

**Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације
Милене Марјановић, дипл. инж.**

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду од 29.09.2015. године, решењем број: 290/10-5.3., именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације Милене Марјановић, дипл. инж. под насловом: “Физиолошки и биохемијски механизми регулације растења плодова парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) у условима суше“.

На основу прегледа, анализе и оцене докторске дисертације Комисија у саставу: др Радмила Стикић, редовни професор у пензији, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, др Биљана Вуцелић-Радовић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, др Јасмина Здравковић, научни саветник, Институт за повртарство, Смедеревска Паланка, др Зорица Јовановић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду и др Дубравка Савић, ванредни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Милене Марјановић, дипл. инж. под насловом “Физиолошки и биохемијски механизми регулације растења плодова парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) у условима суше“ написана је на укупно 157. странице штампаног текста. На почетку текста се налази Абстракт на српском и енглеском језику са кључним речима. Дисертација садржи следећа поглавља: Увод (стр. 1-5), Преглед литературе (стр. 6-27), Научни циљ и основне хипотезе (стр. 28-29), Материјал и методе (стр. 30-44), Резултати (стр. 45-89), Дискусија (стр. 90-120), Закључци (стр. 121-126), Литература (стр. 127-152) и Прилози - Биографија аутора (стр.153), Изјава о ауторству (стр. 154), Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације (стр. 155), Изјава о коришћењу (стр. 156) и Ауторство (стр. 157). Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија имају више подпоглавља. У оквиру дисертације је приказано 11 табела, 18 графикана, 5 колор фотографије и 7 шема. Цитирано је 244 литературних извора.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** започиње са разматрањем проблема суше која у многим земљама, као и у Србији, утиче на пољопривредну производњу и код великог броја култура, укључујући и парадајз ограничава принос и квалитет приноса. Затим је указано да се савремени приступ решавања проблема суше базира на 2 основна концепта и то: стварање генотипова гајених биљака отпорних на сушу и побољшање агротехничких мера. Овај други концепт укључује и оптимизацију наводњавања и побољшање ефикасности у усвајању воде од стране гајених биљака (WUE). Ту су од посебног значаја методе редукованог наводњавања (делимично сушење коренова-ДСК и регулисани дефицит наводњавања-РДН), које су базиране на познавању адаптивних реакција биљака на сушу. Објашњено је да се код ДСК методе коренов систем наизменично залива и излаже суши, а што потом доводи до синтезе тзв. „хемијских сигнала суше“, односно метаболита који се транспортују из корена до листова

где делују на процесе растења и реакције стоминих ћелија. Код РДН методе биљке се заливају количином воде која је мања од оптималне. Истакнуто је и да су досадашњи резултати показали да се методама редукованог наводњавања може уштедети вода за наводњавање парадајза и одржати принос, али још увек нису довољно објашњени процеси који се односе на физиолошке и биохемијске процесе растења плодова. Таква испитивања, а која су предмет истраживања ове дисертације, су од посебног значаја јер доприносе разумевању процеса од којих зависи не само растење и принос РДН и ДСК плодова, већ и њихов квалитет и нутритивна вредност.

У поглављу **Преглед литературе** кандидаткиња наводи савремена истраживања домаћих и страних аутора која су релевантна за област проучавања ове докторске дисертације. Ово поглавље је подељено у више подпоглавља. У уводном подпоглављу су представљене опште карактеристике које се односе на парадајз као изабрану културу за истраживање (историјско порекло, ботаничке особине, значај, квалитет и нутритивна вредност плодова).

У следећем подпоглављу је објашњен савремени биофизички и биохемијски концепт растења ћелија, док су фазе растења и сазревања плодова детаљно и шематски представљене. Потом следи објашњење физиолошких и биохемијских процеса у току растења плодова, са посебним освртом на улогу и механизме дејства хормона стимулатора растења (ауксина, гиберелина, цитокинина), као и инхибитора растења (АВА и етилена). Код разматрања улоге хормона посебно је дат преглед истраживања са мутантима парадајза дефицитарним у синтези АВА, а од којих је у овој дисертацији као биљни материјал коришћен мутант *flacca*. У следећем подпоглављу дат је преглед испитивања улоге кључних ензима за растење ћелија као што су: експанзини (каталишу реверзибилну експанзију ћелијског зида), ксилоглукан-ендотрансгликозилазе (раскидају, „секу“ везе у ланцу полисахарида ксилоглукана на фрагменте и тако слабе везе у зиду) и јонски везана за ћелијски зид пероксидаза (када се формира нови зид улога је да „закључа“ целулозне микрофibrиле и тако спречи њихово истезање). Истакнуто је да је улога ових ензима у растењу плодова парадајза и то, посебно, пероксидазе ћелијског зида још увек недовољно позната. Дат је и преглед истраживања протеомик анализом, која данас спада у најсавременије анализе протеина и може да објасни метаболичке процесе који се дешавају у току растења и развића биљних органа.

Преглед литературе је обухватио и дејство суше на растење и друге физиолошке процесе код парадајза, са посебним освртом на негативан ефекат суше на растење плодова и принос парадајза. У последњем подпоглављу дат је приказ примене метода редукованог наводњавања код парадајза и других култура, и указано је на разлике у ефектима ових ДСК и РДН метода у одржавању приноса и повећању ефикасности у усвајању воде (WUE - енгл. water use efficiency). Ту је истакнуто да литературни подаци за парадајз, али и за друге културе, указују да је ДСК метода мање ефикасна од РДН у WUE, али да је зато ДСК метода дала боље резултате код приноса и квалитета приноса.

У поглављу 3. **Научни циљ и основне хипотезе**, истакнуто је да је **циљ дисертације** био да се детаљно проуче физиолошки и биохемијски процеси који су у основи регулације растења и сазревања плодова парадајза у оптималним условима водног режима биљака и под дејством РДН и ДСК наводњавања. Како у испитиваним процесима кључну улогу има хормон абсцисинска киселина (АВА), упоредна испитивања код сорте Ailsa Craig и мутанта *flacca*, који је дефицитаран у синтези АВА, имала су за циљ да допринесу објашњењу улоге АВА у реакцијама биљака парадајза на сушу.

Циљ физиолошких истраживања је био да објасне утицај примењених третмана на растење и развиће, не само плодова, већ и вегетативних органа (корена, стабла и листова), а који могу да допринесу разумевању процеса који се дешавају у току излагања биљака третманима редукованог дефицита наводњавања. Биохемијска истраживања су обављена са циљем да се са хормоналног аспекта (акумулације стрес хормона абсцисинске киселине) и ензимског аспекта (активности ензима пероксидазе ћелијског зида) објасни процес растења и

издуживања ћелија перикарпа плодова, док је протеомик анализа обављена да би се идентификовали метаболички процеси који се дешавају у току процеса растења и издуживања ћелија перикарпа плодова.

Циљ оваквог интегралног физиолошког и биохемијског приступа анализи растења плодова, уз анализу растења вегетативних органа и ефикасности коришћења воде од стране биљака, је био да допринесе разумевању не само процеса који се дешавају у условима оптималног снабдевања биљака водом, већ и ДСК и РДН ефеката на растење и принос плодова парадајза, као и на њихов квалитет и нутритивну вредност. То би такође указало на могућности практичне примене метода редукованог наводњавања у производњи парадајза, посебно у оним условима где суша и недостатак воде за наводњавање могу да ограниче принос парадајза.

У истраживањима ове дисертације се пошло од *следећих хипотеза*: да ће се разлике у реакцијама испитиваних биљака и под дејством третмана испољити не само у растењу и сазревању плодова, већ и у растењу вегетативних органа, као и у усвајању воде из супстрата и да ће се то потом одразити на принос и ефикасност коришћења воде испитиваних биљака; затим да ће ефекат суше на растење биљака и плодова и принос парадајза у третману РДН бити много више изражен него у третману ДСК и стога се очекивало да се ДСК третманом може уштедети вода за наводњавање, а да се при томе не умањи принос парадајза; потом да су у основи разлика између ефеката испитиваних третмана разлике у физиолошким и биохемијским процесима на нивоу плодова, а у којима кључну улогу има стрес хормон абсцисинска киселина (АВА) и да ће се због тога испољити значајна разлика између *flacca* мутанта (дефицитарног у синтези АВА) и дивљег типа (испитиване сорте парадајза Ailsa Craig). Такође је била и претпоставка да ће активност ензима пероксидазе ћелијског зида, концентрација хормона АВА и протеомик анализа објаснити са биохемијског аспекта процесе који се дешавају у току растења ћелија перикарпа плодова, а од којих зависи не само величина и принос плодова, већ и њихов квалитет и нутритивна вредност.

У поглављу **Материјал и методе** објашњено је да су истраживања обављена на парадајзу (*Lycopersicon esculentum* Mill.) и то са сортом Ailsa Craig и мутантом *flacca*. *Flacca* је мутант са рецесивним тачкастим мутацијама које су настале применом х зрака и одликује се смањеном способношћу синтезе хормона АВА као „хемијског сигнала суше“. Експериментални део истраживања је обављен у контролисаним условима гајења у фитотронској комори на Пољопривредном факултету у Београду. Биљке су гајене из семена у комерцијалном компосту (Potground Н, Klasmann-Deilmann, Germany) до фазе формираних плодова. Затим је објашњена поставка експеримента у 3 варијанте:

1. оптимално заливање биљака (ОН) - свакодневно заливање супстрата у целој ризосфери до вредности пољског водног капацитета од 36%;
2. делимично сушење коренова (ДСК) - заливање једне стране ризосфере са оптималном количином воде, док је друга половина исушивана до садржаја воде у супстрату од 18% , па је затим извршена инверзија поступка (страна изложена суши се залива, а заливана суши) и
3. регулисани дефицит наводњавања (РДН) - заливање у целој ризосфери до вредности воде од 18%.

Заливање је било базирано на континуираним мерењима садржаја воде у супстрату помоћу ТДР пробе (TDR100). Пошто ДСК третман захтева раздвајање кореновог система и његово наизменично заливање и сушење, посебно је објашњен дизајн судова за ове експерименте. Они су направљени тако што је постављена пластична преграда по средини суда и тако су добијена два одељка исте запремине, али која су била хидраулички изолована. То је омогућило алтернативно заливање и сушење дела кореновог система.

Са третманима се започело када су биљке биле у фази формираног потпуно развијеног седмог листа на главном стаблу (фенолошки код 17) и у току експерименталног периода су обављена испитивања:

1. *водног режима супстрата* - на основу мерења укупног садржаја воде супстрата ТДР пробом;

2. *растења и развића биљака* - на основу мерења већег броја параметара (висина биљака, број и дијаметар плода, сува и свежа маса листова, стабла, корена и плодова, брзина растења плодова и фенолошких фаза у форми табеларно и шематски представљених фенолошких кодова ВВСН скале) и

3. *биохемијских реакција на нивоу перикарна плодова* - мерења концентрације хормона абсцисинске киселине (ELISA тестом), мерења ензимске активности јонски везане за ћелијски зид пероксидазе (гвајакол-тестом) и протеомик анализе (идентификација протеина дводимензионалном електрофорезом и масеном спектрометријом).

У овом поглављу је посебно објашњен принцип и поступак одређивања концентрације абсцисинске киселине ELISA тестом уз коришћење моноклонарних антитела за АВА (MAC 252) и то је шематски представљено. Дат је и детаљан поступак екстракције ензима пероксидазе уз слику калибрационе криве и израчунавања концентрације (у еквивалентним јединицама - HRPEU по g свеже масе). Детаљно је објашњен и поступак протеомик анализе (екстракција и мерење концентрације протеина, анализа дводимензионалном електрофорезом, идентификација протеина HPLC методом уз коришћење SGN базе података). Ова анализа, која спада у најсавременије методе за идентификацију протеина, је обављена у француском Националном Институту за Пољопривредна Истраживања (INRA - National Institute for Agricultural Research, Avignon, France), у току специјализације кандидаткиње у овој институцији у току 2010. године.

Подаци су обрађивани и графички представљени у одговарајућим програмима и помоћу одговарајућих статистичких метода анализирани (Progenesis SameSpot софтвера за идентификацију протеина, Sigma-Plot графички и статистички програми и ANOVA мулти-факторска анализа варијансе).

Поглавље **Резултати истраживања** је подељено на 2 основна подпоглавља 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 *Физиолошка истраживања* су објашњени ефекти испитиваних третмана (ОН, ДСК и РДН) на физиолошке процесе код испитиваних биљака. Прво су изложени резултати мерења динамике *промене садржаја воде у супстрату* који су показали да се водни режим одржавао на нивоу који је био предвиђен за дате експерименталне резултате. Ови резултати су показали да се у третману ДСК после првог окрета време потребно за промену стране заливања скраћује и код Ailsa Craig (са 22 у почетку на просечно 8) и код *flacca* биљака (са 26 на 12 у даљем току експеримента). Спорије сушење незаливане стране у ДСК третману код *flacca* биљака у односу на Ailsa Craig биљке, индиректно указује на спорије усвајање и мањи утросак воде код мутанта у односу на испитивану сорту.

Затим су изложени резултати дејства испитиваних третмана на процесе *растења биљака* који су показали да је излагање биљака РДН условима довело до редукације висине биљака (144 cm) у односу на оптималне услове водног режима и то Ailsa Craig (185 cm), а код *flacca* слично (132 и 113 cm). Мутанти су такође били значајно нижи у односу на испитивану сорту (просечно за око 28%), а у сличном односу је била и образована биомаса у испитиваним органима (кореновима, стаблу, листовима и плодовима). У резултатима је представљен и однос суве масе корена и изданка и суве масе плодова и изданка који може да покаже да ли је третман више утицао на растење корена, изданка или плодова и да индиректно укаже на транспорт асимилата између ових органа.

Испитивања биомасе и њене дистрибуције код биљака Ailsa Craig су показала да ДСК третман није значајно утицао на биомасу вегетативних органа као што није утицао ни на висину биљака, али је повећање односа суве масе плодова и изданка (за 10,7%) индиректно указало на транслокацију асимилата од листова и стабла ка плодовима. Резултати за РДН и поређење са ОН и ДСК условима су показали да је РДН третман утицао на биомасу

вегетативних органа (највећа редукција код стабла за 17%) као и на суву масу плодова (редукција за 14%). Резултати за РДН такође су указали и на мало измењену расподелу асимилата, јер је утврђена нешто већа акумулација биомасе у вегетативним органима и спорији транспорт ка плодовима у односу на контролне и услове ДСК. Испитивања акумулације биомасе и њене дистрибуције код *flacca* указују на тренд повећања процентуалног учешћа вегетативне биомасе у односу на биомасу плода код свих третмана и у односу на Ailsa Craig. Испитивани експериментални услови нису имали значајан утицај на масу вегетативних органа, изузев што је третман РДН значајно редуковао свежу масу стабла (за око 50%). Однос суве масе корена и изданка указује да је РДН третман имао већи утицај на растење корена него на растење изданка.

У току огледа је праћен и утицај испитиваних третмана на динамику одвијања фенолошких фаза (приказаних у форми фенолошких кодова) и ови резултати су показали да је код Ailsa Craig просечно време од појаве прве цвасти до сазревања плодова износило нешто дуже у ДСК и РДН условима (71 дан) у односу на ОН (66 дана), а слично је утврђено и код *flacca* биљака где је време за сазревање плодова за ДСК и РДН износило 80 и 83 дана, а за ОН је измерено 75 дана. Поређење између испитиваних генотипова је показало да су се *flacca* биљке спорије развијале у односу на Ailsa Craig, а што се може приписати њиховој смањеној могућности синтезе АВА као једног од кључних хормона за процесе развића биљака, посебно у условима суше.

Процес растења плодова је праћен на основу тзв. сигмоидне криве растења где је представљена дневна промена дијаметра плода (mm) у току временског интервала испитивања (дани после антезиса-дпа). Познато је да сигмоидна крива може да пружи информације о оба процеса која су у основи растења биљних органа, као и плодова и то: 1. о деоби и 2. растењу ћелија (првенствено издуживањем). Међутим, резултати сигмоидне криве представљени у овој дисертацији указују само на одвијање и брзину процеса растења ћелија, јер није било могућности да се обаве мерења у најранијим фазама развића плода, а која су резултат умножавања ћелија у процесу митотске деобе. За анализу је коришћена и друга врста кривих код којих је праћена корелација између дневне брзине растења ћелија и дпа. Мерења брзине растења плодова су показала да се највећа брзина растења плодова, код Ailsa Craig, испољила у условима ОН ($1,7 \text{ mm dan}^{-1}$), затим ДСК ($1,4 \text{ mm dan}^{-1}$), а најмања у РДН третману ($1,2 \text{ mm dan}^{-1}$). Криве растења такође указују и да су се између експерименталних услова јавиле разлике и у дужини трајања и времену појаве максималне брзине растења плодова. Тако је код ДСК биљака период интензивног растења плодова трајао око 10 дана дуже него код ОН биљака, и што је резултирало тиме да су плодови ДСК биљака били већи (око 53,8 mm) од плодова ОН биљака (49,5 mm), али та разлика није била статистички значајна. Код третмана РДН краћи период растења и мања брзина довели су до развоја плодова најмањег дијаметра (44,3 mm).

Код *flacca* мутанта период интензивног растења плодова је трајао дуже и максимална брзина растења је била нижа него код Ailsa Craig у свим третманима (ОН – $1,3 \text{ mm dan}^{-1}$, ДСК- $1,1 \text{ mm dan}^{-1}$, РДН – $0,7 \text{ mm dan}^{-1}$), а што је довело до тога да се образују плодови мањег дијаметра. Разлике у третманима су се испољиле само између РДН плодова и плодова ОН и ДСК биљака, тако да су на крају испитиваног периода РДН биљке имале плодове чији је пречник (25,5 mm) био мањи од пречника ОН биљака (37,7 mm) и ДСК биљака (35,3 mm).

И други параметри плодова су показали разлике и између испитиваних третмана и генотипова. Иако је број плодова код ДСК биљака био за 20,5% мањи у односу на ОН биљке, као резултат продуженог периода растења плодова њихов принос, изражен као укупна свежа маса (2129,96 g/биљци) се није статистички значајно разликовао од приноса ОН биљака (2180,46 g/биљци). Резултати за РДН услове су показали да је у овом третману дошло до значајног смањења и броја плодова у односу на ОН биљке (24,6%), али и укупног приноса (1523,99 g/биљци). Сличне су вредности добијене и за укупну суву масу плодова. Сличан тренд смањења броја плодова се испољио и код *flacca* биљака (у ДСК смањење за 17,1% а

РДН за 20,4%), али резултати статистичке анализе нису потврдили значајне разлике у приносу између приноса ДСК биљака (429,98 g/биљци) и ОН биљака (521,57 g/биљци), и то због великог варирања биомасе плодова код мутанта. У третману РДН је утврђена статистички значајна разлика у приносу између РДН биљака (328,32 g/биљци) и ОН и ДСК.

Резултати мерења ефикасности у коришћењу воде (WUE) су показали да је код Ailsa Craig дошло до значајног повећања WUE у третманима ДСК (2,96 g свежe масе/l) и РДН (3,04 g свежe масе/l) у односу на ОН (1,75 g свежe масе/l). Иако РДН третман повећава WUE (због мање количине утрошене воде за наводњавање), резултати су показали да је недостатак ове технике што редукује принос. Сличан тренд је утврђен и код *flacca* биљака где су измерене вредности WUE за ОН (0,77 g свежe масе/l), ДСК (0,91 g свежe масе/l) и РДН (1,10 g свежe масе/l), али су статистички значајне разлике утврђене само између ОН и РДН биљака.

У другом подпоглављу су представљена **Биохемијска истраживања** и то резултати који се односе на акумулацију хормона абсцисинске киселине (АВА), активност ензима јонски везане пероксидазе за ћелијски зид и идентификацију протеина (протеомик анализа) у перикарпу плодова испитиваних биљака. Концентрација АВА у перикарпу плодова је мерена у различитим фазама развоја плодова и то: у фази интензивног растења ћелија и убрзаног повећања њихове запремине (15 и 20 дана после антезиса-дпа), у почетним фазама сазревања плодова (30 дпа), у фази када почиње акумулација каротеноида у плодовима (45 дпа) и у фази зрелих плодова (60 дпа). Ови резултати су показали да је концентрација АВА у плодовима ОН биљака имала тренд смањивања од почетне вредности од 318,83 нг/г (у фази 15 дпа) до 55,56 нг/г (у фази 45 дпа), да би потом наставила да расте достижући максималне вредности од 426,94 нг/г (у фази 60 дпа). Сличан тренд промене је утврђен код ДСК плодова (274,24 нг/г – 15 дпа и 443,08 нг/г – 60 дпа), док су у РДН плодовима вредности концентрације АВА у почетним фазама мерења (15 и 20 дпа, 413,34 нг/г и 335,67 нг/г) биле значајно веће (за око 40 и 70%) од концентрације у плодовима ОН и ДСК биљака. Динамика промене концентрације АВА у плодовима биљака је била слична промени код сорте Ailsa Craig. Као што се очекивало концентрација АВА у плодовима *flacca* мутанта је била много мања од концентрације у плодовима Ailsa Craig (за око 62%), тако је у фази 15 дпа износила 168,37 нг/г – ОН, 124,85 нг/г ДСК и 136,13 нг/г РДН, а у фази 60 дпа 70,64 нг/г– ОН, 44,18 нг/г ДСК и 97,87 нг/г РДН.

За активност ензима јонски везане пероксидазе ћелијског зида у плодовима Ailsa Craig биљака и у свим третманима је утврђен тренд пораста са напредовањем растења плодова. То је било посебно изражено у периоду између фазе 20 дпа (0,48 HRPEU/g свежe масе) и 45 дпа (6,96 HRPEU/g свежe масе), док је у периоду од 60 дпа дошло до опадања раста у плодовима ОН и РДН биљака, али не и ДСК плодовима где се тренд пораста активности ензима наставио и у фази сазревања плодова. У плодовима *flacca* биљака промене активности ензима углавном прате растући тренд од 20 дпа (просечно за све третмане 0,35 HRPEU/g свежe масе) до максималних вредности за ОН плодове у фази 45 дпа (1,63 HRPEU/g свежe масе), а за ДСК и РДН плодове у фази 60 дпа (2,17 и 1,57 HRPEU/g свежe масе). Ови резултати су показали и да је активност испитиваног ензима мања у плодовима *flacca* у односу на Ailsa Craig биљке. Упоредна анализа динамике промене концентрације АВА и активности пероксидазе је обављена са циљем да се утврди какви су њихови међусобни односи. Генерално код оба генотипа и у свим третманима ови резултати су показали да је њихов однос антагонистички и то тако да се пораст у концентрацији АВА прати смањење у активности пероксидазе и обратно.

Биохемијска анализа плодова је обухватила и протеомик анализу. Укупно је издвојено 1679 протеинских тачака из перикарпа плода парадајза, код 52 тачке је утврђена статистички значајна разлика између третмана, фазе развића плодова, као и између испитиваних генотипова. На основу идентификације протеина закључено је да протеини припадају следећим метаболичким категоријама: метаболизму угљених хидрата (13 протеина),

метаболизму аминокиселина (5 протеина), синтези и деградацији протеина (8 протеина), протеинима енергетског метаболизма (3 протеина), протеинима ћелијског зида (5 протеина), протеинима оксидативног стреса (8 протеина), протеинима који учествују у одбрани од стреса и протеинима топлотног стреса (4 протеина) и за 6 протеина није утврђена функција. Код 29 протеина утврђена је статистички значајна разлика у експресији у перикарпу плодова у различитим фазама развоја плодова (15 и 30 дпа) у оквиру оба третмана (ОН и ДСК).

Резултати су анализирани код појединачних генотипова (*Ailsa Craig* или *flacca*) тако што је прво извршена анализа протеина у току развоја плодова (фазе 15 и 30 дпа) за сваки третман (ОН и ДСК), а затим је извршено поређење између третмана у одговарајућим фазама, и на крају је испитивана разлика између генотипова и у фазама развоја плодова. Плодови старости 15 дпа су у фази интензивног растења ћелија и убрзаног повећања ћелијске запремине, а плодови старости 30 дпа су у фази почетка сазревања плодова. Анализа разлика у испитиваним фазама развоја плодова код биљака *Ailsa Craig* гајених у ДСК условима је показала да је већи број протеина (9) имао повећану експресију (из категорија оксидативни стрес, процеси биосинтезе и деградације протеина, метаболизам угљених хидрата, структура ћелијског зида и протеини топлотног стреса) у каснијој него у ранијој фази развоја плодова. Оваква анализа за ОН плодове је показала да су само 4 протеина (идентификовани из категорија метаболизам угљених хидрата, протеини оксидативног стреса и протеини топлотног стреса) имала повећану експресију у каснијој фази развоја плодова.

Анализа је затим обухватила поређење утицаја третмана на протеине плода *Ailsa Craig* у истим фазама развића. Резултати за 15 дпа су показали да су се између ДСК и ОН третмана испојиле разлике и то код 18 протеина. Повећана експресија у ДСК третману у односу на ОН је утврђена за 4 протеина (из метаболизма угљених хидрата, метаболизма аминокиселина и оксидативног стреса). Насупрот томе, број протеина чија је експресија у ДСК третману у односу на ОН била смањена је био већи и обухватио је 14 протеина (из категорија метаболизам угљених хидрата, метаболизам аминокиселина, синтеза и деградација протеина, енергетски метаболизам, протеини ћелијског зида, протеини оксидативног стреса, протеини који учествују у одбрани од стреса и протеини топлотног стреса, 1 протеин је био из категорије са непознатом функцијом). Слични резултати смањења експресије протеина у ДСК условима у односу на ОН су утврђени и у фази 30 дпа, која је фаза блиска почетку процеса сазревања плодова. Повећање експресије је показао само 1 протеин (категорија одбране од стреса и протеини топлотног стреса), док је 16 протеина показало смањену експресију (из категорија метаболизма угљених хидрата, метаболизма аминокиселина, синтезе и деградације протеина, протеина ћелијског зида и протеина оксидативног стреса).

Статистичком анализом је утврђен значајан ефекат интеракције између генотипа и третмана. Ефекат интеракције уочен је код 21 протеина из различитих категорија. Поређења између *Ailsa Craig* и *flacca* у ОН условима су показала да велики број протеина (26) има већу експресију у плодовима *Ailsa Craig* и то оних који припадају категоријама метаболизму угљених хидрата, метаболизму аминокиселина, синтези и деградацији протеина, енергетском метаболизму, протеина са функцијом везаном за ћелијски зид, оксидативном стресу, одбрани од стреса и топлотном стресу. У третману ДСК ове разлике су биле мање изражене јер су само 2 протеина (из категорије метаболизма угљених хидрата) показала повећану експресију.

Већина протеина који су идентификовани у категорији *Метаболизам угљених хидрата* има функцију у примарном метаболизму угљених хидрата, што подразумева процесе гликолизе и циклус трикарбоксилних киселина. Добијени резултати, показују да већина протеина са функцијом у примарном метаболизму угљених хидрата (дихидролипоамид-дехидрогеназа, пируватдехидрогеназа, енолаза, триозафосфат-изомераза, глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа, пируват-киназа изоензим Г, триоза-фосфат-изомераза, ацид-бета-фруктофуранозидидаза и др.) има повећану експресију у старијим фазама развића плодова. Поређење експресије идентификованих протеина код ДСК и *flacca* са резултатима ОН

плодова указује да је спорији метаболички флуks угљених хидрата утицао тако да је процес растења ДСК и *flacca* плодова дуже трајао од растења ОН плодова. Протеомик резултати указују и на сличан тренд за протеине из категорије *Метаболизам аминокиселина* (за глутамин-синтетазу, С-аденозилметионин-синтетазу, цистеин синтетазу и др.). Неки од ових ензима су укључени и у синтезу компоненти ћелијског зида, укључујући и лигнин, тако да се њихова смањена синтеза код *flacca* плодова такође може повезати са процесом растења ћелија.

Резултати за категорију *Синтеза и деградација протеина* су указали да је смањена експресија цистеин-протеиназе у третману ДСК и код *flacca* плодова такође у складу са њиховим споријим развићем у односу на плодове у третману ОН. Смањена синтеза субјединице протеазома, који је део АТП-зависног мултиензимског протеиназног комплекса у обе фазе развића плода у третману ДСК, код ДСК третмана у *flacca* плодовима, као и код *flacca* у односу на Ailsa Craig, указује да је дошло до усмеравања катаболичких процеса у циљу очувања неопходне енергије за раст ћелија.

Резултати за идентификоване протеине из категорије *Протеини ћелијског зида и енергетског метаболизма* (магнезијум-зависна растворљива неорганска пирофосфатаза, цинамил-алкохол-деhidрогеназа, UDP-глукоза, SGRP-1 протеин, UDP-L-рамноза синтаза) указују да је метаболичка активност плодова у третману ДСК и за време повећања ћелијске запремине оријентисана ка синтези протеина ћелијског зида и стварању неопходне енергије за растење ћелија у овим плодовима. Насупрот томе, резултати за *flacca* указују на смањену синтезу ових ензима, а што такође може да се доведе у везу са споријим растом и мањим плодовима *flacca* биљака у односу на плодове Ailsa Craig.

Резултати су показали и да је растење ОН и ДСК плодова било праћено са значајном променом ензима из категорије *Антиоксидативни и одбрамбени протеини*, посебно супероксид-дисмутазе (SOD), аскорбат-пероксидазе (APX) и тиоредоксина. Ту припадају и идентификовани протеини топлотног стреса 70 (HSP70) и анексин р35. Повећана синтеза ових антиоксидативних протеина указује на адаптивне реакције ДСК биљака на сушу.

Статистичка анализа протеомик резултата је показала и значајан ефекат интеракције између фазе развића и третмана. Ефекат интеракције је био утврђен код 9 протеина, а што указује да различити нивои експресије ових протеина нису само последица фазе развића или примењеног третмана, већ и њихове интеракције.

У поглављу **Дискусија** резултати истраживања су на адекватан начин разматрани и коментарисани у односу на резултате других аутора релевантних за истраживања ове докторске дисертације. Дискусију добијених резултата, кандидаткиња је приказала систематично у 5 подпоглавља која су следила одговарајуће резултате истраживања. Пошто нема доступних литературних података за идентификоване протеине и метаболичке процесе за плодове Ailsa Craig биљака гајених у условима делимичног сушења коренова и за плодове *flacca* биљака, кандидаткиња је у своју анализу података укључила поређење са протеомик анализом код биљака изложених стресу суше и соли. Овакав приступ се показао успешним јер је омогућио доношење правилних закључака о метаболичкој основи процеса растења ћелија плода код ДСК и *flacca* биљака.

У поглављу **Закључци** су представљени најважнији закључци (укупно 16) који су правилно изведени и у потпуности произилазе из анализе добијених експерименталних резултата докторске дисертације. Они се могу сумирати на следећи начин.

Вредности *садржаја воде у супстрату* и динамика промене стране заливања су показали да се после прве промене стране заливања у ДСК третману, период окрета скраћује и код Ailsa Craig (са 22 у почетку на просечно 8 у даљем току) и код *flacca* биљака (са 26 у почетку на просечно 12 у даљем току). На основу ових и литературних података је закључено да ДСК систем доводи до адаптивних реакција корена и то повећане хидрауличне проводљивости ћелија и тзв. „хидрауличног лифта“, (редистрибуције воде између коренова у заливаној и сушеној страни супстрата).

На основу испитивања *параметара растења биљака* закључено је да ДСК систем није утицао на висину и биомасу Ailsa Craig биљака за разлику од РДН третмана где је висина биљака била умањена за 22%, а свежа маса стабла за 17% у односу на ОН биљке. Мутант *flacca* је био знатно мање висине и биомасе (око 30%) што указује на значај хормона АВА за раст биљака.

Однос *суве масе корена и изданка* указује да је РДН третман имао већи утицај на растење корена него на растење изданка, па је закључено да су смањено растење и апсорпциона површина корена код ових биљака директно утицали на мање и спорије усвајање воде. На то индиректно указују и резултати промене садржаја воде у супстрату где су биљке гајене. Пошто је РДН третман изазвао већу редукацију суве масе плодова (за 14% у односу на ОН и ДСК плодове) од суве масе изданка, закључено је и да је овај третман довео до промене расподеле асимилата и то тако да се они спорије транспортују ка плодовима. Насупрот томе, повећања *односа суве масе плодова и изданка* (за 10,7%) указују да је ДСК третман утицао на транслокацију асимилата од листова и стабла ка плодовима. Испитивања акумулације биомасе и њене дистрибуције код *flacca* биљака указују на тренд повећања процентуалног учешћа вегетативне биомасе у односу на биомасу плода код свих третмана и у односу на Ailsa Craig.

На основу испитивања *динамике фенолошких фаза* развића биљака закључено је да у односу на ОН биљке, третмани ДСК и РДН успоравају развиће биљака. Динамика фенолошких фаза је такође показала да се *flacca* биљке много спорије развијају у односу на Ailsa Craig (од 6 до 23 дана у зависности од третмана) и закључено је да је у основи каснијег сазревања *flacca* биљака смањена могућност синтезе АВА као једног од кључног хормона за процесе развића биљака, посебно у условима суше.

Мерења *брзине растења плодова* су показала да се највећа брзину растења плодова, код оба генотипа, испољила у условима ОН (1,7 и 1,3 mm дан⁻¹), затим ДСК (1,4 и 1,1 mm дан⁻¹), а најмања у третману РДН (1,2 и 0,7 mm дан⁻¹). И поред мање брзине, а као резултат продуженог периода растења плодова, средња вредност пречника плодова на крају експеримента била је слична у третманима ОН и ДСК (49,50 cm – ОН, 53,78 cm – ДСК). Код третмана РДН краћи период растења и мања брзина довели су до развоја мањих плодова (44,33 cm). На основу ових података закључено је да је на коначну величину плода парадајза у испитиваним експерименталним условима више утицала дужина трајања процеса растења од максималне брзина растења.

На основу података о броју плодова и њиховој биомаси, закључено је да, иако је ДСК третман редуковао број плодова, *принос* се због продуженог периода њиховог растења није статистички значајно разликовао код оба генотипа (2,13 и 0,429 кг/биљци) од приноса ОН биљака (2,18 и 0,521 кг/биљци). РДН третман код оба генотипа редуковао је и број плодова, њихову биомасу и тако коначан принос (1,52 и 0,33 кг/биљци).

Резултати обрачуна *ефикасности у коришћењу воде* (WUE) су код Ailsa Craig, показали да је дошло до значајног повећања у третманима ДСК и РДН (за 69,1% и 73,7%) у односу на ОН биљке. Иако РДН третман због мање количине воде повећава WUE, резултати су показали да је недостатак ове технике што редукује принос. Код *flacca* мутанта значајно повећање WUE је утврђено само у третману РДН (за 42,9%), док је у ДСК третману примећен позитиван ефекат на ефикасност усвајања воде *flacca* биљака, али због варијабилности података није утврђена статистички значајна разлика.

Ови резултати потврђују да се применом ДСК технике могу смањити количине употребљене воде за наводњавање биљака и повећати ефикасност њиховог усвајања воде, а да се при томе значајно не умањи принос. На основу ових резултата је закључено да ДСК техника може бити од посебног значаја за гајење парадајза у производним условима где суша и недостатак расположиве воде за наводњавање могу да умање принос ове културе.

Биохемијска анализа растења плодова на основу мерења *концентрације АВА* у перикарпу је потврдила очекивану значајну разлику у концентрацији АВА између Ailsa Craig и *flacca*

плодова (62% мања код *flacca*) која објашњава и значајно мање *flacca* плодове. Динамика промене концентрације АВА је указала на значајнију акумулацију и улогу АВА у каснијим фазама развоја плодова (45дпа). У третману РДН, код оба генотипа, у дужем периоду је измерена већа концентрација АВА у перикарпу плодова, и закључено је да је то вероватно директан утицај суше који може да објасни успорено растење плодова и коначан мањи пречник и масу плодова код ових биљака.

Иако је динамика промене *активности јонски везане пероксидазе ћелијског зида*, у свим третманима слична код Ailsa Craig и *flacca* плодова, активност ензима је много мања код *flacca*. И код Ailsa Craig и *flacca* биљака у третману ДСК, активност ензима наставља да расте и у фази 60 дпа када је растење плодова завршено. На основу тога је закључено и да пероксидаза у третману ДСК, може да има улогу и у процесу сазревања плодова. Упоредна анализа динамика промене активности пероксидазе и концентрације АВА у плодовима, указује на антагонистички ефекат између активности пероксидазе и количине АВА у свим третманима и код оба генотипа.

У *протеомик* анализи је 1679 протеинских тачака из перикарпа плода парадајза, код 52 тачке је утврђена статистички значајна разлика између третмана (ОН и ДСК), фазе развића плодова (15 дпа и 30 дпа), као и између испитиваних генотипова. На основу ових резултата и идентификације протеина закључено је да протеини припадају следећим метаболичким групама: метаболизму угљених хидрата (13 протеина), метаболизму аминокиселина (5 протеина), синтези и деградацији протеина (8 протеина), протеинима енергетског метаболизма (3 протеина), протеинима ћелијског зида (5 протеина), протеинима оксидативног стреса (8 протеина), протеинима који учествују у одбрани од стреса и протеинима топлотног стреса (4 протеина) и за 6 протеина није утврђена функција. На основу резултата је закључено и да су различити нивои експресије ових протеина последица не само фазе развића плодова или примењеног третмана, већ и њихове интеракције.

На основу анализе протеина који учествују у *метаболизму угљених хидрата* у плодовима, закључено је да већина од 13 идентификованих протеина има функцију у примарном метаболизму угљених хидрата, првенствено у процесима гликолизе и циклуса трикарбоксилних киселина. Утврђен је и значајан ефекат испитиваних генотипова, третмана, али и фазе развића. Разлике између Ailsa Craig и *flacca* плодова су се испојиле у фази оптималног наводњавања биљака и то тако да се у *flacca* плодовима већина протеина акумулирала у мањој количини у односу на плодове Ailsa Craig. Ефекат утицаја третмана у испитиваним фазама је показао да је у ДСК условима спорији метаболички флуks у односу на ОН услове, тако да ти резултати могу да објасне спорију динамику растења плодова у третману ДСК и *flacca* у односу на ОН биљке.

Анализа протеина из групе *метаболизма аминокиселина и синтезе и деградације протеина*, такође указује на смањен метаболички флуks у плодовима, јер у ДСК третману долази до смањења синтезе лигнина и других секундарних метаболита у фази интензивног растења ћелија (15 дпа), што је примењено и код *flacca* у односу на Ailsa Craig плодове. Поред тога је закључено да у третману ДСК и код *flacca* биљака у односу на Ailsa Craig, долази до активације катаболичких процеса у циљу очувања неопходне енергије за растење плодова и одбрану од стреса.

На основу повећане експресије *протеина ћелијског зида и протеина енергетског метаболизма*, може се претпоставити да је метаболички флуks оријентисан ка синтези протеина ћелијског зида и стварању неопходне енергије за ћелијско растење, што омогућава плодовима из ДСК третмана продужен период растења, који на крају резултира већим пречником плодова у односу на ОН биљке. Такође је уочено да је код генотипа *flacca* смањена синтеза свих протеина ћелијског зида у односу на генотип Ailsa Craig, што може да буде узрок мање величине плодова код *flacca*.

Повећана синтеза неких *антиоксидативних протеина* за време растења и развића плодова у третману ДСК, указала је на то да третман ДСК (где је коришћено 70% воде од

ОН) може да изазове благи стрес суше, који подстиче различите одбрамбене реакције код биљака. Ти подаци су у складу и са значајном улогом пероксидаза не само у растењу плодова, већ и у антиоксидативној активности. Закључак је и да је протеомик анализа омогућила нов увид у разумевању метаболичких и биохемијских процеса који су у основи растења ћелија перикарпа плодова. Оваква даља истраживања, посебно у фази сазревања плодова, могу бити од помоћи за разумевање ефекта третмана ДСК не само на растење плодова парадајза, већ и на квалитет оствареног приноса, као и на нутритивни значај парадајза.

У поглављу **Литература** је наведен списак од 244 референци које су релевантне и у складу са стандардима за цитирање.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Милене Марјановић, дипл. инж., представља оригинални и самостални научни рад из области Физиологије гајених биљака. Дисертација је резултат успешно спроведеног самосталног научног рада кандидаткиње, који је у сагласности са планом истраживања прихваћеним при пријави дисертације. Кандидаткиња је успешно применила савремене инструменталне и статистичке методе за експериментални део истраживања, резултате правилно тумачила и коментарисала у складу са расположивим литературним подацима и извела правилне и научно доказане закључке.

Одабрана тема истраживања је од посебног научног и практичног значаја, јер је редукација растења плодова и укупног приноса једна од најзначајнијих последица деловања суше на биљке парадајза. Научни значај дисертације је и у томе што је дала свој допринос испитивањима физиолошке и биохемијске основе ефеката метода редукованог наводњавања (делимичног сушења коренова-ДСК и редукованог дефицита наводњавања-РДН) на растење плодова, принос и ефикасност усвајања воде код парадајза, а који нису у довољној мери испитани. Резултати су показали да се са обе методе може уштедети вода за наводњавање парадајза и повећати ефикасност њеног усвајања (за 69.1 % - ДСК и 73,7 % РДН, у односу на ОН), али да примена ДСК методе не доводи до смањења величине плодова (53,78 цм – ДСК, 49,50 цм – ОН), и укупног приноса (2,13 кг/биљци – ДСК, 2,18 кг/биљци – ОН) за разлику од РДН методе која доводи до њиховог смањења у односу на оптимално заливане биљке (пречник 44,33 цм и принос 1,52 кг/биљци). Стога се препоручује да се за наводњавање парадајза примењује ДСК метода. Резултати су показали да се у основи ових разлика између ДСК и РДН и ОН налазе разлике у процесима растења плодова, али и у растењу вегетативних органа који утичу на транспорт асимилата ка плодовима. Пошто је од основног значаја у овим процесима улога хормона АВА, у истраживање је укључен и мутант парадајза *flacca* који је дефицитаран у концентрацији АВА (*flacca* просечно 82,07 нг/г, сорта Ailsa Craig 226,18 нг/г). Ови резултати су показали и да су мутанти *flacca* много мањи од сорте Ailsa Craig, а што указује и на потребу да се редефинише улога АВА као хормона који се сврстава у групу инхибитора растења.

За испитивање ефеката метода редукованог наводњавања на растење плодова су примењене најсавременије физиолошке и биохемијске методе. Како су досадашња истраживања ефеката ДСК и РДН на растење и принос плодова парадајза углавном била базирана на испитивању акумулације биомасе, увођење биохемијског аспекта истраживања представља значајан допринос разумевању не само ефеката ових третмана, већ генерално метаболичких процеса који се дешавају у току различитих фаза развића плодова. Ту треба посебно истаћи улогу протеина који припадају категорији антиоксиданата који су указали да се у реакцијама биљака на ДСК третман укључују и адаптивне реакције биљака на сушу. Посебан допринос је и у сагледавању улоге хормона АВА, а што су показали и резултати са плодовима мутанта *flacca*.

Треба такође истаћи и да је протеомик анализа, која до сада није испитивана код ДСК плодова, урађена у току специјализације кандидаткиње у Институту ИНРА (Авињон, Француска) и у оквиру реализације ФП6 пројекта CROPWAT и пројекта билатералне сарадње Србије и Француске. Ови резултати су прошли и своју међународну научну верификацију јер су објављени у водећем међународном часопису (OMICS: A Journal of Integrative Biology 16(6), 343-356). Такође, ова дисертација представља део резултата ФП7 РЕГПОТ пројекта AREA и пројекта TP31005 „Савремени биотехнолошки приступ решавања проблема суше у пољопривреди Србије“ који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

На основу свега претходно наведеног, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију дипл. инж. Милене Марјановић под насловом “Физиолошки и биохемијски механизми регулације растења плодова парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) у условима суше“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да усвоји ову позитивну оцену и омогући кандидаткињи јавну одбрану.

У Београду, 05.10.2015.

Чланови комисије

др Радмила Стикић, редовни професор у пензији
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

др Биљана Вуцелић-Радовић, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

др Јасмина Здравковић, научни саветник
Институт за повртарство, Смедеревска Паланка

др Зорица Јовановић, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

др Дубравка Савић, ванредни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

ПРИЛОГ:

Рад објављен у међународном часопису:

Marjanović, M., Stikić, R., Vucelić-Radović, B., Savić, S., Jovanović, Z., Bertin, N., Faurobert, M. (2012). Growth and Proteomic Analysis of Tomato Fruit Under Partial Root-Zone Drying. OMICS: A Journal of Integrative Biology 16(6): 343-356.