

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IV редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 29.01.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Снежане Здравковић-Кораћ и др Јелене Савић о урађеној докторској дисертацији **Љиљане Б. Тубић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, под насловом „**Морфогенеза и регенерација биљака шалота (*Allium ascalonicum* L.) и влашца (*A. schoenoprasum* L.) *in vitro***“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

Др **Снежана Здравковић-Кораћ**, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

Др **Јелена Савић**, научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

Др **Анета Сабовљевић**, 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 **Љиљане Б. Тубић** под насловом „**Морфогенеза и регенерација биљака шалота (*Allium ascalonicum* L.) и влашца (*A. schoenoprasum* L.) *in vitro***“ је урађена у Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања Универзитета у Београду, у оквиру пројекта основних истраживања „Биотехнологија *in vitro* – гајене, лековите и угрожене биљне врсте” (бр. 173015, 2011-2016) Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Дисертација је написана на 213 страна и садржи: 20 уводних страна (Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Резиме на српском и енглеском језику, Садржај и Скраћенице), затим **Увод** (49 стр.), **Циљеве рада** (1 стр.), **Материјал и методе** (17 стр.), **Резултате** (44 стр.), **Дискусију** (27 стр.), **Закључке** (4 стр.), **Литературу** (46 стр. са 545 референци), и прилоге (Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу) на укупно 5 страна. Дисертација садржи једну схему, 17 слика, 8 табела и 46 графика.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **Увод** детаљно су приказана најсавременија сазнања непосредно везана за предмет истраживања докторске дисертације. Најпре је дат концизан преглед свих путева морфогенезе биљака *in vitro*, а затим је врло детаљно описан механизам индукције *de novo* органогенезе пулољака и соматске ембриогенезе, са посебним освртом на успостављање градијента ауксина у експлантатима и формирање меристема. Направљена је паралела између развића апикалног меристема изданка и ектопично индукованих меристема током процеса каулогенезе. Истакнута је улога гена укључених у најранију фазу каулогенезе и

описани су молекуларни механизми контроле њихове експресије. Затим је дат детаљан приказ о цитокининима и њиховој функцији у регулацији физиолошких процеса у биљном организму, као групи биљних регулатора растења чијој је улози у индукцији морфогенезе *in vitro* посвећено значајно место у овој дисертацији. У наставку је описан процес настанка реактивних врста кисеоника (енг. *reactive oxygen species* - РОС) и механизми којима се биљни организам штити од оксидативног стреса. Изложена је улога РОС као секундарних гласника у физиолошким процесима код биљака, укључујући и покретање процеса морфогенезе *in vitro*. На крају овог поглавља дат је опис објеката истраживања, шалота и влашца, истакнут је њихов економски значај и дат опсежан преглед литературе о примени биотехнологије у оплемењивању ових и других врста лукова и индукцији регенерације *in vitro*.

У поглављу **Циљеви рада** су истакнути најважнији задаци које је кандидаткиња поставила с циљем развијања ефикасног и поузданог протокола за индукцију морфогенезе *in vitro* код шалота и влашца. Први циљ истраживања је био тестирање индивидуалне варијабилности морфогеног потенцијала насумично изабраних јединки шалота и влашца из слободно-опрашујуће популације биљака и избор јединки са високим каулогеним/ембриогеним потенцијалом. С циљем повећања ефикасности процеса каулогенезе/соматске ембриогенезе, линије са високим и стабилним регенеративним потенцијалом су коришћене за оптимизацију услова индукције ових процеса (избором експлантата, комбинације регулатора растења, трајања третмана и услова осветљења). Следећи циљ односио се на анализирање порекла регенераната скенирајућом електронском микроскопијом и хистолошком студијом, као и *in vivo* локализацију H_2O_2 , чиме би требало објаснити улогу оксидативног стреса у индукцији процеса морфогенезе. С обзиром на значајну улогу РОС у процесима растења и развића биљака, следећи циљ истраживања у оквиру ове дисертације је био студирање промена активности ензима антиоксидативног система (пероксидаза, каталаза и супероксид-дисмутаза) да би се одредила њихова улога у процесу морфогенезе.

У поглављу **Материјал и методе** описане су процедуре за индукцију регенерације из апикалних фрагмената коренова шалота и влашца и базалних одсечака биљака влашца, процедуре за скенирајућу електронску микроскопију и хистолошку анализу биљног материјала, анализу изоформи ензима антиоксидативног система нативном електрофорезом и спектрофотометријским одређивањем њихове активности, као и процедура за *in vivo* детекцију H_2O_2 у експлантатима. Сви протоколи су детаљно приказани, што омогућава потпуну репродуцибилност експеримената. Статистичка значајност анализираних фактора је тестирана анализом варијансе, а средње вредности третмана су упоређене LSD или Duncan *post-hoc* тестом.

У оквиру поглавља **Резултати** приказани су добијени резултати, у складу са постављеним циљевима докторске дисертације. Код шалота је индукована индиректна каулогенеза из апикалних одсечака коренова и установљено је да само апикални регион корена има регенеративни потенцијал. Успостављена је колекција индивидуалних линија шалота. Линија представља клон једне индивидуе, умножене регенерацијом пупољака из апикалних одсечака коренова, као и цикличном регенерацијом из коренова тих регенераната. У дисертацији је демонстрирана висока варијабилност регенеративног потенцијала индивидуалних линија шалота, са фреквенцом регенерације 0,93 - 100% и 0,01 - 20,67 пупољака по експлантату. Да би се искључио утицај генотипа на процену утицаја других фактора на процес каулогенезе, за оптимизацију процеса каулогенезе је искоришћена линија са највећим каулогеним и ризогеним потенцијалом. Показано је да присуство светлости, однос ауксина и цитокинина у хранљивој подлози и трајање фазе индукције калуса значајно утичу на ефикасност процеса каулогенезе код изабране линије шалота. Применом оптимизованог протокола на линије са нижим регенеративним потенцијалом, њихов регенеративни потенцијал је значајно повећан, али је и даље био вишеструко нижи у односу

на високо регенеративне линије шалота. У овој докторској дисертацији је недвосмислено демонстрирано да генотип има највећи утицај на каулогени потенцијал шалота.

Код влашца је из апикалних одсецака коренова индукована регенерација процесом индиректне соматске ембриогенезе, а за оптимизацију протокола за регенерацију је такође изабрана високо регенеративна линија. Демонстрирано је да је за индукцију ембриогеног калуса било есенцијално присуство ауксина и цитокинина у хранљивој подлози и да је кинетин стимулисао развиће соматских ембриона. Међутим, и поред тога што су се соматски ембриони у високом проценту развили у комплетне биљке, које су се ефикасно аклиматизовале на услове у стакленику, ефикасност индукције ембриогеног калуса није била висока (45%) и процедура је била релативно дуготрајна. С циљем убрзања и повећања ефикасности процеса *de novo* регенерације, тестиран је регенеративни потенцијал базалних одсецака биљака влашца. Успешно је индукована директна каулогенеза из базалних одсецака биљака исте високо регенеративне линије. Демонстрирано је да само пресеци биљака који садрже апикални меристем изданка регенеришу адвентивне пупољке и да је за индукцију каулогенезе из ових експлантата било довољно присуство цитокинина. Од 6 тестираних представника свих структурних група цитокинина, тидиазурон (ТДЗ) је био најефикаснији у индукцији каулогенезе, мада није повољно деловао на развиће пупољака у комплетне биљке. Биљке са супериорним морфолошким параметрима су се формирале из експлантата гајених на хранљивој подлози са кинетином (Кин). Оптимизацијом процедуре, гајењем експлантата најпре на хранљивој подлози која је садржала 10 μM ТДЗ, а затим на хранљивој подлози са 5 μM Кин, значајно су побољшани морфолошки параметри регенерисаних биљака, уз очување високе ефикасности процеса каулогенезе. У односу на претходну процедуру за регенерацију соматских ембриона из апикалних одсецака коренова влашца, процедура за регенерацију пупољака из базалних одсецака биљака влашца је троструко скраћена. Скенирајућом електронском микроскопијом и хистолошким анализом је установљено да адвентивни пупољци регенеришу из базалних делова листова и меристемоида из површинских слојева базалне плоче влашца. Управо у овом региону је детектовано присуство H_2O_2 у експлантатима култивисаним на индукционом медијуму који је садржао 10 μM ТДЗ. У експлантатима гајеним на хранљивој подлози са 10 μM ТДЗ, који су имали највећи каулогени потенцијал, уочена је бржа промена и виши ниво активности свих тестираних антиоксидативних ензима у односу на експлантате гајене на хранљивој подлози са 1 μM Кин, који су имали најнижи каулогени потенцијал. Само у експлантатима гајеним на хранљивој подлози са 10 μM ТДЗ је детектована специфична изоформа пероксидазе, после трећег дана од почетка третмана, која је коинцидирала са повећаном активношћу укупних пероксидаза. Резултати ове дисертације указују на значајну улогу оксидативног стреса у покретању процеса каулогенезе из базалних одсецака биљака влашца.

У поглављу **Дискусија** добијени резултати су детаљно објашњени и упоређени са досадашњим сазнањима из ове области физиологије биљака. Најпре је истакнуто да за регенерације *in vitro* влашца и шалота у литератури има само неколико података и да ти протоколи нису довољно ефикасни за примену у оплемењивању ових биљних врста. У наставку су дискутовани резултати који се односе на избор коренова као биљног материјала за индукцију регенерације. Констатовано је да су се код других врста лукова коренови показали као добар биљни материјал за ефикасну индукцију регенерације *in vitro*. Изолацијом коренова током дужег времена и индукцијом каулогенезе било је могуће умножити почетни биљни материјал и студирати утицај генотипа на нивоу индивидуе. У дисертацији је истакнута висока варијабилност регенеративног потенцијала индивидуалних линија, која јасно илуструје снажан утицај генотипа на ову особину. Овај резултат је протумачен у светлу сличних примера из литературе. Наглашено је да је студирање регенеративног потенцијала на нивоу индивидуе врло ретко у литератури и да се најчешће примењује насумично узорковање јединки за експеримент, што може значајно утицати на резултат, кад се има у виду варијабилност фреквенце регенерације у опсегу 1-100%. Како је

истакнуто у дисертацији, велика варијабилност резултата и потреба за великим узорком, типична за технике културе биљних ткива и органа, се бар делимично може објаснити генетичком варијабилношћу биљног материјала. Истакнуто је да је према литературним подацима варијабилност потенцијала за *de novo* регенерацију полигена особина, али да се о генима који је детерминишу још увек зна врло мало и поред тога што је механизам индукције *de novo* регенерације у великој мери разјашњен. У складу са подацима из литературе, у овој дисертацији је демонстрирано да линије са високим регенеративним потенцијалом брже регенеришу, што је отворило могућност скраћења процедуре одабиром високо регенеративних линија.

У дисертацији је истакнут и утицај других фактора на експресију регенеративног потенцијала. Наглашено је да се насупрот уобичајеној пракси, код лукова и генерално, за постизање максималног регенеративног потенцијала експлантати морају гајити у присуству светлости током фаза индукције калуса и индукције регенерације пупољака. У даљем тексту је дискутовано о утицају регулатора растења на индукцију каулогенезе. За разлику од неких врста лукова, код шалота је ауксин био довољан за индукцију регенерације, али је за ефикасну регенерацију била потребна комбинација ауксина и цитокинина. Примена оптимизованог протокола на линије са ниским регенеративним потенцијалом је врло позитивно утицала на повећање њиховог регенеративног потенцијала. Осим тога, наглашено је да је оптимизацијом услова скраћено трајање фазе индукције калуса, што је врло значајно с обзиром да 2,4-дихлорфенокси сирћетна киселина (2,4-Д) током времена индукује појаву хромозомских абериација. Истакнуто је да су биљке шалота добијене у овој дисертацији биле здраве, без видљивих фенотипских промена и да су се у високом проценту аклиматизовале на услове у стакленику.

У даљем тексту Дискусије коментарисани су резултати који се односе на индукцију регенерације из одсечака коренова влашца. И код ове биљне врсте је потврђена индивидуална варијабилност регенеративног потенцијала. Истакнуто је да, за разлику од шалота, 2,4-Д није био довољан за индукцију каулогенезе/соматске ембриогенезе код влашца, па је било неопходно комбиновати га са цитокинином. Слично шалоту, и код влашца је само апикални регион корена имао регенеративни потенцијал. Међутим, за разлику од шалота, апикални одсечци коренова влашца су регенерисали процесом индиректне соматске ембриогенезе. Разлике у регенеративном одговору шалота и влашца су дискутоване у складу са широко прихваћеним ставом да експресија регенеративног потенцијала биљног материјала зависи од његове генетичке основе и физиолошког стања. Ефикасност процеса соматске ембриогенезе и развића ембриона у комплетну биљку је дискутовано у односу на овај процес код других врста лукова. Истакнуто је да је постигнута ефикасност регенерације у складу са литературним подацима, или чак боља, али да је протокол непрактичан због дуготрајности и бројних промена хранљиве подлоге. Према подацима из литературе, базална плоча и меристем имају већи регенеративни потенцијал од одсечака коренова. У складу с тим, развијен је протокол за индукцију директне каулогенезе из базалних одсечака биљака влашца. За експерименте је коришћена високо регенеративна линија влашца, која је умножена процесом каулогенезе из апикалних одсечака коренова током претходних експеримената. Констатовано је да је регенеративни потенцијал имала само уска зона експлантата - адаксијална површина базалне плоче и основа листова. Поређењем са неколико врста лукова, код којих је индукована слична појава, установљено је да овај регион биљке има изузетан регенеративни потенцијал. Међутим, за разлику од већине других лукова, код влашца није било потребно оштетити апикални меристем да би се из експлантата развили адвентивни пупољци. Како је истакнуто у дисертацији, цитокинин је био неопходан и довољан регулатор растења за индукцију директне каулогенезе из базалних одсечака биљака влашца. У наставку Дискусије коментарисан је ефекат типичних представника свих структурних група цитокинина на ефикасност процеса каулогенезе и морфолошке параметре регенерисаних биљака. У складу са подацима из литературе, по којима је ТДЗ ефикасан у

индукцији регенерације код бројних биљних врста рекалцитрантних према регенерацији *in vitro*, и у овој дисертацији ТДЗ се показао као најделотворнији цитокинин. Истакнуто је да ТДЗ, с обзиром да има другачију хемијску структуру од природних цитокинина, различито утиче на метаболизам ендогених цитокинина и отпорнији је према катаболичком ензиму цитокинин оксидази/дехидрогенази, услед чега има продужено дејство. Дискутовано је да се вероватно на овај начин могу објаснити инфериорни морфолошки параметри биљака гајених на хранљивој подлози која је садржала ТДЗ. За разлику од бројних литературних података, у овој дисертацији је показано изузетно повољно дејство Кин на развиће кореновог система. Истакнуто је да је излагањем експлантата утицају ТДЗ, а затим Кин, добијен ефикасан систем за индукцију пупљака и њихово развиће у биљке компетентне за аклиматизацију.

У Дискусији је констатовано да је у дисертацији демонстрирано да само врло уска зона експлантата, коју чини адаксијална површина базалне плоче и основа листова, има каулогени потенцијал, што је потврђено скенирајућом електронском микроскопијом и хистолошком анализом. *In vivo* локализација H_2O_2 управо у том региону указује на његову улогу у индукцији каулогенезе. Ова чињеница, као и повишен ниво ензима антиоксидативног система у експлантатима гајеним на индукционој хранљивој подлози су дискутовани у дисертацији у светлу позитивног ефекта умереног оксидативног стреса на индукцију морфогенезе. С обзиром на значајну улогу пероксидаза у процесима растења и развића, специфична изоформа пероксидазе која је детектована само у експлантатима са високим регенеративним потенцијалом се може сматрати биохемијским маркером процеса каулогенезе код влашца.

У поглављу **Закључци** изведени су концизни закључци на основу резултата добијених у докторској дисертацији. Коренови влашца и шалота имају значајан регенеративни потенцијал, али само апикални регион коренова обе врсте има каулогени/ембриогени потенцијал. Код шалота је из ових експлантата индукована индиректна каулогенеза, а код влашца индиректна соматска ембриогенеза применом истих регулатора растења. Код обе биљне врсте генотип је у највећој мери утицао на регенеративни потенцијал, али је за потпуну експресију регенеративног потенцијала потребан оптималан ниво других фактора: присуство и одговарајућа густина флукса светлости, однос ауксина и цитокинина у хранљивој подлози, трајање индукције калуса. Индивидуалне линије имају изузетно варијабилан регенеративни потенцијал, који се само донекле може повећати у оптималним условима. Код влашца је демонстрирано да базални одсечци биљака имају већи регенеративни потенцијал од апикалних одсечака коренова исте линије и да је у оба случаја најефикаснија регенерација пупољака индукована под утицајем ТДЗ. Из базалних одсечака биљака влашца је индукована директна каулогенеза, из ћелија базалне плоче и основе листова. У овом региону је локализован H_2O_2 , а и активност антиоксидативних ензима је била повећана под условима који погодују регенерацији пупољака, што указује на улогу оксидативног стреса на индукцију каулогенезе.

У поглављу **Литература** наведено је 545 библиографских јединица, од којих је већина публикована у водећим часописима из области науке о биљкама. Актуелност истраживања приказаних у овој докторској дисертацији најбоље илуструје чињеница да је 16 % публикација коришћених током израде ове докторске дисертације публиковано у последњих 5 година.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

1. Zdravković-Korać S, Milojević J, **Tubić Lj**, Ćalić-Dragosavac D, Mitić N, **M21** Vinterhalter B (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration from root

sections of *Allium schoenoprasum* L. Plant Cell Tiss Org Cult 101: 237-244.

2. **Tubić Lj**, Zdravković-Korać S, Mitić N, Milojević J, Čalić-Dragosavac D, M23
Vinterhalter B (2011) Plant regeneration from transverse stalk sections of chive plants. Romanian Biotechnol Lett 16: 55-59.
3. **Tubić Lj**, Anačkov G, Milojević J, Ghalawenji N, Mitić N, Igić R, Zdravković-Korać S (2014) High variability in the tissue culture response of root-tips of *Allium ascalonicum* individuals and optimization of the regeneration procedure. Plant Cell Tiss Organ Cult 118: 101-110. M21
4. **Tubić Lj**, Savić J, Mitić N, Milojević J, Janošević D, Budimir S, Zdravković-Korać S (2016) Cytokinins differentially affect regeneration, plant growth and antioxidative enzymes activity in chive (*Allium schoenoprasum* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult 124: 1-14. M21

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Zdravković-Korać S, Mitić N, Milojević J, **Tubić Lj**, Čalić-Dragosavac D, M34
Vinterhalter B (2010) Plant regeneration from transverse sections of chive plants. 3rd International Symposium of Biotechnology. 18-19th November, Bucharest, Romania. Book of abstracts, p. 54.
2. **Tubić Lj**, Milojević J, Mitić N, Vinterhalter B, Zdravković-Korać S (2013) M34
Efficiency of cytokinins in promotion of shoot regeneration of *Allium schoenoprasum*. 1st International Conference on Plant Biology and 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Subotica, Serbia, 4-7 June, Book of abstracts, p. 33.
3. **Tubić Lj**, Anačkov G, Milojević J, Čalić D, Mitić N, Igić R, Zdravković-Korać S M34
(2013) An optimised procedure for bud regeneration from root sections of *Allium ascalonicum*. 1st International Conference on Plant Biology and 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Subotica, Serbia, 4-7 June, Book of abstracts, p. 70.

Конгресна саопштења на скуповима националног значаја

1. **Tubić Lj**, Zdravković-Korać S, Mitić N, Milojević J, Budimir S, Janošević D, M64
Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2011) Somatic embryo regeneration from transverse stalk sections of chive plants. 19th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Banja Vrujci, Serbia, 13-15 June, Book of abstracts, p. 44.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Љиљане Б. Тубић**, под насловом „**Морфогенеза и регенерација биљака шалота (*Allium ascalonicum* L.) и влашца (*A. schoenoprasum* L.) *in vitro***“ је оригиналан и значајан допринос разумевању процеса морфогенезе *in vitro* код ових биљних врста. Осим фундаменталног доприноса области физиологије биљака, овај рад има и апликативни потенцијал у оплемењивању ових биљних врста савременим методама генетичког инжењерства и соматске хибридизације. У дисертацији су дефинисани фактори који имају одлучујући утицај на ефикасност процеса каулогенезе/соматске ембриогенезе. Оригиналним приступом је процењен индивидуални утицај сваког фактора и њихове интеракције на ове процесе. Осим тога, истакнута је улога оксидативног стреса у индукцији

директне каулогенезе код влашца. Резултати ове дисертације су одлична основа за даље истраживање молекуларних механизма који леже у основи процеса *de novo* регенерације код лукова.

Комисија констатује да су постављени циљеви ове тезе у потпуности реализовани савременим методама, а резултати јасно представљени и адекватно илустровани. Кандидаткиња је током израде докторске дисертације развила изузетну способност планирања експеримената, анализе добијених резултата и њиховог тумачења у складу са актуелном светском научном литературом. Из докторске тезе су публикована 3 рада у врхунском међународном часопису, 1 рад у међународном часопису, 3 саопштења на скуповима међународног значаја и 1 саопштење на скупу националног значаја. Публикације из тезе кандидаткиње су до сада цитиране 12 пута у часописима међународног значаја и 3 пута у докторским тезама одбрањеним на универзитетима у свету.

На основу свега изнетог, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидаткиње **Љиљане Б. Тубић**, под насловом „**Морфогенеза и регенерација биљака шалота (*Allium ascalonicum* L.) и влашца (*A. schoenoprasum* L.) *in vitro***“.

КОМИСИЈА:

Др Снежана Здравковић-Кораћ

научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

Др Јелена Савић

научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

Др Анета Сабовљевић

ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

У Београду, 24.03.2016. године