

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 19.06.2020. године, на основу молбе ментора, др Јелене Самарцић, научног сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство-Универзитета у Београду, и др Светлане Радовић, редовног професора Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Драгане С. Боснић** (рођ. Николић), истраживач сарадник, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду под насловом: „Улога силицијумове киселине у модулацији одговора краставца (*Cucumis sativus* L.) на оксидативни стрес изазван токсичним концентрацијама бакра“, у саставу: др Јелена Самарцић, научни сарадник, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, проф. др Светлана Радовић, редовни професор Биолошког факултета, Универзитета у Београду и др Јелена Павловић, научни сарадник, Института за мултидисциплинарна истраживања, Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Драгане С. Боснић је оригинално истраживање које за тему има анализу улоге силицијумове киселине и механизме њеног дејства у модулацији одговора краставца (*Cucumis sativus* L.) на оксидативни стрес изазван токсичним концентрацијама бакра.

Докторска дисертација Драгане С. Боснић је урађена у Лабораторији за молекуларну биологију биљака у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

Дисертација је написана на 135 страна, садржи 43 слике и 7 табела. Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Садржај, Текст по поглављима и Прилоге. Текст дисертације садржи следећа поглавља: Увод (странице 1-32), Циљеви рада (страница 33), Материјал и методе (странице 34-46), Резултати (странице 47-78), Дискусија (странице 79-97), Закључци (страница 98) и

Литература (странице 99-130). У оквиру Прилога се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу. У докторској дисертацији је цитирано 655 извора литературе.

## **Анализа докторске дисертације**

Предмет докторске дисертације кандидаткиње Драгане С. Боснић јесте испитивање улоге силицијума у стресу изазваном повишеним концентрацијама бакра код биљака краставца, као представника дикотила које могу да активно усвајају силицијум у облику силицијумове киселине.

У поглављу **Увод** кандидаткиња је у оквиру 11 потпоглавља дала детаљан приказ савремених истраживања која се односе на проблематику докторске дисертације. Први део поглавља Увод посвећен је прегледу литературних података у вези са улогом бакра као есенцијалног елемента за растење и развиће биљака. Ова потпоглавља укључују описивање улоге бакра у различитим ћелијским процесима у биљкама као и регулацију његове хомеостазе у условима недостатка или прекомерног присуства. Значајна пажња је посвећена резултатима испитивања токсичних ефеката бакра на функционисање биљних ћелија, са посебним освртом на оксидативни стрес као најразорнију последицу присуства бакра у вишку. У наредним потпоглављима представљена су досадашња сазнања о различитим улогама силицијума, као корисног елемента за биљке, а пре свега у условима абиотичког стреса. На крају Увода дати су литературни подаци о биљци краставца као модел систему коришћеном у истраживању.

Поглавље **Циљеви** садржи јасно дефинисане циљеве овог истраживања. Општи научни циљ ове докторске дисертације јесте да се различитим експерименталним приступима пронађу и расветле физиолошки и молекуларни механизми који леже у основи потенцијалног протективног ефекта примене силицијума на биљке краставца гајене у условима стреса изазваног вишком бакра. У складу са тим су дефинисани специфични циљеви:

1. Описати визуелне промене на биљкама третираним бакром као и промене у структури и функцији биљних органа, корена и листа услед примене силицијума
2. Испитати утицај силицијумове киселине на процес усвајања бакра, његов садржај у биљним органима као и прерасподелу на субћелијском нивоу
3. Утврдити ниво оксидативног стреса у биљкама изложеним супраоптималним концентрацијама бакра, као и испитати активност и експресију ензима антиоксидативне заштите код биљака гајених са и без додавања силицијума у хранљивом медијуму
4. Испитати статус хелирајућих једињења (органичних киселина и аминокиселина) укључених у хомеостазу бакра, под утицајем силицијума

5. Анализирати утицај примене силицијума на експресионе профиле гена укључених у одговор на стрес, као и гена и протеина који садрже бакар као кофактор, заједно са miRNK које су одговорне за њихову регулацију на пост-транскрипцијом нивоу.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** које обухвата 13 потпоглавља дате су све информације неопходне за репродуковање експерименталних процедура са навођењем извора. Током израде докторске дисертације кандидаткиња Драгана С. Боснић је користила широк спектар метода и поступака који се грубо могу поделити на: 1. методе гајења и третмана биљака; 2. одређивање физиолошког статуса биљака и утврђивање нивоа стреса преко праћења параметара раста, одређивања садржаја хлорофила, статуса очуваности ћелијских мембрана и нивоа лигнификације; 3. методе хемијске анализе којима је одређиван минерални садржај у биљним органима, садржај фенола, органских и аминокиселина као и 4. молекуларно-биолошке и биохемиске методе којима је анализиран ниво експресије гена и протеина. На крају овог поглавља описане су методе за статистичку обраду резултата.

У поглављу **Резултати** организованом у седам потпоглавља представљени су резултати ове докторске дисертације документовани табеларним приказима и сликама. У прва два потпоглавља изложени су резултати ефеката различитих доза бакра на биљке краставца и одређивање концентрације бакра која је као токсични третман била коришћена у раду. Затим су представљени резултати који се тичу утицаја силицијума на физиолошке параметре биљака у стресу који су показали да силицијум има протективно дејство на биљке што је забележено преко повећања њихове биомасе, садржаја хлорофила, очувања ћелијских структура корена, али и смањене лигнификације корена. Трећа група резултата односи се на испитивање утицаја силицијума на усвајање, акумулацију и прерасподелу бакра и других есенцијалних микроелемената у биљкама краставца. Примена силицијума је довела до смањене експресије гена одговорних за усвајање бакра што је резултовало смањеном концентрацијом бакра у корену. Силицијум је допринео прерасподели бакра на нивоу ћелија корена, повећавајући везивање и имобилизацију бакра у ћелијским зидовима, што је смањило количину бакра унутар ћелија. Показано је да силицијум не утиче на транслокацију бакра до листова, нити значајно смањује концентрацију бакра у листовима, али је повећао садржај других микроелемената (Fe, Zn и Mn) у листовима који је био смањен код биљака услед изложености токсичном бакру. Са друге стране, силицијум је утицао на заступљеност бакра у ћелијским фракцијама листа где је највеће присуство регистровано у протеинској, а смањено у воденој фракцији. У ћелијским зидовима листова силицијум није имао утицаја на депозицију бакра. У наредном потпоглављу приказани су резултати анализе антиоксидативног статуса биљака у стресу са и без додатка силицијумове киселине. Силицијум је ублажио ефекте оксидативног стреса изазваног бакром што се огледа у смањењу нивоа липидне пероксидације и у повећању генске експресије и активности већине антиоксидативних ензима. У преосталим потпоглављима **Резултата** представљени су подаци добијени

анализом експресије гена и протеина, као и одређивања концентрације једињења која су потенцијални хелатори вишка јона бакра, а чија синтеза је индукована додатком силицијума. Показано је да силицијум стимулише синтезу хелаторских једињења који имају улогу „сакупљача“ вишка метала, као што су органске киселине, пре свега цитрат и малат у корену а аконитат у листу, као и аминокиселине хистидин и никоцијанамина који су одиграли доминанту улогу у хелирању бакра у листу. У овом раду је показано да силицијум делује на ублажавање стреса на транскрипционом и пост-транскрипционом нивоу. На пост-транскрипционом нивоу је утврђено да примена силицијума смањује експресију главних регулатора хомеостазе бакра, miR398 и miR408 у корену, чиме је остварено повећање експресије њихових таргета. С тим у вези запажено је повећање експресије изоформи супероксид-дисмутазе, пластоцијанина и лаказе као протеина који везују бакар и могу имати улогу складишта када је бакар присутан у вишку.

У поглављу **Дискусија** организованом у девет потпоглавља кандидаткиња је на адекватан начин тумачила и дискутовала добијене резултате, поредећи их са савременим научним сазнањима из релевантних научних области. Добијени резултати су критички анализирани и интерпретирани, и јасно је сагледан њихов значај и међусобна повезаност. У дискусији је дат могући механизам деловања силицијума у стресу бакром који укључује више нивоа. Силицијум остварује благотворно дејство на физиолошке параметре код биљака изложених повећаним концентрацијама бакра подизањем нивоа антиоксидативне заштите у коју су поред ензима укључени и хелатори бакра (протеини, аминокиселине и органске киселине), који везујући вишак редокс-активних јона бакра смањују ниво оксидативног стреса. Улога силицијума у усвајању, транспортовању и депоновању бакра је у овом раду анализирана и објашњена на више нивоа: транскрипционом, пост-транскрипционом и транслационом нивоу. На крају овог поглавља на јасан, прецизан и свеобухватан начин шематски су приказани комплексни механизми деловања силицијума на ублажавање стреса изазваног умерено токсичном концентрацијом бакра у корену и листу биљака краставца.

У поглављу **Закључци** су сажето и јасно изнети најважнији закључци до којих је кандидаткиња дошла анализирањем добијених експерименталних резултата. Добијени резултати су сумирани у укупно дванаест закључака:

1. Примена силицијума у облику силицијумове киселине, доприноси ублажавању стреса код биљака краставца (*Cucumis sativus* L.) изложених умерено токсичној концентрацији Си, што је показано смањењем нивоа лигнификације и изостанком феномена цурења електролита из корена, као и смањењем липидне пероксидације у ткивима корена и листа.
2. На нивоу корена, Si смањује унос Си путем смањења експресије гена који кодирају FRO4 редуктазу и СОРТ1 транспортер. Поред тога, Si утиче на прераспodelу Си на нивоу ћелија корена, повећавајући везивање и имобилизацију Си у ћелијским зидовима, што за последицу има смањену количину Си унутар ћелија.
3. Примена Si повећава биомасу и садржај биљних пигмената у листу.

4. Si не утиче на транслокацију Cu до листова, нити на значајно смањење укупне концентрације Cu у листовима. Са друге стране, Si утиче на заступљеност Cu у ћелијским фракцијама листа, тако што повећава његово присуство у протеинској а смањује у воденој фракцији, са изузетком ћелијских зидова у којима је депозиција Cu непромењена.
5. Код биљака гајених са Si забележено је повећање активности ензима антиоксидативне заштите: SOD, APX и CAT.
6. Примена Si је утицала на повећање садржаја хелирајућих једињења - органских киселина (цитрата и малата у корену а аконитата у листу), док није била пресудна за индукцију металотионеина 3 и фитохелатин-синтазе.
7. Повећање цитрата у ксилему је омогућило ефикаснији транспорт Fe до листова и ублажавање дефицита Fe и других микроелемента (Zn и Mn).
8. Најзначајнији механизам заштите од токсичног деловања Cu у листу је акумулација аминокиселина никоцијанамина и хистидина, које су допринеле ефикасном уклањању реактивних јона Cu унутар ћелије.
9. Примена Si је смањила експресију главних регулатора хомеостазе Cu, miR398 и miR408 у корену, чиме је остварено повећање експресије њихових таргета CSD2 и LAC3.
10. Профил експресије CSD1 изоформе је у корелацији са укупном активношћу SOD ензима.
11. Важан механизам Si-стимулисане заштите од токсичног деловања Cu је акумулација Cu-протеина, CSD2 у корену и пластоцијанина у листу, као примарних складишта јона Cu.
12. Примена Si повећава толеранцију биљака краставца на присуство повишених концентрација Cu, кроз комплексно деловање на различите механизме заштите биљака од оксидативног стреса.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Bosnić D**, Nikolić D, Timotijević G, Pavlović J, Vaculík M, Samardžić J, Nikolić M. Silicon alleviates copper (Cu) toxicity in cucumber by increased Cu-binding capacity. Plant and Soil. 2019 Aug 1;441(1-2):629-41. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04151-5>, **M21a**, <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-019-04151-5>
2. **Bosnić D**, Bosnić P, Nikolić D, Nikolić M, Samardžić J. Silicon and Iron Differently Alleviate Copper Toxicity in Cucumber Leaves. Plants. 2019 Dec;8(12):554. <https://doi.org/10.3390/plants8120554>, **M21**, <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/12/554>

### Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Bosnić D**, Nikolić D, Timotijević G, Samardžić J, Nikolić M. Silicon alleviates copper toxicity in cucumber by increased Cu-binding capacity and enhanced antioxidative defense. 1<sup>st</sup> Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation. 2019, 2-4 October, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, Genetics & Applications: Special Edition, Book of abstracts, p. 93, **M 34**
2. **Bosnić D**, Timotijević G, Nikolić D, Samardžić J. Silicon application modulates the expression of microRNAs in cucumber plants under copper toxicity. Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress. 2016, 26-30 June, Prague, Czech Republic, Book of abstracts, ID 833, **M 34**
3. **Nikolić S.D**, Nikolić B.D, Timotijević G, Samardžić J, Nikolić M. Protective effect of silicon on cucumber grown under copper excess: A molecular approach. 1<sup>st</sup> Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students. 2015, 15-18 January, Belgrade, Serbia, Book of abstracts, p. 11, **M 34**
4. **Nikolić S.D**, Nikolić B.D, Timotijević G, Nikolić M, Samardžić J. Silicon alleviates oxidative stress in cucumber plants grown under copper excess. Reactive oxygen and nitrogen species and environment: a new vision for 2020. 2014, 15-17 October, Baeza, Spain, Book of abstracts, p. 55, **M 34**
5. **Nikolić S.D**, Samardžić J, Nikolić M. Silicon has a protective effect on cucumber grown in copper excess. 6<sup>th</sup> International Conference on Silicon in Agriculture. 2014, 26-30 August, Stockholm, Sweden, Book of abstracts, p. 136, **M 34**
6. **Nikolić S.D**, Nikolić B.D, Timotijević G, Pavlović J, Samardžić J, Nikolić M. Silicon mitigates oxidative stress in cucumber at copper excess. 1<sup>st</sup> International Conference on Plant Biology, 20<sup>th</sup> Symposium of the Serbian Plant Physiology Society. 2013, 4-7 June, Subotica, Serbia, Book of abstracts, p. 130, **M 34**
7. **Nikolic S.D**, Samardzic J, Stanisavljevic N, Maksimovic V. Silicon's role in alleviation of oxidative stress caused by excess of copper in cucumber. Plant Biology Congress. 2012, 29 July - 3 August, Freiburg, Germany, Book of abstracts, p. 578, **M 34**

### Провера оригиналности докторске дисертације

Коришћењем програма iThenticate извршена је провера оригиналности докторске дисертације Драгане С. Боснић. Извештај датиран 28.05.2020. је показао индекс подударности од 9%.

Увидом у Извештај утврђено је подударање са 43 примарна извора. Подударање са једним извором је било 2% (NaRDUS-ом, заједничким порталом свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији), док је са сваким од преосталих 42 примарних извора подударање било једнако или мање од 1%. Подударање се највећим делом односило на стандардно присутне делове докторских дисертација (навођење назива институција, уобичајених скраћеница, стручних термина,

општих фраза, назива поглавља, назива примењених метода, уређаја, реагенса и комерцијалних китова, захвалницу), као и претходно публиковане радове кандидаткиње, а који су проистекли из њене докторске дисертације. Поред тога делимично подударање уочено је и при описивању метода и процедура које се стандардно користе у молекуларној биологији или проистичу из упутства произвођача комерцијалних китова, као и при коришћењу терминологије при описивању методологије коришћене при статистичкој анализи података. Кандидаткиња је приликом израде дисертације поштовала академска правила цитирања и навођења литературних извора. Поред тога, увидом у Извештај потврђена је оригиналност резултата кандидаткиње.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње **Драгане С. Боснић**, под насловом „Улога силицијумове киселине у модулатији одговора краставца (*Cucumis sativus* L.) на оксидативни стрес изазван токсичним концентрацијама бакра“, представља свестран и оригиналан научни рад урађен по свим критеријумима научно-истраживачког рада. Циљеви докторске дисертације су јасно дефинисани и успешно реализовани, а коришћене методе истраживања и обраде резултата су савремене и адекватно одабране. Добијени резултати су дискутовани на логичан и систематичан начин и изведени закључци имају потпору у савременим публикацијама из дате области. У оквиру дисертације кандидаткиња је на свеобухватан и детаљан начин дала увид у неке од механизма деловања силицијума ублажавања ефеката стреса изазваног токсичним концентрацијама бакра. Разумевање механизма деловања силицијума у биљкама ће допринети његовој широј примени у циљу повећања толеранције биљака на стрес. Резултати приказани у овој дисертацији публиковани су у два оригинална рада (категорија M21a, M21) и представљени су на седам међународних скупова.

**Драгана С. Боснић** је кроз рад на докторској дисертацији показала висок степен самосталности, истраживачку зрелост, истрајност и самокритичност који су основ за успешно бављење истраживањем и који треба да буду одлика сваког кандидата који стиче звање доктора наука.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате и прегледане докторске дисертације, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени у потпуности и да добијени резултати имају велики значај у области молекуларне биологије и физиологије биљака. Стога Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Драгане С. Боснић**, под насловом „Улога силицијумове киселине у модулатији одговора краставца (*Cucumis sativus* L.) на оксидативни стрес изазван токсичним концентрацијама бакра“ и кандидату омогући јавну одбрану рада.

## КОМИСИЈА:

У Београду, 02.07.2020. године

---

др Јелена Самарцић, научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду

---

проф. др Светлана Радовић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

---

др Јелена Павловић, научни сарадник, Институт за мултидисциплинарна истраживања, Универзитет у Београду