

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.06.2014. године, прихваћен је извештај ментора др Петра Д. Марина и др Срђана Бојовића о урађеној докторској дисертацији Зорице С. Шарац, асистента на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу, под насловом „**Утврђивање варијабилности и диференцијације природних популација *Pinus nigra* Arnold у Србији коришћењем фитохемијских и молекуларних маркера**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Петар Д. Марин, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Срђан Бојовић, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду, др Јелена М. Алексић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду, др Биљана Николић, виши научни сарадник Института за шумарство у Београду, др Пеђа Јанаћковић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Зорице Шарац, под насловом „**Утврђивање варијабилности и диференцијације природних популација *Pinus nigra* Arnold у Србији коришћењем фитохемијских и молекуларних маркера**“, обухвата 284 страна компјутерски обрађеног текста. Дисертација садржи: 35 табела (9 у Уводном делу, 4 у поглављу Материјал и методе и 22 у поглављу Резултати и дискусија) и 83 слике (19 у поглављу Увод, 1 у поглављу Материјал и методе, 25 у поглављу Резултати и дискусија и 38 у поглављу Прилог) и 561 библиографску јединицу. На почетку дисертације приложен је апстракт на српском и енглеском језику (без пагинације). Пагинирани текст подељен је у 8 поглавља: Увод, Циљеви рада, Материјал и методе, Резултати и дискусија, Општа дискусија, Закључци, Литература и Прилог.

Анализа докторске дисертације:

У докторској дисертацији кандидат Зорица Шарац приказала је фитохемијски и генетички диверзитет и диференцијацију седам аутохтоних популација *Pinus nigra* у Србији које припадају различитим инфраспецијским таксонима (*ssp. nigra*, *var. gocensis*, *ssp. pallasiana* i *var. banatica*). У поглављу **УВОД**, кандидаткиња је у оквиру шест подпоглавља дала детаљан приказ савремених истраживања која се односе на проблематику докторске дисертације. Кандидаткиња представља фамилију Pinaceae и род

Pinus са посебним освртом на врсту *Pinus nigra*, у посебним деловима, описује кутикуларне воскове и алкане, као и терпене. Наводи опште карактеристике и таксономски значај и, кроз преглед досадашњих истраживања, даје смернице за свој рад. У шестом подпоглављу су приказана популационо-генетичка и филогеографска истраживања код биљака прегледом релевантних литературних извора, са посебним освртом на молекуларне маркере.

У складу са тим, кандидаткиња је у оквиру подглавља **ЦИЉЕВИ РАДА** поставила неколико теза: упознавање састава, садржаја и варијабилности алкана у кутикуларним восковима четина природних популација *P. nigra* у Србији; упознавање састава, садржаја и варијабилности терпена у четинама *P. nigra*; утврђивање хемотаксономског значаја алкана и терпена; утврђивање генетичког диверзитета и генетичке диференцијације популација *P. nigra* у Србији на нивоу диплоидног једарног генома и хаплоидних генома (хлоропластног и митохондријалног), који се одликују алтернативним видовима наслеђивања и дисперзије; утврђивање да ли и у којој мери постоји подударност између фитохемијске и генетичке диференцијације природних популација *P. nigra*, и утврђивање потенцијалне филогеографске структуре *P. nigra*.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** организовано је у четири подпоглавља. Дат је опис истраживаних популација црног бора заједно са поступком сакупљања и складиштења четина. Описани су поступци изоловања кутикуларних воскова и терпена, дати су аналитички услови за квалитативну и квантитативну анализу алкана и терпена (гасна хроматографија и комбинација гасне хроматографије са масеном спектрометријом). У статистичкој обради података коришћене су параметарске, непараметарске и мултивариационе статистичке анализе (ANOVA, χ^2 тест, PCA, CDA, HCA, итд.) у програмима Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics Corporation, USA) и Statistica 5.1 (StatSoft, 1997). Детаљно су описане методе изолације и PCR амплификације одабраних региона ДНК као и поступци генетичке анализе.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА**, кандидаткиња је добијене резултате груписала у пет подпоглавља, које на адекватан начин тумачи и дискутује, поредећи их са савременим научним сазнањима. У првој целини су приказани резултати истраживања варијабилности алкана. Кутикуларне воскове четина црног бора одликује серија *n*-алкана од C₁₆ до C₃₃, осим у популацијама описаним као *ssp. nigra* у којима је детектована серија од C₁₈ до C₃₃. Најзаступљенији су *n*-алкани са непарним бројем C атома: C₂₃, C₂₅, C₂₇ и C₂₉ (просечни садржај 10.3, 16.5, 15.1 и 10.7%, респективно). Друго подпоглавље садржи резултате анализе етарских уља. У етарским уљима четина утврђено је укупно 75 компоненти, од који је 58 идентификовано. Доминантне компоненте су α -пинен (43.6%) и гермакрен Д (29.8%), које заједно чине 73.4% масе уља. Мултивариационе статистичке анализе (PCA, CDA и HCA) коришћених фитохемијских маркера су, генерално, показале тенденцију формирања три групе популација (*nigra*, *pallasiana* и *banatica*). На основу варијабилности терпена, популације Прибој и Гоч (детерминисане као *var. gocensis*) показале су умерену тенденцију одвајања од прве групе (*ssp. nigra*), док је према саставу *n*-алкана популација Прибој показала још већу тенденцију одвајања. Претпостављено је да таксон *gocensis* представља транзициону форму између таксона *nigra* на западу и *pallasiana* на југоистоку Србије. У четвртом подпоглављу кандидаткиња је представила резултате истраживања варијабилности једарних EST-микросателита (EST-SSRs). Услед недостатка једарних микросателита специјално развијених за *P. nigra*, урађена је интер-специјска PCR амплификација три EST-SSRs развијених за *Pinus taeda*. Иако су два EST-SSR локуса успешно PCR-амплификована, утврђено је одсуство варијабилности, због чега

су искључени из даље анализе. У петом подпоглављу кандидаткиња је представила резултате истраживања хлоропластних микросателита (cpSSRs). Од пет тестираних cpSSRs, три су успешно PCR-амплификована, са 22 детектована алела који формирају 38 хаплотипова. Као што је и очекивано, с обзиром на интензиван проток гена посредством полена код четинара, утврђен је веома висок ниво диверзитета cpDNK ($H_T = 0.949$) и мали степен диференцијације ($F_{st} = 0.017$, $p = 0.108$, $G_{st} = 0.024$, $R_{st} = 0.066$). Кластер анализе које се не заснивају на генетичким дистанцама већ на Bayesian методи (STRUCTURE и TESS) су, такође, показале да све испитиване популације *P. nigra* представљају само једну генетичку групу, на основу варијабилности хлоропластног генома. Са друге стране, PCA анализе, засноване на фреквенци cpSSR алела и хаплотипова, и NMDS анализа, заснована на вредностима генетичке диференцијације парова популација, показале су да се популације ssp. *nigra*, ssp. *pallasiana* и var. *banatica* могу посматрати као три засебне групе по типу варијабилности. Основна разлика између PCA анализе засноване на фреквенци хаплотипова и NMDS анализе, са једне стране, и PCA анализе базиране на фреквенци алела, са друге стране, огледа се у томе што прве две анализе указују и на другачији тип варијабилности популације Прибој (var. *gocensis*). У петом подпоглављу приказани су резултати истраживања митохондријалне секвенце *nad7* интрон1. Наиме, од три тестирана мтДНК локуса само један (*nad7* интрон1) успешно је PCR-амплификован, при чему су детектована два хаплотипа што је резултовало у ниском мтДНК диверзитету ($H_T = 0.357$), али умереној генетичкој диференцијацији ($G_{st} = 0.359$), резултат који је сагласан са асиметричним протоком гена код четинара. Такође, на основу мтДНК генома, направљена је дистинкција између популација ssp. *nigra* (Бањска стена, Омар и Змајевачки поток) и осталих испитиваних подврста и варијетета ове врсте, али није било могуће међусобно раздвојити остале испитиване подврсте и варијетете. Уочена дистрибуција мтДНК хаплотипова у испитиваним популацијама црног бора омогућила је дефинисање три сценарија који могу објаснити садашњу дистрибуцију мтДНК диверзитета код црног бора у Србији.

У поглављу **ОПШТА ДИСКУСИЈА** дат је упоредни преглед свих резултата које кандидаткиња дискутује поредећи их са савременим научним сазнањима. Фитохемијски маркери су, генерално, показали постојање три хемотипа у популацијама црног бора из Србије (*nigra*, *pallasiana* и *banatica*), при чему најудаљенији положај има популација из кањона Лазареве реке, детерминисана као var. *banatica*. Такође, указано је и на то да је у овој студији фитохемијски обрађена само по једна популација таксона *pallasiana* и *banatica*, тако да је за извођење поузданих закључака о њиховом таксономском статусу потребно обрадити и друге популације из ареала распрострањења наведених таксона. Са друге стране, молекуларне анализе сва три биљна генома код црног бора у Србији показале нешто другачије генетичке профиле и односе. У складу са очекивањима, добијен је врло висок ниво генетичког диверзитета и одсуство генетичке диференцијације популација црног бора из Србије на нивоу хлоропластних микросателита, док је знатно нижи генетички диверзитет и умерена генетичка диференцијација добијена на нивоу једне некодирајуће мтДНК секвенце, што је у складу са асиметричним протоком гена код четинара. Међутим, наглашено је да је и у случају асиметричног протока гена, добијени ниво диференцијације на нивоу митохондријалног генома очекиван између популација четинара дистрибуираних на много већем простору. Стога, генетичка диференцијација добијена између популација црног бора из Србије, што за четинаре који се генерално одликују великим ареалима представља мало подручје, може указивати на одређене историјске и друге процесе који су деловали у испитиваним популацијама, што је кандидаткиња дискутовала у даљем тексту.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња сумира резултате добијене из докторске дисертације. Изводи закључке везане за хемијски састав и варијабилност *n*-алкана и терпена, као и њихов хемотаксономски значај код црног бора. Такође, на основу варијабилности молекуларних маркера кандидаткиња изводи закључке везане за утврђени ниво генетичког диверзитета, диференцијације и сродности истраживаних популација црног бора. Треба посебно нагласити да су резултати ових истраживања показали врло висок ниво генетичког диверзитета популација црног бора из Србије на нивоу хлоропластних микросателита, који је у потпуности упоредив са објављеним нивоом *srSSR* диверзитета у популацијама *P. nigra* из западног Медитерана. Утврђени ниво генетичког диверзитета иде у прилог констатацији да су истраживане популације црног бора вероватно преживеле *in situ* LGM, пре него да су реколонизовале ове просторе у постгласијалном периоду. Такође, код свих истраживаних јединки црног бора из Србије потврђено је присуство три мутације на мтДНК локусу *nad7* интрон1 које их одвајају од јединки из западног Медитерана. Према томе, детектоване мутације могу да се користе као молекуларни дијагностички маркери за дискриминацију јединки црног бора са Иберијског и Балканског полуострва, али да би се формирала комплетна слика потребно је утврдити варијабилност секвенце интрона 1 *nad7* гена и код јединки са Апенинског полуострва, као и у Малој Азији. Кандидаткиња закључује да треба наставити истраживања, јер је за стицање бољег увида у таксономске, демографске, генетичке, еволутивне и друге поцесе у популацијама црног бора потребно укључити у анализе популације из целог ареала распрострањења, као и већи број фитохемијских и молекуларних маркера на нивоу сва три биљна генома. Као што је показано у овој студији, варијабилност хлоропластних микросателита и митохондријалних некодирајућих региона се може искористити за извођење одређених закључака, док је за извођење закључака на основу варијабилности једарног генома потребно користити алтернативне молекуларне маркере а не EST-микросателите који су раније развијени за *P. taeda*.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 561 библиографску јединицу. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

У поглављу **ПРИЛОГ** приказане су слике FID хроматограма кутикуларног воска и етарског уља четина одабраних узорака *P. nigra*, слике PCR продуката истраживаних секвенци из сва три биљна генома, електроферограми једарних EST-микросателита и хлоропластних микросателита, као и приказ поравнатих митохондријалних ДНК секвенци некодирајућег региона *nad7* intron1 *P. nigra*.

Радови и конгресна саопштења који чине део докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M22** Bojović, S., Šarac, Z., Nikolić, B., Tešević, V., Todosijević, M., Veljić, M., Marin, P. D. (2012) Composition of *n*-alkanes in natural populations of *Pinus nigra* from Serbia – chemotaxonomic implications. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 2761-2774.

2. **M22 Šarac, Z.,** Bojović, S., Nikolić, B., Tešević, V., Đorđević, I., Marin, P. D. (2013) Chemotaxonomic significance of the terpene composition in natural populations of *Pinus nigra* J. F. Arnold from Serbia. *Chemistry & Biodiversity*, 10, 1507-1520.
3. **M22 Šarac, Z.,** Matejić, J. S., Stojanović-Radić, Z. Z., Veselinović, J. B., Džamić A. M., Bojović, S., Marin, P. D. (2014) Biological activity of *Pinus nigra* terpenes – evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in Biology and Medicine*, DOI: 10.1016/j.compbiomed.2014.08.022 (*in press*).

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M64 Šarac, Z.,** Randelović, V., Bojović, S., Marin, P. D. (2010) Horološke i ekološke karakteristike vrste *Pinus nigra* Arn. u Srbiji. 10th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Book of abstracts, Niš, 38.
2. **M64 Šarac, Z.,** Bojović, S., Nikolić, B., Tešević, V., Todosijević, M., Veljić, M., Marin, P. D. (2013) Chemodiversity of *n*-alkanes in the needle wax of *Pinus nigra* ssp. *nigra* from Tara mountain. 11th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Book of abstracts, Niš, 110.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Зорице Шарац под насловом: „Утврђивање варијабилности и диференцијације природних популација *Pinus nigra* Arnold у Србији коришћењем фитохемијских и молекуларних маркера“ представља свестрано и савремено урађену студију у области биохемијске и молекуларне систематике биљака. По свом обиму, садржају, оригиналности резултата, начину њиховог представљања и интерпретацији, уз осврт на обимну и релевантну литературу, поднети текст има све одлике докторске дисертације. На квалитет текста је утицао спој знања и умећа кандидаткиње Зорице Шарац примењених у одговарајућим лабораторијама. Кандидаткиња је на примерен начин представила истраживачку област у којој је радила и резултате до којих је дошла. Треба истаћи да је кандидаткиња, на основу резултата сопствених вишегодишњих истраживања и прегледа веома обимне литературе, формулисала правце даљих истраживања у овој области, који су веома перспективни, судећи према кретањима истраживања и најсавременијим резултатима из систематике и филогеније биљака у светској литератури.

Комисија сматра да докторска дисертација Зорице Шарац по свом приступу и интерпретираним резултатима представља значајан допринос у познавању фитохемијског и генетичког диверзитета и диференцијације природних популација црног бора на простору централног Балкана. Добијени резултати, не само у оквиру докторске дисертације него и резултати истраживања из уже научне области, који нису укључени у текст дисертације, штампани су у већем броју радова међународним и истакнутим међународним часописима, што потврђује да је кандидаткиња, у сарадњи са менторима, пажљиво одабрала тему истраживања, која ће и у наредном периоду бити, надамо се, успешно развијана.

Поред одговора на постављене непосредне циљеве истраживања, кандидаткиња указује на смернице за будућа истраживања, чиме се отвара перспектива за мултидисциплинарни приступ у оквиру ове области, уз сарадњу са иностраним експертима, тимовима и институцијама. Кандидаткиња је у току досадашњих истраживања публиковала више радова из научне области којом се бави. Комисија са посебним задовољством истиче да је, до сада, из резултата који представљају део докторске дисертације, публиковала три рада у истакнутим међународним часописима и да је на два рада први аутор. У припреми су још два рада из области докторске дисертације. Такође, учествовала је са два саопштења на научним скуповима. Зорица Шарац је у току израде докторске дисертације добро профилисана и оспособљена за самосталан научни рад, што се може закључити на основу увида у досадашње научне активности, као и публикованих резултата у истакнутим научним часописима.

На основу свега изложеног, комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

У Београду, 25.08.2014. године.

КОМИСИЈА:

Др Петар Д. Марин, редовни професор
Биолошки факултет Универзитета у Београду

Др Срђан Бојовић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања
„Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

Др Јелена Алексић, научни сарадник
Институт за молекуларну генетику и
генетичко инжењерство Универзитета у Београду

Др Биљана Николић, виши научни сарадник
Институт за шумарство у Београду

Др Пеђа Јанаћковић, ванредни професор
Биолошки факултет Универзитета у Београду
