ дисертације** био да се изврши карактеризација неких од најважнијих физиолошких и биохемијских процеса који су у основи реакција биљака грашка на сушу и осмотски стрес. Циљ је био и да се у ова истраживања укључе и молекуларна истраживања, која би, уз анализу процеса растења биљака, акумулацију хормона АБА и испитивања антиоксидативних механизма одбране биљака од стреса суше, значајно допринела

разумевању адаптивних реакција и толеранцији грашка на сушу. Такав мултидисциплинарни приступ је омогућио и идентификацију толерантних генотипова грашка и могао би да има своју практичну примену за потребе селекције и стварања генотипова отпорних на сушу.

У истраживањима ове дисертације се пошло од *следећих хипотеза*: да ће испитивани генотипови рода *Pisum* показати разлике у параметрима клијавости семена, пораста поника и листова у условима осмотског стреса и суше. Такође је претпоставка да ће се испољити генотипске разлике у осмотском и стресом суше индукованој акумулацији хормона АБА. С обзиром на чињеницу да суша и осмотски стрес изазивају оксидативни стрес, очекивало се и да ће се у тим условима променити активност антиоксидативних ензима и да ће се испољити генотипске разлике. Такође за очекивање је било и да ће доћи до промена у генској експресији антиоксидативних ензима у различитим условима водног дефицита.

У поглављу **Материјал и методе** је објашњено да су истраживања обављена на сточном грашку и то са 7 сорти (НС Јуниор, Дукат, Јавор, Партнер, Пионир, Трезор, НС Мраз), које су селекционисане у Одељењу за крмно биље, Института за ратарство и повртарство у Новом Саду. Потом је детаљно објашњен материјал истраживања (карактеристике испитиваних сорти), а потом експериментални системи и методе испитивања које су примењене. Истраживања су обухватила 2 експериментална система и то: *Оглед осмотског стреса* и *Оглед суше*.

У *Огледу осмотског стреса* експерименти су обављени у лабораторијским условима и то тако што су испитиване сорте у фази клијања и поника излагане дејству различитих концентрација осмотикума PEG 6000 (осмотски потенцијал од -0,1, -0,2 и -0,3МРа), у периоду од 10 и 15 дана, док је излагање у воденим растворима представљало контролне услове. У овом огледу су мерени следећи параметри: клијавост, средње време клијања, дужина, свежа и сува маса вегетативних делова, њихов међусобни однос и на основу ових параметара је израчунат индекс толерантности надземног дела и корена. Такође је одређена концентрација абсцисинске киселине –АБА (ЕЛИСА тестом), обављена мерења активности антиоксидативних ензима (супероксид дисмутазе, аскорбат пероксидазе и глутатион редуктазе) одговарајућим спектрофотометријским методама, као и експресија гена (RT-PCR методом) који кодирају антиоксидативне ензиме (*Cu/Zn SOD*, *cAPx*, *GR*) и гена који кодирају ензим *алдехид оксидазу*-АО (*PsAO1*, *PsAO2*, *PsAO3*), а који је кључни ензим у последњој фази биосинтезе АБА (од АБА-алдехида). *Arabidopsis* 18S rRНК ген је коришћен као референтни ген.

*Оглед суше* је обављен у комори са контролисаним условима за гајење биљака и то са биљкама у старијој вегетативној фази (формирана 3 листа). Биљке су излагане ефекту слабије и јаче суше (18% и 9% влажности супстрата) и то тако што је прекинуто заливање супстрата у коме су гајене. Као контрола су коришћене оптимално заливане биљке. Код испитиваних биљака су обављена мерења следећих параметара: свежа и сува маса вегетативних органа и њихов међусобни однос, а израчунат је и индекс толерантности надземног дела и корена. Водни режим супстрата је мерен помоћу тета проба, проводљивост стоминих ћелија методом порометра. Као и у огледу осмотског стреса концентрација АБА у листовима је мерена помоћу ЕЛИСА теста, активност антиоксидативних ензима (супероксид дисмутазе, аскорбат пероксидазе и глутатион редуктазе) одговарајућим спектрофотометријским методама, док је експресија гена (*Cu/Zn SOD*, *cAPx*, *GR*, *PsAO1*, *PsAO2*, *PsAO3*) испитивана RT-PCR методом. *Arabidopsis* 18S rRНК ген је такође коришћен као референтни ген.

Добијени подаци су анализирани уз помоћ софтверског пакета Statistica 10.

Поглавље **Резултати истраживања** је подељено на 2 основна подпоглава, у којима су на јасан и прегледан начин приказани резултати до којих је кандидаткиња дошла и који су документовани графички и табеларно.

У првом подпоглављу **Осмотски стрес** је прво објашњено да су за индукцију осмотског стреса коришћена 3 раствора осмотикума PEG 6000 чији је осмотски потенцијал износио -0,1, -0,2 и -0,3МРа. Затим је објашњено да су испитивања са раствором PEG 6000 од -0,3МРа показала да је осмотски потенцијал ове концентрације осмотикума превише низак за тестирање испитиваних генотипова јер је проценат клијавости био испод 10% а код неких сорти је изазвао некрозу ткива. Због тога ова концентрација осмотикума није коришћена у даљим испитивањима. Резултати испитивања *клијавости* и *средњег времена клијања* су показала да је код свих сорти излагање осмотском стресу изазвало смањење % клијавости и продужење средњег времена трајања клијања, али да су се и ту испољиле значајне генотипске разлике, као и да је сорта Јавор знатно осетљивија од осталих сорти (смањење процената клијавости за 42% и продужење времена клијања за просечно 1,5 дана).

Мерења *дужине* и *биомасе вегетативних органа* поника и *њиховог међусобног односа*, као и статистичка анализа резултата, су такође указали на значајан ефекат третмана, генотипа и њихове интеракције као и на ефекат дужина излагања биљака осмотском стресу (10 или 15 дана). Код свих сорти је уочено повећање дужине надземног дела поника 15. дана експеримента у односу на 10. дан, што указује да се сорте у дужем временском интервалу могу адаптирати у одређеном степену на осмотски стрес. На то указују и промене брзине растења поника која је код свих сорти после 10 дана у раствору од -0,1МРа износила просечно 3,56 мм/дан, а после 15 дана у истом осмотикуму 6,62 мм/дан. Сличан тренд је уочен и са брзину растења корена. Анализа утицаја на појединачне сорте је показала да је највећа промена дужине корена у условима -0,2МРа утврђена код сорте Јавор (редукција на 74% у односу на оптималне услове), док је код сорте Трезор захваљујући порасту брзине растења дошло и до повећања дужине корена (за 115%). Слични резултати су добијени и за утицај осмотског стреса на свежу и суву масу вегетативних органа.

Однос суве масе *надземни део/корен* (с/р однос) може индиректно да укаже на дистрибуцију и транспорт асимилата. Утврђен је тренд опадања с/р односа код свих сорти што указује на већи ефекат осмотског стреса на надземни део у односу на корен. То потврђују и резултати *индекса толерантности* јер су вредности индекса толерантности корена и 10. и 15. дана код свих сорти биле веће (просечно 0,32) у односу на индекс толерантности надземног дела (просечно 0,54), а што указује да је осмотски стрес имао већи утицај на надземни део биљака него на корен. Поређење између испитиваних сорти показује да је највеће смањење индекса толерантности надземног дела при деловању -0,1МРа утврђено код сорте Мраз (65%), а у условима -0,2 МРа код сорте Јавор (82%), док су најмање промене у оба осмотикума утврђена код сорте Дукат (35,5% и 44%). Резултати за толерантност корена су показали да је највеће смањење за оба осмотска потенцијала било код сорте Мраз (55,5% и 58,8%), а најмање код сорте Дукат (3% и 19,75%).

Испитивања *концентрације хормона АБА* у надземним деловима биљака и статистичка анализа података су, такође, показали значајан утицај генотипа, третмана и њихове интеракције, као и времена излагања биљака стресу. При томе је код већине испитиваних сорти дошло до 2 врсте промена и то повећања концентрације АБА (сорте Јавор у оба осмотска раствора, Јуниор и Партнер у -0,1 МРа), односно смањења (сорте Мраз, Дукат и Трезор). Изузетак је сорта Пионир код које је до пораста у концентрацији АБА дошло само после 10 дана излагања биљака осмотском стресу од -

0,2 МРа (од 168,00 до 198,00 нг/г свежје масе). Поређење испитиваних сорти такође показује да је највећа акумулација АБА после излагања биљака осмотском стресу од -0,2 МРа измерена после 15. дана код сорте Јавор (од 46,00 до 123,67 нг/г свежје масе). У истим условим највећа редукција концентрације АБА је утврђена код сорте Трезор (од 180,00 до 79,67 нг/г свежје масе).

У огледу осмотског стреса од -0,1 МРа и то 10. и 15. дана трајања су испитивани *антиоксидативни ензими* (супероксид дисмутаза, аскорбат пероксидаза и глутатион редуктаза) и то у надземним деловима и корену поника. Статистичка анализа ових података је показала да су на активност ензима утицали генотип, третман и њихова интеракција, као и време излагања биљака стресу. Резултати за ензим *супероксид дисмутаза* – SOD су показали да се просечна вредност активности код испитиваних сорти кретала у опсегу између 5,90 У/мг протеина (контрола - Мраз) и 12,30 У/мг протеина (осмотски стрес - Партнер). Резултати су показали да је статистички значајно повећање активности SOD у надземном делу поника изложених осмотском стреса утврђено код сорти Мраз, Партнер и Трезор, док код сорти Дукат и Пионир није било статистички значајно. Резултати за SOD у корену су били слични вредностима у надземном делу поника и они су такође показали да је код већине сорти смањена активност овог ензима при излагању биљака осмотском стресу, као и да је то било више изражено 15. дана. Изузетак је сорта Пионир код које се активност повећала у оба испитивана периода (просечно од 7 до 10 У/мг протеина).

Вредности за други испитивани антиоксидативни ензим *аскорбат пероксидазу* у надземном делу поника су биле у опсегу од 27,54 нмол/мин/мг протеина (контрола - сорта Партнер) до 263,00 (осмотски стрес сорта - Мраз). Статистички значајно повећање под дејством осмотског стреса и то само после 10. дана је утврђено код сорти Мраз, Пионир, Трезор, Дукат и Партнер, док је код сорти Јуниор и Јавор дошло до смањења. Испитивања у корену су показала да су вредности активности ензима у сличном опсегу.

Испитивања активности ензима *глутатион редуктазе* у надземном делу испитиваних сорти су показала да су се вредности кретале у опсегу од 12,00 нмол/мин/мг протеина (контрола - Пионир) и 7,10 нмол/мин/мг протеина (осмотски стрес - Мраз). Код већине сорти је осмотски стрес 10. дан довео до повећања активности ензима код већине сорти (Мраз, Дукат, Пионир, Трезор), односно до смањења код сорти Јуниор и Јавор, док код сорте Партнер промена није била статистички значајна. Петнаестог дана је код свих сорти била смањена изузев код сорте Трезор код које се активност ензима повећала под дејством осмотског стреса у односу на контролу (од 10,40 до 25,20 нмол/мин/мг протеина). Испитивања активности ензима у корену су показала сличне вредности. и динамику промене као и код надземног дела.

У огледу осмотског стреса је испитивана и *експресија гена* који кодирају 3 испитивана антиоксидативна ензима (*Cu/Zn SOD*, *aP<sub>x</sub>* и *GR*), као и 3 гена (*PsAO1*, *PsAO2* и *PsAO3*), који кодирају ензим *алдехид оксидазу* (кључни ензим у последњој фази биосинтезе АБА од АБА-алдехида). Ови резултати су указали да је највеће повећање активности SOD у односу на контролу у надземном делу поника 10. дана осмотског стреса измерено код сорте Мраз (184,74% у односу на контролу), као и после 15. дана код сорте Трезор (повећање за 152,94%) вероватно настало као резултат појачане експресије испитиваног гена за SOD (*Cu/Zn SOD*). Са друге стране смањена експресија овог гена код сорте Јуниор изложене осмотском стресу је имала за последицу смањену SOD активност у надземном делу поника (58,72% у односу на контролу). Сличан тренд промене је утврђен и у корену испитиваних сорти и то тако да

је највеће повећање или смањење SOD активности (сорте Трезор и Партнер) последица промена у експресији гена.

Испитивања *експресије гена* за ензим *аскорбат пероксидазу (сАРх)* и за ензим *глутатион редуктазу (GR)* су такође потврдили да је повећана или смањена активност ових ензима у испитиваним вегетативним органима и у току трајања осмотског стреса резултат повећане или смањене експресије *сАРх* и *GR* гена.

Анализа *експресије PsAO1, PsAO2 и PsAO3 гена* су показала да се код сорти код којих у осмотском стресу долази до акумулације АБА (сорта Јавор) повећава експресија гена *PsAO1* и, нарочито гена *PsAO3*, као и да се код сорти код којих се смањује акумулација АБА (Трезор) експресија ова 2 гена смањује.

У другом поглављу *Суша* су представљени резултати ефеката суше на испитиване сорте грашка. Прво су представљени резултати испитивања ефеката јаке суше (9% влажности супстрата) на акумулацију *свеже* и *суве масе* у *вегетативним органима*. Статистичка анализа је показала да су на акумулацију биомасе значајно утицали и генотип и третман и да се испољио ефекат њихове интеракције. Анализа ефеката суше на свежу и суву масу надземних органа испитиваних сорти је показала сличности јер је највећа редукција у суши утврђена код сорте Јуниор (смањење за 37 %у односу на контролу), а није се значајно променила код сорти Дукат и Јавор. Најниже вредности свеже масе корена су измерене код сорте Партнер (1,42г у контроли и 0,68г у суши), док су највише одговарајуће вредности утврђене код сорте Трезор (2,45 и 1,49г). Резултати за суву масу корена су слични изузев што су најниже вредности у контроли и суши измерене код сорте Јавор (0,13 и 0,07 г). Испитивања односа *суве масе надземног дела/корена* су показали да је суша код сорти Мраз и Јуниор више утицала на раст надземног дела него код корена, док је код сорте Јавор било обрнуто (већи утицај на корен). Резултати *индекса толерантности на сушу надземног дела и корена* су показала да је у суши код сорте Дукат најмање смањење индекса толерантности и надземног дела и корена у односу на контролу, док је највеће смањење индекса толерантности за надземни део утврђено код сорте Мраз, а највеће смањење толерантности корена код сорте Јавор.

Испитивања *проводљивости стоминих ћелија* су обављена у условима и умерене и јаке суше. Ови резултати су показали највеће разлике између испитиваних сорти у условима умерене суше, док су те разлике биле мање изражене у јакој суши. У умереној суши је највећа проводљивост измерена код сорте Трезор (80,64 ммол/сек<sup>2</sup>), а најнижа код сорте Пионир (50,04 ммол/сек<sup>2</sup>), док је у јакој суши највећа проводљивост стоминих ћелија измерена код сорте Дукат (64,06 ммол/сек<sup>2</sup>), а најмања код сорте Јуниор (16,08 ммол/сек<sup>2</sup>). Да би се испитала осетљивост стоминих ћелија на сушу резултати проводљивости стоминих ћелија су приказани и у корелацији са водом у супстрату и то у форми сигмоидне криве. Ови резултати су указали да су стомине ћелије сорте Дукат најосетљивије на дејство умерене суше (смањење проводљивости за 66,88% у односу на контролу). Насупрот томе стеме сорте Јуниор у умереној суши мање осетљиве да би у условима јаке суше најбрже затвориле стомине ћелије и тако достигле најнижу проводљивост у односу на контролне услове (11,20%).

Акумулација хормона *абсцисинске киселине (АБА)* је такође измерена у листовима биљака изложених умереној и јакој суши. Код свих сорти је суша довела до значајног повећања концентрације АБА чије су се вредности кретале од најниже у оптималним условима (сорта Дукат - 88,00 нг/г свежe масе) до највећих вредности код ове сорте у умереној суши (648,80 нг/г свежe масе) и јакој суши (895,00 нг/г свежe масе). Поређења између сорти су такође показала да је код сорте Дукат у оба третмана суше дошло до највеће акумулације АБА, затим код сорте Пионир, док је код сорте

Јавор та промена најмања. Реакције стоминих ћелија су приказане и као корелативни односи са концентрацијом АБА. Ови резултати су показали да се стомине ћелије испитиваних сорти разликују у својој осетљивости на АБА и то тако да је акумулација АБА највише утицала на проводљивост стома код сорте Дукат, а најмање код сорте Јавор.

Испитивања у суши, као и у осмотском стресу, су обухватила и ефекат јаке суше на *активност антиоксидативних ензима* (супероксид дисмутазу, аскорбат пероксидазу и глутатион редуктазу) у листовима. Резултати за ензим *супероксид дисмутаза* – SOD су показали да су се вредности активности ензима, слично осмотском стресу, кретале у опсегу од 6,40 У/мг протеина (контрола - Дукат) до 11,10 У/мг (суша - Мраз). Резултати су показали и да је највеће повећање активности у суши у односу на контролу измерено код сорти Јуниор и Пионир (114,49% и 114,87%) а најмање код сорте Трезор (79,97%).

Испитивања *аскорбат пероксидазе* у суши су показала да је највеће повећање активности у односу на контролу измерено у листовима сорте Трезор (144,70%), највеће смањење код сорти Јавор (16,76%) и Партнер (17,78%), док су код сорти Јуниор и Дукат утврђене сличне промене у активности ензима (повећање од 132,03% и 131,05 % у односу на контролу).

Резултати за ензим *глутатион редуктазу* су такође показали генотипске разлике у активности овог ензима. Највеће промене у суши, у односу на контролу, су утврђене код сорте Јуниор (повећање од 18,40 до 34,20 нмол/мин/мг протеина), и код сорте Партнер (смањење од 22,00 до 7,60 нмол/мин/мг протеина). Код сорти Дукат и Пионир је утврђено слично смањење активности (просечно на 86%), као и код сорти Мраз и Јавор (просечно на 60%).

У огледу суше, као и у огледу осмотског стреса, је испитивана и *експресија гена* који кодирају 3 испитивана *антиоксидативна ензима* (*Cu/Zn SOD*, *sAPx* и *GR*), као и 3 гена (*PsAO1*, *PsAO2* и *PsAO3*), који кодирају ензим *алдехид оксидазу*. Резултати за експресију *Cu/Zn SOD* гена су показали да је највеће повећање експресије овог гена у суши утврђено код сорте Јуниор код које је и измерено највеће повећање активности SOD ензима у односу на услове контроле (114.49%), док је смањење експресије утврђено код сорте Трезор код које је суша смањила активност SOD ензима. Слична корелација је утврђена и између активности ензима аскорбат пероксидазе и експресије *sAPx* гена (повећање код сорте Јуниор и смањење код сорте Јавор), као и за експресију *GR* гена (повећање код сорте Јуниор и смањење код сорте Јавор). Резултати за гене *PsAO1*, *PsAO2* и *PsAO3* су код сорте акумулатора АБА у суши (Дукат и Јавор) показали повећану експресију гена *PsAO1* и *PsAO3*.

У поглављу **Дискусија** резултати истраживања су на адекватан начин разматрани и коментарисани у односу на резултате других аутора релевантних за истраживања ове докторске дисертације. Дискусија резултата је приказана систематично у 2 подпоглавља која су следила резултате истраживања у оба примењена експериментална система (осмотском стресу и стресу суше). Пошто нема доступних литературних података о акумулацији АБА у клијанцима и биљкама сточног грашка, а екстракција ксилемске АБА у испитиваним раним вегетативним фазама није могућа, кандидаткиња је да би објаснила реакције испитиваних сорти на стрес поредила промену концентрације АБА у листовима са испитиваним физиолошким и биохемијским показатељима (растењем биљака, реакцијама стоминих ћелија, ензимским активностима). Овакав приступ се показао успешним јер је омогућио да се донесу правилни закључци о природи адаптивних реакција испитиваних сорти на осмотски и стрес суше.

У поглављу **Закључци** су представљени најважнији закључци (укупно 15) који су правилно изведени и у потпуности произилазе из анализе добијених резултата докторске дисертације. Они се могу сумирати на следећи начин.

Резултати осмотског стреса и испитивања у фази клијања су показали да се са повећањем степена стреса смањује *процент клијања* и продужује време средњег и укупног клијања. На основу ових резултата закључено је да су сорте Јавор и Јуниор знатно *осетљивије* од осталих сорти на осмотски стрес (смањена клијавост за просечно 21,52% и продужено време клијања за просечно 1,06 дана у односу на контролу), док су у групи *толерантних сорте* Мраз и Дукат (смањење клијавости за 3,32% и повећано време средњег клијања за просечно 0,83 дана), а у *умерено толерантне* сорте Трезор, Партнер и Пионир (смањена клијавост за 7,09% и продужено време клијања за просечно 0,2 дана). На основу испитивања утицаја осмотског стреса на биљке у фази поника закључено је да су осмотски стрес и дужина излагања биљака утицали на *раст и акумулацију биомасе вегетативних органа*, као и да се тај ефекат више одразио на раст надземног дела (смањење брзине просечно за 75,90%), у односу на раст корена (просечно смањење брзине раста за 55,72%). То потврђују и резултати односа *суве масе надземни део/корен* који су код свих сорти изнад 1 (изузев сорте Пионир), као и *индекс толерантности корена* који је већи (просечно 0,54) од *индекса толерантности надземног дела* (просечно 0,32).

На основу резултата мерења *параметара растења* и *индекса толерантности* у фази *поника*, слично као и у фази клијања сорти, закључено је да у групу *толерантних сорти* на осмотски стрес спадају сорте Мраз и Дукат, у групу *средње толерантних* Трезор, Пионир и Партнер, док су Јуниор и Јавор *осетљиве сорте*. На основу мањег ефекта осмотског стреса од 15 дана на испитиване параметре у односу на краћи период (10 дана), закључено је и да је толерантним сортама потребно више времена да се адаптирају на осмотски стрес и тако умање његово негативно дејство.

На основу испитивања *акумулације стрес хормона АБА* и активност антиоксидативних ензима закључено је да осмотски стрес, као примарни стресни фактор, и оксидативни стрес, као секундарни стресни фактор, изазивају различите биохемијске реакције код испитиваних сорти. Код једне групе (Јавор, Партнер и Јуниор) је у тим условима измерено значајно повећање садржаја АБА (просечно за 41,22 нг/г свеже масе), а што индиректно указује да је АБА утицала на редукцију раста. Насупрот томе, смањење концентрације АБА код сорти Мраз, Дукат, Пионир и Трезор (просечно за 51,06 нг/г свеже масе) упућује на закључак да је редукција раста надземних делова и корена поника настала као резултат процеса који нису под директном контролом АБА. Стога би у оваква истраживања требало укључити и друге хормоне и испитати њихову интеракцију са АБА.

Мерења *активности антиоксидативних ензима* су показала да се као одговор на осмотски и оксидативни стрес и образовање ROS, код испитиваних сорти испољавају генотипске разлике. Код толерантне сорте Трезор механизам уклањања ROS се базира на константно повећаној активности сва 3 испитивана ензима (SOD у просеку са 158%, APx за 650%, GR за 381%). Насупрот томе код Јуниора, сорте осетљиве на осмотски стрес, активност ензима је смањена (SOD на 58 %, APx на 12%, GR на 46%), а слично је и у надземним деловима сорте Јавор (SOD на 78 %, APx на 71%, GR на 57 %), код које је осетљивост на осмотски стрес надземног дела посебно јако изражена. На основу ових резултата је закључено да активност антиоксидативних ензима може да укаже на степен толерантности испитиваних сорти на осмотски стрес.

Резултати испитивања ефеката *суше* на укупну *биомасу* су показали да је највећи ефекат редукције суве масе у односу на оптимални водни режим измерен код



сорте Јавор (од 0,28 г до 0,07 г), а најмањи код сорте Дукат (од 0,89 г до 0,63 г), док су испитивања односа суве масе *надземног дела/корена* показала да је суша код сорти Мраз и Јуниор више утицала на раст надземног дела него код корена, док је код сорте Јавор било обрнуто (већи утицај на корен). На основу ових резултата, као и *индекса толерантности* на сушу надземног дела и корена, закључено је да се испитиване сорте на основу огледа у суши могу поделити у 3 групе и то: *толерантне* на сушу (Дукат и Партнер), *средње толерантне* (Трезор, Пионир и Јуниор) и осетљиве (Јавор и Мраз).

Корелативни односи између *концентрације АБА* у листовима биљака и *проводљивости стоминих ћелија* су показали да је код сорте Дукат утврђена и највећа акумулација АБА у суши (од 88 до 895,00 нг/г свежје масе) и највећа осетљивост стоминих ћелија (редукција проводљивости од 194,00 до 37,96 ммол/с<sup>2</sup>), тако да је на основу тога и реакције растења биљака закључено да су реакција ове сорте на сушу резултат образовања „хемијских сигнала“ суше. На основу мање осетљивости стоминих ћелија сорте Јавор (од 166,57 до 30,66 ммол/с<sup>2</sup>) и мање акумулације АБА у суши (од 146,00 до 361,00 нг/г свежје масе), као и промена у растењу, закључено је да су реакције ове сорте на сушу резултат „хидрауличних сигнала“ суше. Закључено је и да је динамички одговор стоминих ћелија сорте Дукат на сушом изазвану акумулацију АБА значајна адаптивна реакцију која овој сорти омогућава да у условима јаке суше одржи делимичну отвореност стома и наставак процеса асимилације, а што је резултирало и највећим индексом отпорности на сушу и надземног дела и корена.

Резултати испитивања утицаја суше на активност *антиоксидативних ензима* код испитиваних сорти су показали повећање код сорте Трезор толерантне на сушу (SOD у просеку за 135%, APx за 155%, GR за 106%), као и смањење активности (SOD на 81%, APx на 39%, GR на 49%) код сорте Јавор која је осетљива на сушу. Ови резултати су такође потврдили закључак да активност антиоксидативних ензима може да укаже на степен осетљивости испитаних сорти на стрес и осмотског стреса и суше.

На основу поређења реакција испитиваних сорти у оба експериментална система закључено је и да се *толерантност на дехидратацију* (изазвану осмотским стресом или сушом) код неких сорти као што је Мраз смањује у каснијој фази развоја, док код других се не мења много као код сорте Јавор (најосетљивија у оба система) или Дукат (најтолерантнија у оба система).

Закључено је и да су реакције толерантности испитиваних сорти базиране на различитим *биохемијским механизмима*. Акумулација АБА код једне групе толерантних сорти (Дукат и Трезор) у оба експериментална система доприноси активацији антиоксидативних ензима, као и бржем затварању стома у суши. Код других толерантних и умерено толерантних сорти (Партнер, Јуниор и Мраз у раној фази), механизам толеранције и активације антиоксидативних ензима вероватно укључује АБА-независне механизме.

Резултати анализе *експресије гена* и транскрипта који кодирају антиоксидативне ензиме (*Cu/Zn SOD*, *sAPx*, *GR*) могу да објасне промене у активности антиоксидативних ензима (SOD, APx, GR). Ови резултати такође упућују на закључак да је реакција испитиваних сорти на ROS врсте, које настају у осмотском или стресу суше, резултат повећане експресије гена код толерантних сорти (Трезор, Пионир, Мраз у раним фазама осмотског стреса), односно смањене експресије као код осетљиве сорте Јавор.

Резултати испитивања *експресија 3 гена (PsAO1, PsAO2 и PsAO3)* који су потребни за синтезу ензима алдехидне оксидазе-АО (каталише финалну фазу биосинтезе АБА из АБА-алдехида) су показали да се експресија *PsAO1* и *PsAO3* повећавала код оних сорти код којих се АБА акумулирала у осмотском стресу (сорта

Јавор за 106,3 нг/г), односно у суши (сорта Дукат за 807 нг/г), док се експресија смањила код сорте Трезор код које се концентрација АБА смањила (за 83,3 нг/г). На основу тога је закључено да од експресије *PsAO1* и, посебно *PsAO3*, зависи синтеза АО у условима и осмотског и стреса суше.

На основу добијених резултата испитивања експресије гена се може закључити и да је *Arabidopsis* 18S rRNK погодна за коришћење као *референтни ген* у експериментима где се прати експресија гена у условима осмотског и стреса суше.

На крају је закључено и да добијени резултати указују да се на основу релативно једноставних метода као што су одређивање процената клијавости и пораста поника у растворима осмотикума PEG 6000, може извршити тестирање отпорности већег броја генотипова грашка на дехидратацију. Такође, анализа експресије гена за антиоксидативне ензиме (SOD, AP<sub>x</sub> и GR) може бити корисна за оцењивање толерантности генотипова сточног грашка на осмотски стрес и сушу.

У поглављу **Литература** је наведен списак од 311 референци које су релевантне за истраживања дисертације и у складу са стандардима за цитирање.

У поглављу **Прилози** су приказани допунски материјали који су од значаја за боље разумевање овог рада: оригиналне табеле статистичких података (укупно 50), затим Биографија кандидата и тражене изјаве (о ауторству истоветности штампане и електронске верзије докторског рада, о корошћењу и ауторству).

### 3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Кандидат мр Гордана Р. Здјелар је по мишљењу чланова Комисије остварила све циљеве докторске дисертације у складу са пријавом. Ова дисертација је резултат оригиналног и самосталног научног рада у коме су успешно примењене савремене инструменталне и статистичке методе за експериментални део истраживања. Добијени резултати дисертације су правилно тумачени и коментарисани у складу са расположивим подацима, а изведени су правилни и научно доказани закључци.

Одабрана тема истраживања дисертације је од посебног научног и практичног значаја јер је суша један од фактора који у великој мери ограничава производњу грашка, тако да је разумевање физиолошких и биохемијских процеса на које она утиче основни предуслов за тестирање отпорности грашка на сушу за потребе селекције отпорних генотипова. Научни значај дисертације је у томе је што је дала свој посебан допринос разумевању улоге кључног стресног хормона АБА и антиоксидативних ензима у реакцијама биљака грашка на ефекте осмотског и стреса суше. Резултати у фази поника су показали да се ефекат осмотског стреса на редукцију растења не може у потпуности приписати акумулацији АБА јер се она код једне групе сорти (Јавор, Партнер и Јуниор) у тим условима измерено значајно повећава (просечно за 41,22 нг/г свеже масе), док се код друге групе сорти (Мраз, Дукат, Пионир и Трезор) смањује (просечно за 51,06 нг/г свеже масе). Са друге стране код биљака у старијој вегетативној фази у условима суше акумулација АБА (чак 10 пута код сорте Дукат) доприноси у значајној мери толерантности грашка на сушу. Ови резултати су указали на потребу да се за разумевање биохемијских реакција биљака у суши укључе и испитивања других хормона и њихове интеракције са АБА. Такође треба истаћи и допринос испитивања експресије гена (*PsAO1*, *PsAO2* и *PsAO3*) од којих зависи коначна биосинтеза АБА. Ови резултати су указали на кључну улогу *PsAO1* и, посебно *PsAO3* гена и у осмотском и стресу суше.

Од посебног значаја су и резултати мерења активности антиоксидативних ензима (супероксид дисмутазе, аскорбат пероксидазе и глутатион редуктазе) који су показали повећање код толерантних генотипова на осмотски и стрес суше, као и резултати анализе гена (*Cu/Zn SOD*, *cAPx*, *GR*) који кодирају ове ензиме и чија експресија расте код толерантних генотипова грашка. Ти резултати, уз резултате тестирања % клијавости и дужине трајања процеса клијања, могу наћи и своју практичну примену за одабир генетичког материјала за селекцију отпорних генотипова грашка на сушу.

На основу свега претходно изнетог Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију мр Гордана Р. Здјелар под насловом “Физиолошке, биохемијске и молекуларне основе толерантности на сушу и осмотски стрес у раним вегетативним фазама развоја одабраних генотипова рода *Pisum*“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да усвоји ову позитивну оцену и омогући кандидаткињи јавну одбрану дисертације.

### Чланови Комисије

Др Томислав Живановић, редовни професор  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду  
(Ужа научна област: Генетика)

Др Радмила Стикић, редовни професор у пензији  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду  
(Ужа научна област: Физиологија гајених биљака)

Др Гордана Шурлан-Момировић, редовни професор у  
пензији  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду  
(Ужа научна област: Генетика)

Др Биљана Вуцелић Радовић, редовни професор  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду  
(Ужа научна област: Биохемија)

Др Вук Ђорђевић, научни сарадник  
Институт за ратарство и повртарство у Новом Саду  
(Ужа научна област: Генетика и оплемењивање  
биљака)

Објављени рад мр Гордане Р. Здјелар у часопису који се налазе на SCI листи:

**Petrović G., Nikolić Z., Đorđević V., Župunski V., Jovičić D., Ignjatov M., Milošević D. (2014):** *Endonuclease heteroduplex mismatch cleavage for detecting mutation genetic variation of trypsin inhibitors in soybean.* Pesquisa Agropecuária Brasileira 49(2): 102-108.