

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 15. јула 2014. године, прихваћен је извештај ментора др Иване Момчиловић и др Иване Драгићевић о урађеној докторској дисертацији **мр Masoud M. A. Hfidan-а**, докторанда Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом „Утицај салицилне киселине на експресију протеина топлотног стреса и морфолошке особине биљака кромпира (*Solanum tuberosum* L.) у условима топлотног стреса *in vitro*“, *енг.* „**Effect of salicylic acid on the expression of heat-shock proteins and morphology of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants under heat stress *in vitro***“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Ивана Момчиловић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, др Ивана Драгићевић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, др Ангелина Суботић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација мр Masoud M. A. Hfidan-а под називом „Утицај салицилне киселине на експресију протеина топлотног стреса и морфолошке особине биљака кромпира (*Solanum tuberosum* L.) у условима топлотног стреса *in vitro*“, *енг.* „**Effect of salicylic acid on the expression of heat-shock proteins and morphology of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants under heat stress *in vitro***“, урађена је у Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду.

Докторска дисертација је написана на укупно 120 страна. Уводних страна (Насловна страна на српском и енглеском језику, Страна са информацијама о менторима и члановима комисије, Захвалница, Резиме на српском и енглеском језику, Скраћенице и Садржај) има 12. Дисертација се састоји из седам основних поглавља: **Увод** (37 страна), **Циљ рада** (1 страна), **Материјал и методе** (8 страна), **Резултати** (19 страна), **Дискусија** (9 страна), **Закључци** (3 стране) и **Литература** (19 страна). Поред наведених поглавља, дисертација садржи 24 слике (5 у поглављу Увод, 3 у поглављу Материјал и методе и 16 у поглављу Резултати), у оквиру којих је приказано 37 хистограма, једну табелу (у поглављу Материјал и методе) и 328 литературних цитата. На крају дисертације су приложена следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна).

Циљ ове дисертације је био да се установи ефекат салицилне киселине на отпорност према топлотном стресу код 4 сорте кромпира и да се испитају механизми који су значајни за индукцију отпорности, што је укључило испитивање протеина

топотног стреса (*енг.* heat-shock proteins; HSP), HSP17.6, HSP21, HSP101 и ензима Cu/Zn супероксид дисмутаза (Cu/ZnSOD).

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У **Уводу** кандидат Masoud M. A. Hfidan даје преглед савремених сазнања из области физиологије стреса биљака са посебним акцентом на значај осетљивости кромпира према топлотном стресу и салицилне киселине као регулатора растења биљака који има значаја у индукцији отпорности биљака према факторима абиотичког стреса. Кандидат је детаљно изложио досадашња сазнања о: а) ботаничким и физиолошким особинама кромпира (*Solanum tuberosum* L.) – биљне врсте која је била објекат истраживања; б) утицају високих температура на растење, развиће и принос кромпира; в) салицилној киселини, као регулатору растења који утиче на низ физиолошких процеса код биљака, укључујући и отпорност према биотичком и абиотичком стресу; г) топлотном стресу и механизмима отпорности биљака према топлотном стресу; д) оксидативном стресу као секундарном ефекту топлотног стреса и значају ензима супероксид дисмутаза; њ) улози „heat-shock“ протеина и регулацији њихове експресије; и е) значају малих HSP (sHSP) и HSP101 за отпорност биљака према топлотном стресу.

У поглављу **Циљ рада** изложени су следећи појединачни циљеви истраживања: а) успостављање *in vitro* култура четири сорте кромпира; б) успостављање адекватног модел-система за праћење утицаја топлотног стреса на растење и развиће биљака кромпира *in vitro*; в) испитивање утицаја салицилне киселине на морфолошке особине биљака кромпира *in vitro* у условима топлотног стреса; г) испитивање утицаја салицилне киселине на експресију и акумулацију протеина топлотног стреса, HSP17.6, HSP21 и HSP101, и Cu/ZnSOD.

У поглављу **Материјал и методе** јасно и детаљно су описане методе и услови под којима су гајене биљке 6 сорти кромпира ("Agria", "Arnova", "Liseta", "Laura", "Marabel" и "Cleopatra"), како *in vitro*, тако и *ex vitro*, као и дизајн експеримента. Приказане су детаљне процедуре за: а) прелиминарно одређивање термотолеранције биљака кромпира „electrolyte leakage“ тестом; б) успостављање *in vitro* култура четири одабране сорте кромпира, гајење и умножавање биљака *in vitro*; в) испитивање утицаја салицилне киселине на морфолошке особине биљака кромпира на собној температури и у условима топлотног стреса *in vitro*; г) прикупљање биљног материјала ради испитивања утицаја салицилне киселине на експресију протеина топлотног стреса у условима топлотног стреса *in vitro*; в) одређивање заступљености одређених протеина коришћењем SDS-полиакриламид гел електрофорезе и имуноблот анализе.

Поглавље **Резултати** састоји се из осам целина и садржи 16 слика, у оквиру којих је приказано 37 хистограма, које описују резултате добијене у оквиру истраживања. У првој целини су приказани резултати везани за одређивање релативне термотолеранције биљака кромпира гајених *ex vitro* (у стаклари) „electrolyte leakage“ тестом. Овај тест се користи за процену очуваности ћелијских мембрана приликом излагања ткива топлотном стресу. Добијени резултати показали су да се испитиване сорте кромпира могу поделити у 3 групе: релативно термотолерантне ("Liseta" и "Laura"), релативно термоосетљиве ("Agria" и "Arnova") и сорте чију релативну термотолеранцију није било могуће одредити са сигурношћу ("Marabel" и "Cleopatra"). На основу ових резултата, за даље детаљније проучавање термотолеранције кромпира одабране су 4 сорте, које су успешно уведене у културу *in vitro* и са којима су рађени сви експерименти у овом раду. У другој целини приказани су резултати везани за

успостављање *in vitro* културе кромпира: успешност површинске стерилизације избојака, развој изданака из апикалних и бочних пупољака на примарним експлантатима и успостављање система за умножавање биљака путем једнонодалних сегмената стабла. У трећој, четвртој и петој целини приказани су резултати везани за испитивање утицаја салицилне киселине (СА) на морфолошке особине (број интернодија, дужина изданака, број коренова и дужина коренова) биљака гајених *in vitro* на стандардној температури за гајење у овим условима (23 °C), или излаганих краткотрајном (45 °C, 6h), односно дуготрајном (35 °C, 20 дана) топлотном стресу. Експериментални поступак који је кандидат развио за испитивање ефеката топлотног стреса *in vitro* показао се успешним, јер је омогућио извођење претретмана и третмана салицилном киселином под строго контролисаним условима, уз варирање само испитиваних фактора (концентрација СА и температура). Резултати овог рада показују да егзогено примењена салицилна киселина, у распону концентрација од 10^{-6} М до 10^{-4} М, стимулаторно делује на развој биљака кромпира из једнонодалних сегмената стабла у условима дуготрајног топлотног стреса. Салицилна киселина утиче и на издуживање изданка и корена, као и на ожиљавање изданака, а њен ефекат зависи од примењене концентрације и сорте кромпира. Добијено је да се у условима топлотног стреса ефекат СА мења зависно од тога да ли је примењен третман или претретман и да ли је стрес био краткотрајан или дуготрајан. У шестој и седмој целини поглавља Резултати приказан је утицај салицилне киселине на акумулацију протеина топлотног стреса, HSP17.6, HSP21 и HSP101, као и њен утицај на експресију Cu/ZnSOD у листовима биљака кромпира изложених краткотрајном топлотном стресу (35 °C или 45 °C, 6h). Ово су први резултати о акумулацији поменутих протеина под утицајем топлотног стреса добијени код кромпира. Приказани резултати показали су разлику у експресији и акумулацији HSP протеина под утицајем претретмана салицилном киселином, као и да ефекат салицилне киселине зависи од примењене концентрације. Индукција акумулације HSP17.6 уочена је при само једној од примењених концентрација салицилне киселине. Добијено је да ефекат СА на акумулацију HSP101 може бити и стимулаторан и инхибиторан, зависно од примењене концентрације. Смањена акумулација HSP21 уочена је у свим претретманима салицилном киселином. Осим тога, добијено је повећање акумулације Cu/ZnSOD у листовима биљака кромпира изложених краткотрајном топлотном стресу и у контроли (23 °C) при једном од претретмана салицилном киселином. Резултати приказани у осмој целини показују да је ефекат салицилне киселине на индукцију акумулације HSP17.6 најизраженији 3.-10. дана по престанку третмана и да опада 14-тог дана код три сорте, док код једне од сорти није уочено значајно повећање акумулације испитиваног HSP.

У **Дискусији** кандидат Masoud M. A. Hfidan добијене резултате разматра и пореди у светлу већ познатих чињеница, али и нових података добијених у овим истраживањима. Кад је реч о морфолошким особинама биљака кромпира гајених *in vitro*, најзанимљивији су подаци добијени за ефекте салицилне киселине на развој адвентивних коренова. Подаци из литературе показују да фолијарна примена салицилне киселине стимулише развој и издуживање коренова код неколико врста културних биљака у стаклари или пољу. Међутим, дати резултати су добијени у различитим експерименталним условима у односу на културу *in vitro*. Инхибиторни ефекат СА на иницијацију и издуживање коренова у условима *in vitro*, који је добијен у овој дисертацији, разматран је углавном у светлу примењеног топлотног стреса. Резултати Masoud M. A. Hfidan-а указују како на то да се ефекти СА могу сматрати фитохормонским ефектима (опажају се само у одређеном опсегу концентрација, ткива стабла и корена различито су осетљива на примењену СА, ефекат је различит када су у питању различити физиолошки процеси), тако и на то да топлотни стрес, зависно од

трајања и интензитета мења ефекте СА, а у неким случајевима их и сасвим ревертира. У литератури постоји мало података о утицају салицилне киселине на отпорност кромпира према топлотном стресу, као и утицају на протеине sHSP и HSP101 фамилије за које се сматра да представљају главне компоненте механизма заштите целуларних протеина од термалне агрегације и деградације. У условима топлотног стреса, sHSP спречавају термалну агрегацију протеина, док HSP101 омогућавају ресолубилизацију протеинских агрегата, као и на иницијацију интернодија стабла и издуживање изданака у условима краткотрајног и дуготрајног топлотног стреса *in vitro*. Претретман салицилном киселином различито утиче на акумулацију протеина топлотног стреса. Стимулаторни ефекат на HSP17.6 уочен је по претретману са 10^{-5} М СА. Једини литературни податак у вези са утицајем СА на експресију HSP17.6 показује да мутанти *Arabidopsis thaliana* који продукују већу количину СА акумулирају значајно више HSP17.6 протеина у условима топлотног стреса у односу на мутанте са ниским нивоом ендogene СА. Резултати ове докторске дисертације указују на то да и егзогена примена СА може стимулирати акумулацију овог важног цитоплазматичног sHSP. Осим тога, претретман са 10^{-5} М СА довео је и до индукције акумулације Cu/ZnSOD. Претретмани салицилном киселином инхибиторно су деловали на акумулацију HSP21. Стимулација акумулације HSP101 је уочена када је примењена 10^{-6} М СА, а инхибиција при претретману највишом концентрацијом СА (10^{-4} М) што указује на потенцијалну разлику у механизму деловања СА на HSP101 у односу на HSP17.6. Према литературом податку, садржај ендogene СА није имао утицаја на акумулацију HSP101 код мутаната *A. thaliana* у условима топлотног стреса, што указује на то да СА може имати другачији ефекат на експресију овог HSP у различитим биљним врстама. Резултати ове докторске дисертације пружају нове информације о термотолеранцији одабраних сорти кромпира.

У поглављу **Закључци** кандидат концизно и прегледно износи најзначајније закључке који су произашли из резултата докторске дисертације. Комисија издваја следеће закључке: **1)** дуготрајни топлотни стрес умереног интензитета инхибира развој биљака кромпира из једнонодалних сегмената у условима *in vitro*; **2)** егзогено примењена салицилна киселина, у распону концентрација од 10^{-6} М до 10^{-4} М, стимулаторно делује на развој биљака кромпира из једнонодалних сегмената стабла у условима дуготрајног топлотног стреса *in vitro*; **3)** претретман салицилном киселином у наведеном распону концентрација углавном не утиче на иницијацију интернодија стабла и издуживање изданака, док третман истим концентрацијама има стимулаторни ефекат на ове процесе растења и развића како у условима краткотрајног, тако и у условима дуготрајног топлотног стреса *in vitro*; **4)** претретман и третман салицилном киселином инхибирају издуживање коренова и при стандардној температури и када се примени HS (без обзира на трајање и интензитет стреса), међутим, HS генерално мења ефекат салицилне киселине (ублажује га); **5)** у условима краткотрајног HS (без обзира на његов интензитет) салицилна киселина стимулише експресију цитосолног HSP17.6 и инхибира акумулацију хлоропластног HSP21 у листовима све четири истраживане сорте кромпира.

У поглављу **Литература** наведено је 328 библиографских јединица, што показује студиозан приступ проблематици од стране кандидата, како по броју и актуелности коришћених библиографских јединица, тако и по релевантности њиховог избора.

БИБЛИОГРАФИЈА

**(обавезно је наведене радове и саопштења категорисати по листи ресорног Министарства за науку и технолошки развој)*

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Pantelić, D., Momčilović, I., Savić, J., **Hfidan, M.**, Dragičević, I., Vinterhalter, D. (2013) Effect of *in vitro* culturing on the expression of superoxide dismutase (SOD) in potato. 1st International Conference on Plant Biology & 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society Subotica, Serbia. Program and Abstracts, 123. **M34**
2. Savić, J., Momčilović, I., Pantelić, D., Zdravković-Korać, S., Čalić-Dragosavac, D., **Hfidan, M.** (2012) Effect of *in vitro* culturing on the expression of superoxide dismutase (SOD) and dehydrins in potato, *Solanum tuberosum* L. Plant Biology Congress Freiburg 2012, Freiburg, Germany. Book of abstracts, 421. **M34**

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. Momčilović, I., Pantelić, D., **Hfidan, M.**, Savić, J., Vinterhalter, D. (2014) Improved procedure for detection of superoxide dismutase isoforms in potato, *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 (8), 2059-2066. DOI 10.1007/s11738-014-1583-z **M22**

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

У докторској дисертацији **mp Masoud M. A. Hfidan-a** адекватно су примењене експерименталне процедуре које укључују савремене научне методе истраживања у области физиологије биљака и анализе протеина. У литератури постоји мало података о утицају салицилне киселине на отпорност кромпира према топлотном стресу, а ефекат салицилне киселине на експресију HSP протеина топлотног стреса до сада није испитиван. Резултати ове тезе доприносе расветљавању и бољем разумевању механизма отпорности биљака на топлотни стрес, један од најзначајнијих абиотичких фактора који ограничавају растење, развиће и продуктивност у глобалним размерама. Кандидат је у раду исказао самосталност у планирању и извођењу експеримената, као и познавање научних области које задата тема обухвата. Нова, модификована процедура за детекцију супероксид дисмутазе кромпира развијена је у оквиру ове дисертације и публикована у раду M22 категорије.

На основу изложеног Комисија закључује да су задаци постављени у циљу ове докторске дисертације успешно остварени и предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације мр Masoud M. A. Hfidan-а под насловом: „Утицај салицилне киселине на експресију протеина топлотног стреса и морфолошке особине биљака кромпира (*Solanum tuberosum* L.) у условима топлотног стреса *in vitro*“, *енг.* „Effect of salicylic acid on the expression of heat-shock proteins and morphology of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants under heat stress *in vitro*”.

У Београду, 25. 08. 2014. године.

КОМИСИЈА:

др Ивана Момчиловић, научни саветник,
Универзитет у Београду - Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“

др Ивана Драгићевић, ванредни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Ангелина Суботић, научни саветник,
Универзитет у Београду - Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“