

Биолошки факултет
Број захтева: 33/182-1
Датум: 10.7.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Сузана М. Павловић**

студент докторских студија на студијском програму Биологија, Физиологија и молекуларна биологија биљака.

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Ефекат експресије гена за протеин киназу 1 дувана (*NPKI*) код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на развој толеранције према повишеним концентрацијама NaCl *in vitro*“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 26.02.2015. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-686/2-15 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Ефекат експресије гена за протеин-киназу 1 дувана (*NPKI*) код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на развој толеранције према повишеним концентрацијама NaCl *in vitro*“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 17.04.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/83-17.04.2015. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Невена Митић	научни саветник	физиологија и молекуларна биологија биљака	Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
2.	др Душица Јаношевић	ванредни професор	физиологија и молекуларна биологија биљака	Универзитет у Београду- Биолошки факултет
3.	др Бранка Винтерхалтер	научни саветник	физиологија и молекуларна биологија биљака	Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 10. јула 2015. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата

3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.

4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/182-10.7.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на IX редовној седници одржаној 10.7.2015. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Сузане Павловић, под називом:

„Ефекат експресије гена за протеин-киназу 1 дувана (NPK1) код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на развој толеранције према повишеним концентрацијама NaCl *in vitro*“.

Универзитет је дана 26.02.2015. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-686/2-15 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Suzana Pavlović, Branka Vinterhalter, Nevena Mitić, S.Adžić, N.Pavlović, M.Zdravković and D.Vinterhalter (2010): *In vitro* shoot regeneration from seedling explants in *Brassica* vegetables: red cabbage, broccoli, Savoy cabbage and cauliflower. Arch. Biol. Sci., 62(2), 337-345. **M23**

Suzana Pavlović, Branka Vinterhalter, Snežana Zdravković-Korać, Dragan Vinterhalter, Jasmina Zdravković, Dejan Cvikić, Nevena Mitić (2013): Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113 (3), 397-406. **M21**

Декан Биолошког факултета

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 17.04.2015. године, прихваћен је извештај ментора др Невене Митић и др Душице Јаношевић о урађеној докторској дисертацији **Сузана М. Павловић**, истраживача сарадника на Институту за повртарство у Смедеревској Паланци, под насловом **„Ефекат експресије гена за протеин-киназу 1 дувана (NPK1) код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на развој толеранције према повишеним концентрацијама NaCl *in vitro*”**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Невена Митић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, др Душица Јаношевић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет и др Бранка Винтерхалтер, научни саветник, Универзитет 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 **Сузана М. Павловић** под називом **„Ефекат експресије гена за протеин-киназу 1 дувана (NPK1) код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на развој толеранције према повишеним концентрацијама NaCl *in vitro*”**, урађена је у Институту за повртарство у Смедеревској Паланци и у Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду.

Рад је написан на укупно 182 стране и организован у седам основних поглавља: Увод (32 стране), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (29 страна), Резултати (57 страна), Дискусија (18 страна), Закључци (2 стране) и Литература (43 стране, 466 библиографских јединица). На последњој страни је дата кратка биографија кандидаткиње. Дисертација садржи 45 слика и 32 табеле, Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Резиме и кључне речи на српском и енглеском језику, Садржај, Списак скраћеница (укупно 17 страна).

У прилогу су дати: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада, Изјава о коришћењу докторског рада (укупно 4 стране).

Анализа докторске дисертације:

Тема и објекат изабрани за ову дисертацију су веома актуелни и у тесној су вези са истраживачким програмом Института за повртарство у Смедеревској Паланци у којој је докторанткиња запослена. У свим сличним институцијама у свету велика пажња се поклања развоју и увођењу нових биотехнолошких метода у програме оплемењивања и селекције. Карфиол (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) је поред купуса интересантан као важна повртарска биљка са широком применом у људској исхрани, а у исто време и веома проблематичан варијетет са аспекта оплемењивања с обзиром на двогодишњи циклус биљака, спорофитну инкомпатибилност и потребу за просторном изолацијом. С друге стране, као култура која се широко гаји у интензивном заливању подложен је дејству различитих биотичких и абиотичких фактора средине тако да је повећање толеранције на ове факторе од посебног значаја за оплемењиваче. Пошто је карфиол проблематичан и са аспекта примене биотехнолошких метода, због малог броја протокола за регенерацију *in vitro* и ефикасну генетичку трансформацију, С. Павловић је усмерила своја истраживања управо у том правцу и у свој рад укључила домаће линије и култиваре *B. oleracea* купусњака који се сматрају перспективним за даљи рад на оплемењивању. У току израде докторске дисертације Сузана Павловић је прво дефинисала услове за успостављање најпогоднијег система за *in vitro* регенерацију карфиола и неколико сродних *B. oleracea* варијетета, што је омогућило добијање биљног материјала, ослобођеног од вируса и патогена, за генетичку трансформацију помоћу *Agrobacterium tumefaciens* вектора. Истражујући услове за ефикасну регенерацију и генетичку трансформацију С. Павловић је имала у виду и далекосежније циљеве који подразумевају могућност коришћења ових поступака за генетичко унапређење карфиола. Сагледавање постојећих литературних података дало је значајне смернице за истраживања трансформације карфиола у циљу развоја толеранције на повећани салинитет и сугерисало да манипулација кључним регулатором МАРК сигналног пута оксидативног стреса *NPK1* (*Nicotinia* протеин-киназа 1) може обезбедити полазну стратегију за развијање толеранције код карфиола што је од значаја за пољопривредну производњу. У ту сврху коришћен је посебно конструисан вектор (ЕНА101/pSHX004) који носи *NPK1* ген дувана одговоран за развој толеранције на стрес и *bar* ген као селективни маркер. С обзиром да *bar* ген омогућује отпорност биљака на тотални хербицид фосфинотрицин (PPT) то трансформисаним биљкама карфиола које су отпорне на стрес даје још један нови додатни квалитет, а то је отпорност на хербицид приликом сузбијања корова.

У Уводу дисертације кандидаткиња даје детаљан преглед литературе и опис на који начин повећане концентрације соли у земљишту утичу на биљке, са посебним освртом на специфичне механизме одговора биљака према овој врсти стреса. Посебан акценат стављен је на улогу коју у одбрамбеном механизму биљака на стрес има МАРК каскадни сигнални пут. У посебном делу докторске тезе представљене су карактеристике и значај повртарских купусњака са посебним освртом на карфиол и изазовима за оплемењиваче. У уводу су затим прегледно дата најважнија досадашња достигнућа о култури ткива карфиола и њему сродних *B. oleracea* варијетета. Регенерација путем органогенезе постигнута је из различитих експлантата, најчешће сегмената клијанаца. Хипокотили клијанаца су издвојени као најподеснији експлантати за регенерацију *in vitro* код већине купусњака. Један од путева регенерације биљака *in vitro* је и процес соматске ембриогенезе. Овај поступак има низ предност у односу на органогенезу, посебно код генетичке трансформације. Код карфиола су соматски ембриони продуктовани

индиректно, из калуса индукованог на сегментима клијанаца и директно из хипокотила клијанаца на подлогама које садрже регулаторе растења. Незрели зиготски ембриони су погоднији за индукцију соматске ембриогенезе јер поседују ембрио компетентне ћелије које могу лако бити преусмерене на ембриогени пут. Од посебног значаја је успостављање директне и секундарне соматске ембриогенезе на хранљивим подлогама без регулатора растења чиме се у знатној мери могу избећи соматскоклонална варирања код регенераната, а која до сада није била успостављена код карфиола. Пролонгирано одржавање ембриона (репетитивна соматска ембриогенеза), понављањем циклуса секундарне ембриогенезе, представља користан систем за умножавање клонова са пожељним карактеристикама, генетичку трансформацију и производњу вештачких семена. Наведени су и досадашњи радови о биотехнологији и генетичкој трансформацији *B. oleracea*, поготово оних које су за циљ имале интродукцију гена за развој особина од економског значаја. Уводни део садржи и друге податке релевантне за резултате који су добијени.

У поглављу **Циљ рада** изложени су научни циљеви и експериментални дизајн докторске дисертације. Основни циљ овог рада био је инкорпорација *NPKI* гена у геном биљака карфиола помоћу *A. tumefaciens* ЕНА101/pSHX004 вектора и регенерација трансформисаних биљака путем претходно развијеног ефикасног система за регенерацију, органогенезе и соматске ембриогенезе, у циљу добијања линија са повећаном толеранцијом на повишене концентрације NaCl и тотални хербицид фосфинотрицин (BASTA®). За реализацију циља постављени су следећи задаци: а) Успостављање оптималних услова за органогенезу и соматску ембриогенезу важних *B. oleracea* купусњака; б) Добијање трансформисаних биљака карфиола помоћу *A. tumefaciens* ЕНА101/pSHX004 вектора и доказивање интеграције и експресије трансгена; ц) Испитивање толеранције трансформисаних биљака карфиола према повишеној концентрацији NaCl *in vitro* и тоталном хербициду фосфинотрицину.

У поглављу **Материјал и методе** јасно и детаљно су описани сви коришћени поступци и методе за стерилизацију семена, изоловање и гајење експлантата добијених од клијанаца различитих *B. oleracea* купусњака: карфиола, купуса, кеља и броколија. Поред тога детаљно је описан поступак добијања, изолације и гајења незрелих ембриона карфиола и купуса као почетног материјала за индукцију соматске ембриогенезе. Дати су састави хранљивих подлога коришћених за *in vitro* гајење и услови гајења у коморама. Описана су методе припреме биљног материјала за хистолошку анализу светлосном микроскопијом и SEM микроскопијом. RAPD-PCR анализом испитивана је генетичка стабилност регенераната добијених путем соматске ембриогенезе. Затим је описано гајење бактерија *A. tumefaciens*, начин инокулације експлантата и добијање трансформисаних биљака. Детаљно су описани поступци за проверу и оцену успешности трансформације као што су хлорофенол-црвено реакција, PCR анализа и провера експресије трансгена RT-PCR и qRT-PCR методом. Описан је и начин третирања трансформисаних биљака повећаним концентрацијама NaCl и тоталним хербицидом фосфинотрицином *in vitro* као и прскање листова адаптираних биљака са хербицидом (BASTA®) у условима стакларе. Дат је преглед анализираних карактеристика, укључујући анализу активности антиоксидативних ензима пероксидаза, каталаза и супероксид дисмутаза, које потврђују отпорности трансформисаних биљака на стрес. Наведене су статистичке анализе које су коришћене у анализи нумеричких података који су добијени у овом раду.

Поглавље **Резултати** састоји се из неколико целина. У првом делу приказани су резултати који се односе на дефинисање оптималних услова за органогенезу различитих *B. oleracea* купусњака: карфиола, купуса, кеља и броколија и соматску ембриогенезу купуса и

карфиола као и за мултипликацију изданака *in vitro*. Показало се да су хипокотили били најподеснији експлантати а бензиламинопурина (ВА), примењен самостално или у комбинацији са ауксином, најефикаснији хормон за индукцију органогенезе код већине тестираних варијетета. Незрели зиготски ембриони ембриони купуса и карфиола показали су се као погодан материјал за индукцију директне соматске ембриогенезе на хранљивој подлози без регулатора растења, а у одсуству регулатора растења успостављена је и репетитивна соматска ембриогенеза. Регенеранти добијени овим путем су били генетички стабилни у поређењу са родитељском биљком.

Другу целину чине резултати експеримената генетичке трансформације помоћу *A. tumefaciens* вектора ЕНА101/pSHX004. Анализирана је и поређена ефикасност трансформације коришћењем два регенеративна пута: органогенезе и соматске ембриогенезе. Утврђено је да соматски ембриони као експлантати уз коришћење репетитивне соматске ембриогенезе и употребу ацетосирингона, у току кокултивационог периода са бактеријама, обезбеђују већу ефикасност трансформације у односу на органогенезу из експлантата хипокотила. Регенерисане биљке селекционисане су на хранљивим подлогама које су садржале фосфинотрицин. Хлорофенол-црвено реакцијом и PCR анализом доказана је успешност трансформације као и експресија оба трансгена, *NPK1* и *bar*. Трансформисане биљке су биле нормалне морфологије и продуковале су семе из кога су добијене T1 биљке, код којих је такође потврђено присуство и експресија оба трансгена.

У трећем делу приказани су резултати анализе отпорности 4 линије трансформисаних биљака на повећан садржај NaCl *in vitro* и на тотални хербицид фосфинотрицин. Трансформисане биљке које садрже *NPK1* ген одликовале су се повећаном толеранцијом према повећаној концентрацији NaCl, а степен толеранције је био пропорционалан нивоу експресије *NPK1* гена. Линија T0-L2 показала је најбољу толеранцију према повишеном садржају NaCl у подлози. Све трансформисане биљке показале су значајан ниво отпорности према тоталном хербициду фосфинотрицину и *in vitro* и *ex vitro*. Резултати експеримената дати су у форми слика, и табела са објашњењима у легендама.

У поглављу **Дискусија** добијени резултати су у оквиру посебних целина коментарисани и упоређивани са оним што су објавили други аутори. Текст у овом поглављу показује добро разумевање проблематике у овој области и способност кандидаткиње да објективно оцени своја и туђа достигнућа.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња јасно и детаљно износи низ закључака проистеклих из добијених резултата. Може се рећи да је С. Павловић у својој дисертацији извршила постављене циљеве. Она је успешно индуковала *in vitro* органогенезу из различитих сегмената клијанаца *B. oleracea* L. варијетета: купуса, карфиола, кеља и броколија и постигла висок степен мултипликације регенерисаних пупољака користећи MS подлогу са ВА у концентрацији 1 mg l⁻¹. Из незрелих ембриона купуса и карфиола успешно је успостављена репетитивна соматска ембриогенеза на хранљивим подлогама без регулатора растења. Користећи репетитивну соматску ембриогенезу као извор експлантата за трансформацију С. Павловић је дефинисала погодан и ефикаснији поступак за трансформацију карфиола помоћу *A. tumefaciens* ЕНА101/pSHX004 вектора. На тај начин добијене су трансформисане биљке код којих су се оба трансгена, *NPK1* и *bar*, експримирали. Интеграција и експресија *NPK1* гена повећала је толеранцију трансформисаних биљака према повећаној концентрацији NaCl у подлози. Линија T0-L2 се посебно истицала у толеранцији која је била у корелацији са измереним нивоом експресије *NPK1* гена. С друге стране, експресија *bar* омогућила је код свих линија високу

отпорност трансформисаних биљака према тоталном хербициду фосфинотрицину (BASTA®).

У поглављу ЛИТЕРАТУРА приказан је списак од 466 цитираних библиографских јединица. Коришћени су релевантни и обимни литературни наводи, што указује на студиозан приступ аутора анализи резултата ове докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Suzana Pavlović**, Branka Vinterhalter, Nevena Mitić, S.Adžić, N.Pavlović, M.Zdravković and D.Vinterhalter (2010): *In vitro* shoot regeneration from seedling explants in *Brassica* vegetables: red cabbage, broccoli, Savoy cabbage and cauliflower. Arch. Biol. Sci., 62(2), 337-345. **M23**
2. **Suzana Pavlović**, Branka Vinterhalter, Snežana Zdravković-Korać, Dragan Vinterhalter, Jasmina Zdravković, Dejan Cvikić, Nevena Mitić (2013): Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 113 (3), 397-406. **M21**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Suzana Pavlović**, Milojević J., Vinterhalter B., Adžić S., Zdravković J., Cvikić D., Mitić N. (2013): Induction of Direct Somatic Embryogenesis from Immature Embryos of *Brassica oleracea* var. *sabauda* L. 6th international symposium on *Brassica* and 18th *Crucifer* Genetics Workshop, 12.-16. November 2012., Catania, Italy, Acta Horticulturae (ISHS), 1005: 239-246. **M33**
2. **Suzana Pavlović**, Branka Vinterhalter, Snežana Zdravković-Korać, Slađan Adžić, Mladen Đorđević, Milan Ugrinović, Nevena Mitić (2013): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of cauliflower with the *NPK1* gene to enhance biotic and abiotic stress tolerance. Book of abstracts, 1st International Conference on Plant Biology and 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, 4-7 June, Subotica, Serbia, *Programme and Abstracts*, 64. **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Suzana Pavlović**, Adžić Slađan, Branka Vinterhalter (2009): *In vitro* regeneracija pupoljaka iz segmenata kotiledona, hipokotila i korena kod *Brassica oleracea* ssp. Program i izvodi saopštenja, XVIII simpozijum Društva za fiziologiju biljaka Srbije, 25-27. maj, Vršac, Srbija, Program i izvodi saopštenja, 47. **M64**
2. **Suzana Pavlović**, Vinterhalter Branka, Adžić Slađan, Brdar-Jokanović Milka, Zdravković–Korać Snežana, Mitić Nevena (2011): Repetitivna somatska embriogeneza iz nezrelih embriona *Brassica oleracea* var. *capitata* i *B. oleracea* var. *botrytis*. XVIII simpozijum Društva za fiziologiju biljaka Srbije, 13-15. jun, Mionica, Srbija, Program i izvodi saopštenja, 39. **M64**

Мишљење и предлог Комисије:

На основу увида у докторску дисертацију кандидаткиње **Сузана М. Павловић**, под насловом „Ефекат експресије гена за протеин-киназу 1 дувана (*NPKI*) код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на развој толеранције према повишеним концентрацијама *NaCl in vitro*”, као и на основу увида у њен рад током реализације ове докторске дисертације, Комисија закључује да дисертација С. Павловић представља оригиналан научни рад, да су постављени задаци успешно остварени и да постигнути резултати доприносе расветљавању и бољем разумевању механизма толеранције биљака на стрес соли, који представља један од најзначајнијих абиотичких фактора који ограничава раст, развиће и продуктивност пољопривредних биљака. У току израде дисертације кандидаткиња је развила и усавршила протоколе за *in vitro* регенерацију и генетичку трансформацију карфиола што је омогућило добијање биљака са побољшаним карактеристикама. Сузана Павловић показала се као вредан и способан научни радник, који не само да има добру теоријску основу и влада методама које се користе у савременим лабораторијама у свету, него уме и да те своје вештине примени у пракси, што је од посебног значаја с обзиром на институцију у којој је запослена. У изради дисертације кандидаткиња је добро поставила циљеве, применила одговарајуће, савремене и разноврсне методе у истраживањима и обради добијених резултата које је критички дискутовала, уз исцрпне податке из литературе. Дисертација је написана добро и јасно, а сви прилози су на потребном нивоу.

На основу свега изложеног, задовољство нам је да предложимо Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидаткињи **Сузани М. Павловић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Ефекат експресије гена за протеин-киназу 1 дувана (*NPKI*) код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на развој толеранције према повишеним концентрацијама *NaCl in vitro*”.

КОМИСИЈА:

др Невена Митић, научни саветник,
Универзитет у Београду - Институт за
биолошка истраживања „Синиша Станковић”

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

др Бранка Винтерхалтер, научни саветник,
Универзитет у Београду - Институт за
биолошка истраживања „Синиша Станковић”

У Београду, 01. јун 2015. године