

НАСТАВНО–НАУЧНОМ ВЕЋУ
ФАКУЛТЕТА ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

**Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата
Јасне Симоновић Радосављевић, дипломираног физикохемичара-мастер**

Одлуком Наставно–научног већа Факултета за физичку хемију са II редовне седнице одржане 08.02.2018. године именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Јасне Симоновић Радосављевић, дипломираног физикохемичара-мастера и студента докторских студија Факултета за физичку хемију, под насловом:

**"Праћење оријентације структурних полимера ћелијског зида у јавору (*Acer platanoides*),
Панчићевој оморици (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) и повијуши *Dioscorea balcanica*"**

Ова тема одобрена је одлуком Наставно–научног већа Факултета за физичку хемију на седници одржаној 12.10.2016. године, а сагласност на предлог докторске дисертације Јасне Симоновић Радосављевић добијена је на седници Већа научних области природних наука Универзитета у Београду која је одржана 27.10.2016. године. Кандидат Јасна Симоновић Радосављевић је урађену докторску дисертацију предала Факултету за физичку хемију 02.02.2018. године.

На основу прегледа и анализе докторске дисертације кандидата подносимо Наставно–научном већу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Јасне Љ. Симоновић Радосављевић** написана је на сто (100) страна и у складу са *Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду*. Састоји се из седам главних делова: Увод (2 стране), Преглед литературе (29 страна), Циљ рада (1 стране), Материјал и методе (13 страна), Резултати и дискусија (30 страна), Закључак (2 стране) и Литература – 186 навода (17 страна). Кандидат је уз текст докторске дисертације приложио следеће: списак објављених научних радова из докторске дисертације (1 страна), Биографију (1 страна), као и додатне прилоге прописане правилима Универзитета о подношењу докторске дисертације на одобравање (4 стране). Дисертација садржи укупно 37 слика (од тога је 10 слика из литературе, а 27 слика представља властите резултате) и 3 табеле (све 3 са властитим резултатима).

У поглављу *Увод* укратко су описане тематика и актуелност проблематике која је била предмет истраживања ове докторске дисертације.

У поглављу *Теоријски део* описана је грађа и структура тврдог и меког дрвета и повијуса. Описана је структура и хемијски састав ћелијског зида. Представљени су градивни полимери дрвета (целулоза, хемицелулозе, пектин, лигнин и протеини). Описана је структура и хемијски састав јувенилног и зрелог дрвета, као и реакционог дрвета (тензионо и компресионо дрво).

У поглављу *Циљ рада* приказани су основни циљеви истраживања у оквиру ове докторске дисертације.

У поглављу *Материјал и методе* описане су методе које су коришћене за добијање испитиваних узорака и дат је приказ експерименталних уређаја и метода који су коришћени у току рада.

У поглављу *Резултати и дискусија*, приказани су и дискутовани добијени резултати. Ово поглавље се састоји из четири целине.

У првој целини су представљени резултати добијени применом FTIR микроспектроскопије како би се утврдила разлика између тврдог (листопадног) дрвета и меког (четинар) дрвета, на примеру јавора (*Acer platanoides* L.) и Панчићеве оморице (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně). Идентификовани су спектрални сигнали који се односе на апсорбанције целулозе, хемицелулозе (глукоманана и ксилана) и лигнина, а затим је праћена зависност релативне апсорбанције различитих пикова од поларизационог угла у фрагментима ћелијских зидова грана Панчићеве оморице и јавора.

У другој целини представљени су резултати добијени за утврђивање структурне разлике између ћелијског зида компресионог и нормалног дрвета, на примеру Панчићеве оморице као одговор на стрес код четинара. Идентификовани су спектрални сигнали који се односе на апсорбанције целулозе, хемицелулозе (глукоманана и ксилана) и лигнина, а затим је праћена зависност релативне апсорбанције различитих пикова од поларизационог угла код нормалног и компресионог дрвета Панчићеве оморице.

У трећој целини представљени су резултати добијени за утврђивање структурне разлике између правих и кривих делова код повијуше (*Dioscorea balcanica*) као поређење са формирањем реакционог дрвета код дрвенастих врста. Урађена је хемијска анализа стабљике *D. balcanica*, затим анатомска и хистохемијска анализа стабљике, као и хистохемијска и ултраструктурна анализа ћелијских зидова склеренхима (идентификација присутности желатинозних влакана у увијеним интернодијама), и хистохемијска и ултраструктурна анализа ћелијских зидова паренхима. Структурна организација ћелијских зидова паренхима испитивана је помоћу диференцијално поларизоване ласерско скенирајуће (DP-LS) микроскопије, као и помоћу FTIR микроспектроскопије.

У четвртој целини представљени су резултати добијени применом електронске парамагнетне резонантне (EPR) спектроскопије за утврђивање разлике у количини лигнина код реакционог и нормалног дрвета на примеру Панчићеве оморице и код савијених и правих интернодија повијуше *Dioscorea balcanica*.

2. Приказ постигнутих резултата

Сви експерименти који су урађени у оквиру ове докторске дисертације су имали за циљ истраживање интеракција између полимера у ћелијском зиду различитих дрвенастих биљака, са фокусом на испитивање оријентације полимера у ћелијском зиду и због тога њихове структуралне уређености и уређености зидова као целине.

За утврђивање структурних разлика између тврдог (листопадног) дрвета и меког (четинар) дрвета рађени су експерименти на јавору (*Acer platanoides* L.) и Панчићевој оморици (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně). Показано је да су хемицелулозе (ксилан и глукоманан) у изолованим фрагментима ћелијског зида грана јавора и Панчићеве оморице оријентисане паралелно у односу на целулозу, и претежно паралелне у односу на уздужну осу ћелијског зида. Такође, закључено је да је лигнин оријентисан паралелно у односу на уздужну осу ћелијског зида и код грана јавора и грана Панчићеве оморице. Ипак, оријентација лигнина стриктно не прати оријентацију угљених хидрата, што указује да је лигнин мање повезан са њима.

За утврђивање структурне разлике између компресионог и нормалног дрвета, али и како би се видело да ли постоји веза између спорог раста и јаког компресионог дрвета које се јавља у одговору на гравитропијски стрес, експерименти су рађени на Панчићевим оморицама старим три године, које су савијене под углом од 90 °. Резултати су показали да се микрофибриларни угао код нормалног дрвета смањује, док се код компресионог дрвета повећава у току једне године.

За утврђивање улоге паренхима у савијању повијуша рађени су експерименти на правим и савијеним деловима стабла повијуше (*Dioscorea balcanica*). Резултати указују да адаптација на механичко увијање код повијуша укључује модификације у структури ћелијског зида паренхима. Промене у структури ћелијског зида паренхима које се односе на увијање стабљика укључују: мању количину целулозе (добијено FTIR микроспектрометријом) са разликом у оријентацији целулозних микрофибрила (приказано скенирајућом електронском микроскопијом - SEM), али не постоји разлика у уређености целулозних микрофибрила (добијено DP-LS микроскопијом); мању количину

ксилоглукана (која ограничава покретање целулозних микрофибрила), већу количину ксилана (која се везује са целулозом, и утиче на јачину и еластичност зидова), и већи количину лигнина са модификованом организацијом - мање кондензованог лигнина, појављивање и пораст лигнинских мономерних јединица са неизреагованим C=C везама у бочном ланцу (добијено FTIR микроспектрометријом).

Промењена структура ћелијског зида паренхима у увијеним интернодијама *D. balcanica*, која доводи до смањења крутости, веће чврстоће и повећане еластичности, могуће настаје због потребе за живим паренхимским ћелијама у увијеним деловима стабљике и због повећане флексибилности ћелијских зидова (како би се подржала сила увијања), тако и због повећане чврстоће ћелијског зида (како би се одупрла механичком напону развијеном у увијеним деловима стабљике).

EPR спектроскопија је коришћена за утврђивање разлике у количини лигнина преко лигнинског радикала код реакционог и нормалног дрвета на примеру Панчићеве оморике и повијуше *D. balcanica*. Присуство лигнина значајно је веће у компресионом делу (саме кривине и изнад кривине) Панчићеве оморике, него у контролном (правом) стаблу, као и у опозитној страни дрвета. Количина лигнина највећа је у петој и шестој интернодији стабљике *D. balcanica* које су увијене, јер са повећаном лигнификацијом долази и до јачег увијања и учвршћивања око ослонца.

3. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Ћелијски зид влакана дрвета може се сматрати као нано-композит, у којем су целулоза, лигнин и хемицелулоза (ксилан и глукоманан) комплексно повезани. Структурна организација полимера дрвета у ћелијском зиду је веома комплексна и још увек чека свој детаљан опис на ултраструктурном нивоу. Организација и својства полимера дрвета у великој мери одређују својства влакана и дрвета, па је и разумевање интеракција између ових полимера кључ за генетски развој побољшаног дрвета и квалитета влакана [Salmén (2004) *C. R. Biologies* 327 (9-10): 873-880]. Ћелијски зид се састоји од неколико слојева, од примарног зида (P), спољашњег секундарног зида (S1), средњег секундарног зида (S2) и унутрашњег секундарног зида (S3). Због своје релативно веће дебљине у односу на друге слојеве ћелијског зида (80% тежински), особине S2 слоја су доминантне у ћелијском зиду.

Целулоза је полимер у облику правог ланца који има проширене и доста круте штапићасте конформације [Salmon S, Hudson SM (1997) *J Macromol Sci C*37:199-263]. Она даје механичку снагу ћелијском зиду, због своје релативно паралелне оријентације са уздужном осом ћелијског зида [Marchessault RH (1962) *Pure Appl Chem* 5: 107-129; Åkerholm M, Salmén L (2001) *Polymer* 42: 963-969]. Основна разлика између хемицелулоза тврдог и меког дрвета је у садржају ксилана и глукоманана. У чврстом дрвету је присутна већа количина ксилана, док је количина глукоманана већа у меком дрвету [Aspinall GO (1980) In: Priess J (ed) *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. Academic Press, New York, 477–500]. Ксилан у меком дрвету се такође разликује од ксилана у чврстом дрвету по недостатку ацетил група [Liang CY, Basset KH, McGinnes EA, Marchessault RH (1960) *Tappi* 43, 232-235]. Спектроскопске и микроскопске студије о лигнину показују да има уређену структурну организацију [Atalla RH, Agarwal UP (1985) *Science* 227, 636-638; Radotic K, Simic-Krstic J, Jeremic M, Trifunovic M (1994) *Biophys. J.* 66, 1763-1767; Mičić M, Jeremić M, Radotić K, Mavers M, Leblanc R (2000) *Scanning* 22, 288-294]. Постоје разлике у лигнинским мономерним прекурсорима у ћелијским зидовима ове две врсте дрвета. Лигнин у меком дрвету садржи јединице гвајакола, док лигнин у чврстом дрвету садржи и гвајакол и сирингил мономере [Sarkanen KV and Ludwig CH (1971) *Lignin: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. ed. Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. Wiley-Interscience: New York. pp 43-94]. Иако је познато да су у основи ћелијског зида целулозни микрофибрили тесно уграђени у матрикс лигнина и хемицелулозе, склоп ових компоненти у ћелијском зиду, као и структурна организација нису довољно проучене. Разумевање распореда и оријентације односно уређености полимера у ћелијском зиду је важно за разумевање механичких својства дрвета, као одговора биљке на стрес, али такође и за могућу примену дрвета као извора нових биоматеријала. Већина студија које се односе на оријентацију се фокусирају само на оријентацију целулозних микрофибрила. Међутим, организација преосталих полимера дрвета је од значаја код разумевања формирања ћелијског зида током раста. Током процеса формирања ћелијског зида хемицелулозе се депонују истовремено са организацијом целулозних микрофибрила [Attala et al. 1993; Terashima et al. (2009) *J. Pulp Pap. Sci.* 16, J150-J155]. Ранија истраживања су показала да различити полимери ћелијског зида различито доприносе механичким особинама зида, у односу на оријентацију целог зида [Bergander A, Salmén L. (2002) *J. Mater. Sci.*; 37: 151-

156]. Паралелна оријентација целулозе у односу на уздужну осу ћелијског зида је важна за механичке особине ћелијског зида. Ово је уочено и у експерименталним [Åkerholm M, Salmén L (2001) *Polymer* 42: 963-969], а и у модел-студијама [Bergander A, Salmén L. (2002) *J. Mater. Sci*; 37: 151-156], где је показано да готово једино константа еластичности целулозе одређује особине еластичности ћелијског зида. У овој дисертацији је показано да су хемицелулозе (ксилан и глукоманан) у изолованим фрагментима ћелијског зида грана јавора и Панчићеве оморике оријентисане паралелно у односу на целулозу, и претежно паралелне у односу на уздужну осу ћелијског зида. Такође, уочено је да је лигнин оријентисан паралелно у односу на уздужну осу ћелијског зида и код грана јавора и код грана Панчићеве оморике, као и да оријентација лигнина стриктно не прати оријентацију угљених хидрата, што указује да је лигнин мање повезан са њима.

Познато је да механички стрес може да промени начин раста многих биљних врста, што доводи до производње веће или мање количине реакционог дрвета. У меком дрвету, то је компресионо дрво које настаје у доњем делу гране, док је у тврдом дрвету, то тензионо дрво, које се налази са горње стране гране. Ополитно дрво, на супротној страни гране, има сличну структуру као стабло. Реакционо дрво подразумева репрограмирање гена укључених у формирање ћелијског зида и стога значајно утиче на својства дрвета [D'ejardin A, Lep'le JC, Lesage-Descauses MC, Costa G, Pilate G (2004) *Plant Biol.* 6: 55–64]. Компресионо дрво се јавља код свих четинара. Ово реакционо дрво је резултат геотропског одговора дрвета, услед нагињања стабала [Timell TE (1986) *Compression wood in gymnosperms.* Springer-Verlag, Heidelberg Wardrop AB, Dadswell HE (1950) *Aust J Biol Sci* 3:1-13]. Главна карактеристика компресионог дрвета су измене у структури ћелијског зида. У поређењу са нормалним дрветом, компресионо дрво садржи веће количине лигнина и (1 → 4) -β-галактана и пропорционално ниже количине целулозе, манана и ксилана. Састав ћелијског зида компресионог дрвета варира у зависности од јачине компресије, са већом количином лигнина и галактана у јако израженом компресионом дрвету и мањим количинама у блаже израженом компресионом дрвету [Nanayakkara B, Manley-Harris M, Suckling ID, Donaldson LA (2009) *Holzforschung* 63: 431-439]. Компресионе дрво обично има већи микрофибриларни угао (MFA) у S2 слоју у односу на нормално дрво [Wardrop AB, Dadswell HE (1950) *Aust J Biol Sci* 3:1-13; Donaldson LA (2008) *IAWA J* 29:345-386]. Термин микрофибриларни угао (MFA) у науци о дрвету

односи се на угао између правца целулозних микрофибрила у секундарном ћелијском зиду (S2) и осе ћелије. У овој докторској дисертацији праћене су структурне разлике између компресионог и нормалног дрвета. Такође, акценат је био и на томе да се види да ли постоји веза између спорог раста и јаког компресионог дрвета које се јавља у одговору на гравитропијски стрес и резултати су показали да се микрофибриларни угао код нормалног дрвета смањује, док се код компресионог дрвета повећава у току једне године.

Како би открили могућу улогу ћелија паренхима код механизма увијања код повијуше *D. balcanica*, у овој докторској дисертацији фокус је био на разликама у структури ћелијског зида паренхимских ћелија код правих и увијених интернодија стабљике. Урађене су квалитативне и квантитативне хемијске анализе свих интернодија, као и микроскопске анализе (DP-LS микроскопија и FTIR микроспектроскопија) ћелијских зидова паренхима на попречним пресецима стабљике. Ћелијски зидови желатинозних влакана, која су карактеристична за склеренхимске ћелије, а и познате компоненте тензионог дрвета, су одговорни за увијање стабљика повијуша [Bowling AJ, Vaughn KC (2009) *Am J Bot* 96: 719-727]. У увијеним стабљикама присуство желатинозних влакана се повезује са способношћу стабљике да се увија око ослонца. Желатиозна влакна су посебно присутна у деловима који су у директном контакту са ослонцем [Meloche CG, Кнох JP, Vaughn KC (2007) *Planta* 225: 485–498], а нису присутна или су ретка у деловима стабљика који се не увијају [Bowling AJ, Vaughn KC (2009) *Am J Bot* 96: 719-727]. Код тензионог дрвета унутрашњи слој ћелијског зида се састоји или само од целулозе, без лигнина, или касније код неких врста буде лигнификован [Roussel JR, Clair B (2015) *Tree Physiol.* 35: 1366–1377; Alméras T, Clair B. (2016) *J. R. Soc. Interface* 13: 20160550]. Код *Simarouba amara* (врста чије тензионо дрво има лигнификован желатинозни слој), оптичким микроскопом је готово не приметна разлика између тензионог и нормалног дрвета, осим што је јасно видљива разлика у оријентацији целулозних микрофибрила који су код тензионог дрвета готово паралелни са осом влакна [Ruelle J, Yamamoto H, Thibaut B (2007) *BioResources* 2: 235-251; Roussel JR, Clair B (2015) *Tree Physiol.* 35, 1366–1377]. У овој докторској дисертацији резултати светлосне и SEM микроскопије показују да су разлике између склеренхимских ћелија на тензионој и опозитној страни увијених интернодија *D. balcanica* видљиве само помоћу SEM микроскопије и указују на то да желатинозни фибрили стабљике *D. balcanica* имају лигнификован желатинозни слој.

Такође, у ћелијским зидовима других ткива се дешавају структурне промене које се односе на увијање. Köhler и др. [Köhler L, Speck T, Spatz HC (2000) *Planta* 210: 691–700] су предложили да до пораста у стабилности током развоја две увијајуће *Aristolochia* врстее, долази због комплементарних ефеката: повећања укупне количине материјала ћелијског зида (задебљања ћелијског зида у ксилему), промене у целулозном микрофibrларном углу, и лигнификација. Ипак, структурне промене у ћелијском зиду паренхима до којих долази услед увијања стабљике код повијуше су мање познати. Истраживања оријентације целулозних микрофibrила у ћелијском зиду су углавном фокусирана на одређивању микрофibrларног угла, и углавном у влакнима и трахеидама [Barnet JR, Bonham VA (2004) *Biol Rev* 79, 461–472], док је у овој докторској дисертацији фокус на утврђивању уређености целулозних микрофibrила у X-Y равни у ћелијским зидовима паренхима. Резултати у докторској дисертацији указују да адаптација на механичко увијање код повијуша укључује модификације у структури ћелијског зида паренхима. Промене у структури ћелијског зида паренхима које се односе на увијање стабљика укључују: мању количину целулозе (добијено FTIR микроспектроскопијом) са разликом у оријентацији целулозних микрофibrила (приказано SEM микроскопијом), али не постоји разлика у уређености целулозних микрофibrила (добијено DP-LS микроскопијом); мању количину ксилогукана (која ограничава покретање целулозних микрофibrила), већу количину ксилана (која се везује са целулозом, и утиче на јачину и еластичност зидова), и већи количину лигнина са модификованом организацијом - мање кондензованог лигнина, појављивање и пораст лигнинских мономерних јединица са неизреагованим C=C везама у бочном ланцу (добијено FTIR микроспектроскопијом).

Лигнин садржи значајну количину стабилних органских радикала. Rex (1960) је први детектовао ове радикале применом EPR спектроскопије и показао да је концентрација лигнина веома мала ($< 10^{14}$ spin/g), да би касније истраживање наставили Van der Каа и др. (1961) и Steenlik и др. (1963) [Rex R W (1960) *Nature* 188: 1185–1186; Van der Каа JM, Duchesne J and Depireaux J (1961) *Geochem. et Cosmochim. Acta* 23: 209-218; Steelink C (1964) 28: 1615–1622]. Претпоставља се да су радикалске врсте семихинон радикали стабилизовани у полифенолном лигнинском матриксу [Steelink C (1964) *Geochim. Cosmochim. Acta* 28: 1615–1622; Steelink C (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87:2056; Steelink C, Hansen R E (1966) *Tetrahedron Lett.* 7: 105–111; Fitzpatrick JD and Steelink C (1969)

Tetrahedron Letters 10 (57): 5041-5044]. Доказано је да је лигнин укључен у процесе који штите ћелију од различитих стресора [Lewis N. G. and Yamamoto E. (1990) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 41: 455-496; Moura MS, Valencise Bonine JC, Dornelas MC, Mazzafera P (2010) Journal of Integrative Plant Biology 52: 360–376]. У овој докторској дисертацији EPR спектроскопија коришћена је за утврђивање разлике у количини лигнина преко лигнинског радикала код реакционог и нормалног дрвета на примеру Панчићеве оморике и повијуше *D. balcanica*. Присуство лигнина знатно је веће у компресионом делу стабла Панчићеве оморике него у контролном (правом) стаблу, као и у опозитној страни дрвета. Количина лигнина је највећа код интернодија стабљике *D. balcanica* које су увијене, јер са повећаном лигнификацијом долази и до јачег увијања и учвршћивања око ослонца. Köhler и др. (2000) су показали да у увијајућој *Aristolochia* врсти долази до лигнификације током раста, а да у комбинацији повећане количине лигнина и желатинозних влакана која су посебно присутна у деловима који су у директном контакту са ослонцем, долази до јачег увијања и учвршћивања за ослонац [Meloche CG, Knox JP, Vaughn KC (2007) Planta 225: 485–498].

4. Научни радови у којима су публиковани резултати из докторске дисертације

Радови у врхунским међународним часописима (M21)

- 1. Simonović J, Stevanić J, Djikanović D, Salmén L, Radotić K (2011) Anisotropy of cell wall polymers in branches of hardwood and softwood: a polarized FTIR study. Cellulose 18 (6): 1433-1440**
- 2. Salmén L, Olsson A-M, Stevanic J, Simonović, J, Radotić K (2012) Structural organisation of the wood polymers in the wood fibre structure. BioRes. 7(1), 521-532.**
- 3. Simonović Radosavljević J, Bogdanović Pristov J, Mitrović A, Steinbach G, Mouille G, Tufegdžić S, Maksimović V, Mutavdžić D, Janošević D, Vuković M, Garab G, Radotić K (2017) Parenchyma cell wall structure in twining stem of *Dioscorea balcanica*. Cellulose 24 (11): 4653–4669**

5. Закључак комисије

На основу изложеног, сматрамо да резултати кандидата Јасне Симоновић Радосављевић представљају оригиналан и значајан научни допринос у области биофизичке хемије. Сходно томе, предлажемо Наставно–научном већу Факултета за физичку хемију, Универзитета у Београду, да докторску дисертацију кандидата Јасне Симоновић Радосављевић под насловом: "Праћење оријентације структурних полимера ћелијског зида у јавору (*Acer platanoides* L.), Панчићевој оморици (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) и повијуши *Dioscorea balcanica*", прихвати и одобри њену одбрану, чиме би били испуњени сви услови да кандидат стекне звање доктора физичкохемијских наука.

Чланови Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације:

др Милош Мојовић, ванредни професор,
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Ксенија Радотић Хаџи-Манић, научни
сарадник,
Институт за мултидисциплинарна истраживања, Универзитет у Београду

др Јасмина Димитрић-Марковић, редовни професор,
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

У Београду,
