

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На III редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14. децембра 2018. године, прихваћен је извештај ментора др Невене Бањац и др Светлане Радовић о урађеној докторској дисертацији Мариане Ј. Станишић, истраживача сарадника у Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” Универзитета у Београду, под насловом **„Алелопатски потенцијал секундарних метаболита трансформисаних коренова јабуке – ефекат флоретина и флоризина у култури *in vitro*”**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Невена Бањац, научни саветник Универзитета у Београду - Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, др Светлана Радовић, редовни професор Универзитета у Београду - Биолошки факултет, др Славица Нинковић, научни саветник Универзитета у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, др Душица Јаношевић, ванредни професор Универзитета у Београду - Биолошки факултет и др Татјана Ћосић, научни сарадник Универзитета у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Мариане Ј. Станишић под називом **„Алелопатски потенцијал секундарних метаболита трансформисаних коренова јабуке – ефекат флоретина и флоризина у култури *in vitro*”**, урађена је у Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду и садржи следеће целине: Насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о менторима и члановима Комисије, Захвалницу, Сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област и Ужа научна област), Садржај, Скраћенице, текст рада по поглављима, као и Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије дисертације и Изјаву о коришћењу. Докторска дисертација написана је на укупно 247 страна и садржи следеће целине: Увод (37 страна), Циљ (2 стране), Материјал и методе (33 стране), Резултати (66 страна), Дискусија (42 стране), Закључци (3 стране) и Литература (61 страна, 518 библиографских јединица), као и Прилог (5 страна). Дисертација је илустрована са 40 слика и садржи 21 табелу.

## Анализа докторске дисертације:

Феномен алелопатије, односно појава да биљка путем својих секундарних метаболита, означених као алелохемикалије, утиче на клијање, растење и развиће других биљака у окружењу, забележен је и код појединих дрвенастих врста, укључујући црни орах (*Juglans nigra*), кисело дрво (*Ailanthus altissima*) и еукалиптус (*Eucalyptus camaldulensis*). Међутим, литературни подаци о алелопатском потенцијалу јабуке, листопадне, дрвенасте воћне врсте из фамилије Rosaceae, су изузетно оскудни. Докторска дисертација Мариане Станишић односи на истраживање алелопатског потенцијала трансформисаних коренова јабуке, који имају способност самосталног раста *in vitro*. Резултати истраживања о утицају њиховог ексудата на тест биљку *Arabidopsis thaliana* указују на знатан алелопатски потенцијал коренова јабуке, значај главног секундарног метаболита јабуке флоризина и његовог агликона флоретина у алелопатском утицају јабуке, као и на потенцијалне механизме овог алелопатског дејства.

У **Уводу**, кандидаткиња Мариана Станишић, у четири тематске целине даје јасан преглед актуелних истраживања која се односе на проблематику докторске дисертације. У делу „Јабuka (*Malus × domestica* Borkh.)” кандидаткиња нас упознаје са предметом ове дисертације, воћном врстом *Malus × domestica* дајући њен детаљан опис, карактеристике и значај, као и кратак опис четири сорте јабуке које су коришћене у овом раду. У делу „Фенолна једињења као најзаступљенији секундарни метаболити јабуке” кандидаткиња даје преглед класа фенолних једињења јабуке са посебним освртом на дихидрохалконе флоризин и флоретин. Сем описа ове групе секундарних метаболита, кандидаткиња се у овом делу осврће и на њихов биосинтетички пут, варијације њиховог садржаја у ткивима, као и на потенцијалну физиолошку улогу ових једињења у јабуци. У делу „Алелопатија“ описан је појам алелопатије и алелохемикалија и наведена могућа примена алелохемикалија, посебно фенолних једињења, као биохербицида. Користећи најновију литературу кандидаткиња даје врло детаљан осврт на механизме деловања ових алелохемикалија. У делу „Биотехнологија у служби проучавања алелопатије“ кандидаткиња нас уводи у свет биотехнологије, са посебним освртом на генетичку трансформацију јабуке помоћу *Agrobacterium rhizogenes* вектора, описује услове за успостављање културе трансформисаних коренова и њихове карактеристике. У овом делу кандидаткиња значајну пажњу посвећује могућности коришћења културе коренова у производњи алелохемикалија и у изучавању феномена алелопатије. Како је изолација и карактеризација секундарних метаболита који се излучују путем корена у земљиште компликована и отежана због комплексности ризосфере и могућности различитих утицаја, успостављање система у којем би ови утицаји били елиминисани а ексудација алелохемикалија олакшана, као и њихова анализа, у многоме омогућава лакши и бољи приступ изучавања феномена алелопатије. Тако би култура трансформисаних коренова јабуке, који перманентно расту у условима *in vitro* независно од надземног дела биљке и без примене регулатора растења, била погодан експериментални модел за проучавање алелопатског потенцијала коренова јабуке.

Полазећи од ових основа, кандидаткиња је у поглављу **Циљ рада** за научни циљ својих истраживања поставила утврђивање алелопатског потенцијала трансформисаних коренова јабуке, са посебним освртом на алелопатску улогу секундарних метаболита флоризина и флоретина у условима *in vitro*. Овај научни циљ разложен је на низ непосредних експерименталних задатака: а) успостављање система за регенерацију изданака јабуке из

листова путем *de novo* органогенезе, утицај  $\beta$ -лактамских антибиотика на процес регенерације и на крају, дефинисање услова за перманентно гајење културе изданака јабуке; б) генетичка трансформација изданака јабуке са *Agrobacterium rhizogenes* 15834, успостављање перманентне културе коренова, оптимизација услова за гајење и молекуларна карактеризација трансформисаних коренова јабуке, као и идентификација и квантификација њихових потенцијалних алелохемикалија; в) испитивање алелопатског потенцијала трансформисаних коренова као и секундарних метаболита флоретина и флоризина на растење и развиће клијанаца *Arabidopsis thaliana in vitro*; г) праћење експресије појединих гена или група гена укључених у процесе растења и развића клијанаца *A. thaliana* након алелопатског третмана, као и ултраструктурних промена у ћелијама третираних изданака.

У поглављу **Материјал и методе** јасно и детаљно су описане методе које су сврсисходно одабране на основу проблематике и циљева истраживања. Прво је приказан начин рада са биљним материјалом *in vitro*. Детаљно је описан поступак стерилизације, изолације и гајења пупољака јабуке, затим оптимизације услова за *de novo* регенерацију изданака из експлантата листова, третман  $\beta$ -лактамским антибиотцима, као и одржавање и умножавање културе изданака четири сорте јабуке као почетног материјала за трансформацију помоћу *A. rhizogenes*. Затим је описано гајење бактерија *A. rhizogenes* 15834, начини инокулације експлантата и добијање трансформисаних коренова, услови за успостављање културе и повећање продукције биомасе трансформисаних коренова. Описана је RT-PCR анализа помоћу које је извршена молекуларна карактеризација трансформисаних коренова праћењем експресије гена из  $T_R$  (*rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*) и  $T_L$ -региона (*aux1* and *aux2*) T-DNA. Садржај потенцијалних алелохемикалија у кореновима и хранљивом медијуму у коме су коренови гајени је анализиран течном хроматографијом под ултра-високим притиском са масеном спектрометријом (UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS). Алелопатски утицај трансформисаних коренова, као и чистих супстанци флоретина или флоризина, је оцењен праћењем морфолошких параметара третираних клијанаца тест биљке *A. thaliana* екотип Columbia (Col-0) у култури *in vitro*. Стандардне статистичке методе коришћене су за анализу и обраду добијених података. Промена нивоа акумулираних транскрипционих продуката гена укључених у поларни транспорт ауксина, биосинтезу ауксина и гиберелина, контролу ћелијског циклуса (циклина и киназа зависних од циклина), као и гена за транскрипциони фактор WOX7 праћена је у различитим временским тачкама након алелопатског третмана коришћењем qRT-PCR анализе. У последњем поглављу описана је ултраструктурна анализа ћелија мезофила клијанаца *A. thaliana* третираних флоретином, која је извршена помоћу трансмисионе електронске микроскопије (енг. *Transmission Electron Microscopy* - TEM).

У поглављу **Резултати**, кандидаткиња податке добијене из спроведених експеримената приказује кроз логично организоване целине. Презентација резултата је подржана одговарајућим графицима, фотографијама и табелама, уз примену одговарајуће статистичке обраде.

У првој целини приказани су резултати који се односе на дефинисање оптималних *in vitro* услова за *de novo* органогенезу јабуке, сорти Мелроуз и Златни Делишес, из одсецака листова. Показало се да су тронедељни предтретман експлантата у мраку, уз одговарајућу оријентацију експлантата према подлози, и употреба агара као агенса за учвршћивање подлоге уз примену тидиазурона (TDZ) били кључни фактори за ефикасну индукцију органогенезе код обе сорте јабуке, као и да је  $\beta$ -лактамски антибиотик цефотаксим допринео повећању регенеративног одговора код сорте Златни Делишес, а меропенем

унапредио раст и развиће изданака.

Другу целину чине резултати експеримената генетичке трансформације помоћу *A. rhizogenes* 15834 вектора. Анализирана је и поређена ефикасност трансформације изданака четири сорте јабуке коришћењем два начина инокулације: повређивањем стабла изданака јабуке иглом инфицираном бактеријском суспензијом или урањањем базалног одсеченог дела стабла у бактеријску суспензију. Утврђено је да ефикасност трансформације зависи од сорте јабуке и примењеног метода инокулације. Регенерисани коренови су изоловани са матичних изданака и успостављена је перманентна култура трансформисаних линија коренова *in vitro*. Извршена је њихова молекуларна карактеризација и оптимизирани су услови за *in vitro* гајење који обезбеђују највећу продукцију биомасе.

У трећој целини приказани су резултати анализе садржаја фенолних једињења у трансформисаним кореновима и у течной хранљивој подлози у којој су коренови расли. Флоризин је детектован као доминантан секундарни метаболит у кореновима, док је заједно са својим агликоном флоретином детектован и у течной хранљивој подлози.

У следећој целини приказани су ефекти ексудата трансформисаних коренова јабуке садржаних у течной хранљивој подлози у којој су коренови расли, као и чистих једињења флоризина и флоретина на клијање и развиће клијанаца *A. thaliana*. Показано је да је њихов алелопатски ефекат био усмерен на ометање раста и развоја клијанаца док није примећен негативан ефекат на клијање семена *A. thaliana*.

У петој целини приказани су резултати анализе експресије гена укључених у поларни транспорт ауксина, биосинтезу ауксина и гиберелина, контролу ћелијског циклуса, као и гена за транскрипциони фактор WOX7 код клијанаца *A. thaliana* третираних ексудатом трансформисаних коренова или флоретином. Промене у експресији су биле знатно израженије у кореновима третираних клијанаца у поређењу са изданцима, док сличан образац промене забележен у третману ексудатом коренова и чистим флоретином указује на могуће механизме њиховог алелопатског дејства.

У последњој целини приказани су алелопатски ефекти флоретина на ултраструктуру ћелија мезофила клијанаца *A. thaliana*, који су се посебно одразили на промене на ћелијском зиду и хлоропластима.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња компетентно тумачи резултате и пореди их са релевантним подацима из литературе. Добијени резултати разматрани су у оквиру посебних целина које прате презентацију самих резултата. Текст у овом поглављу показује добро познавање и разумевање проблематике и способност кандидаткиње да објективно оцени своја и туђа достигнућа.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња јасно и детаљно износи низ закључка проистеклих из добијених резултата. Полазећи од постављених циљева и задатака ове докторске дисертације Комисија истиче следеће закључке – а) успостављени су ефикасни протоколи за индукцију трансформисаних коренова из изданака четири сорте јабуке помоћу *A. rhizogenes* 15834, б) по први пут је добијена перманентна култура трансформисаних коренова јабуке захваљујући смени хранљивих подлога са и без ауксина, в) генетичка трансформација није довела до промена у садржају главних секундарних метаболита корена, тако да култура трансформисаних коренова може бити погодан модел систем за изучавање алелопатског потенцијала корена јабуке, г) дихидрохалкон флоризин је

доминантан секундарни метаболит у кореновима јабуке, док је у њиховом ексудату детектован заједно са својим агликоном флоретином, д) ексудат трансформисаних коренова као и чисти флоризин и флоретин делују инхибиторно на раст и развој клијанаца *A. thaliana*, њ) сличан образац промене нивоа експресије гена укључених у поларни транспорт ауксина, биосинтезу ауксина и гиберелина, као и гена за транскрипциони фактор *WOX7* код клијанаца третираних ексудатом трансформисаних коренова и клијанаца третираних флоретином, указује да се механизам алелопатског дејства коренова јабуке може заснивати на променама нивоа ауксина и гиберелина, и на њиховој интеракцији, као и да флоретин може бити потенцијално одговоран за овај алелопатски ефекат.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** приказана је листа од 518 цитираних библиографских јединица, која представља исцрпан преглед научне литературе у области релевантној за урађену дисертацију. Публикације су цитиране адекватно и на одговарајућим местима у тексту дисертације, тако да доприносе објашњењу и афирмацији добијених резултата.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

#### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

1. Mitić N, **Stanišić M**, Milojević J, Tubić Lj, Ćosić T, Nikolić R, Ninković S, Miletić R (2012): Optimization of *in vitro* regeneration from leaf explants of apple cultivars Golden Delicious and Melrose. **HortScience** **47(8): 1117-1122. M22**  
<http://hortsci.ashspublications.org/content/47/8/1117.full>
2. **Stanišić M**, Ninković S, Savić J, Ćosić T, Mitić N (2018): The effects of  $\beta$ -lactam antibiotics and hygromycin B on *de novo* shoot organogenesis in apple cv. Golden Delicious. **Archives of Biological Sciences** **70(1): 179-190. M23**  
<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0354-46641700037S>

#### **Б2. Радови у часописима домаћег значаја**

/

#### **Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

1. **Stanišić M**, Mitić N, Savić J, Ćosić T, Smigočki A, Ninković S (2013): Establishment of apple hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* vector carrying the serine proteinase inhibitor gene. **1<sup>st</sup> International Conference on Plant Biology, Subotica, Serbia. Book of abstracts, p 65, M34**
2. **Stanišić M**, Ninković S, Savić J, Ćosić T, Mitić N (2015): The effect of antibiotics on shoot regeneration in apple cultivar "Golden Delicious". **2<sup>nd</sup> International Conference on Plant Biology, Petnica, Serbia. Book of abstract, p 28, M34**
3. **Stanišić M**, Ćosić T, Savić J, Krstić-Milošević D, Mišić D, Smigočki A, Ninković

S, Mitić N (2018) Transgenic hairy root *in vitro* culture system of apple as a tool for allelopathic studies. **3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Biology, Belgrade, Serbia, p 55, M34**

4. **Stanišić M, Ćosić T, Savić J, Smigočki A, Ninković S, Mitić N (2018) Allelopathic effect of apple hairy root exudates on the germination and seedlings growth of *Arabidopsis thaliana in vitro*. 3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Biology, Belgrade, Serbia, p 55, M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

/

## Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација кандидаткиње **Мариане Ј. Станишић** под насловом „Алелопатски потенцијал секундарних метаболита трансформисаних коренова јабуке – ефекат флоретина и флоризина у култури *in vitro*” представља оригиналан допринос проучавању ефеката и механизма алелопатског дејства коренова јабуке које, освртом на досадашње литературне податке, није изучавано. Општи закључак је да изложени резултати представљају добру полазну основу за даља проучавања ефеката и механизма алелопатског дејства секундарних метаболита јабуке флоретина и флоризина, која би могла дипринети расветљавању њихове улоге у развоју симптома болести јабуке познате као SARD (енг. *Specific Apple Replant Disease*), као и разматрању о могућој примени ових једињења као нових еколошки безбедних хербицида. Ово указује да резултати добијени у овој дисертацији, поред фундаменталног значаја, имају и апликативни потенцијал. Чланови Комисије посебно истичу да је кандидаткиња Мариана Станишић показала висок степен самосталности током израде дисертације, као и способност да изабере и на адекватан начин примени савремене методе и приступе и да добијене резултате објави у међународним часописима. Анализа резултата у контексту постојеће литературе, као и њихова јасна интерпретација и тумачење указују да кандидаткиња поседује широко теоријско знање и разумевање научне проблематике, о чему сведоче како публикације и саопштења из саме дисертације, тако и из уже научне области. Све ово указује на научну зрелост кандидаткиње и способност да самостално креира и руководи научним истраживањима. Треба истаћи да је кандидаткиња добитник награде за најбољу постер презентацију резултата докторске дисертације на Симпозијуму међународног значаја „3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Biology, Belgrade, June 2018”. На основу наведеног, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену Комисије и да одобри кандидаткињи Мариани Ј. Станишић јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Алелопатски потенцијал секундарних метаболита трансформисаних коренова јабуке – ефекат флоретина и флоризина у култури *in vitro*”.

У Београду, 17. децембар 2018. године.

**КОМИСИЈА:**

---

**др Невена Бањац**

научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”

---

**др Светлана Радовић**

редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет

---

**др Славица Нинковић**

научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”

---

**др Душица Јаношевић**

ванредни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет

---

**др Татјана Ћосић**

научни сарадник, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”