

Биолошки факултет  
Број захтева: 33/25-1  
Датум: 30.1.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

### ЗАХТЕВ

#### за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Милица Д. Богдановић**

студент докторских студија на студијском програму Биологија, Експериментална и примењена ботаника

пријавио је докторску дисертацију под називом:

**„Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију, испитивање активности промотора и могућности утишавања гена ”.**

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 25.09.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-3621/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

**„Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и -оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена ”.**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 14.11.2014. год, одлуком Факултета под бр. 15/716-14.11.2014. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Ана Симоновић	виши научни сарадник	биологија	Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”
2.	др Ангелина Суботић	научни саветник	биотехнологија	Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”
3.	др Тијана Цветић- Антић	доцент	физиологија и молекуларна биологија биљака	Универзитет у Београду- Биолошки факултет

**Напомена:** уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

**Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 30. јануара 2015. године.**

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

**Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.**

**2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата**

**3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.**

**4. Електронска верзија.**



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16  
11000 БЕОГРАД  
Република СРБИЈА  
Тел: +381 11 2186 635  
Факс: +381 11 2638 500  
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/25-30.1.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на IV редовној седници одржаној 30.1.2015. године, донело је

**О Д Л У К У**

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

**Милице Д. Богдановић**, под називом:

**„Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и -оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена ”.**

Универзитет је дана 25.09.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-3621/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

**Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

**Б1. Радови у часописима међународног значаја:**

1. **Bogdanović M. D.**, Todorović S. I., Banjanac T., Dragičević M. B., Verstappen F. W. A., Bouwmeester H. J., Simonović A. D. (2014): Production of guaianolides in *Agrobacterium rhizogenes* - transformed chicory regenerants flowering in vitro. *Industrial Crops and Products* 60: 52-59 (M21)

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На II редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.11.2014. године, прихваћен је извештај ментора др Ане Симоновић и др Ангелине Суботић о урађеној докторској дисертацији Милице Д. Богдановић, истраживача сарадника на Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић", под насловом

### **„Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и -оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена“**

и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

**др Ана Симоновић**, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду,  
**др Ангелина Суботић**, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду,  
**др Тијана Цветић Антић**, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Милице Богдановић под насловом „Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и -оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена“ урађена је у оквиру међународног пројекта „*Plant Terpenoids for Human Health: a chemical and genomic approach to identify and produce bioactive compounds*“ (FP7 пројекат, бр. 227448) и пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије "Физиолошка, хемијска и молекуларна анализа диверзитета ретких и угрожених биљних врста у циљу *ex situ* заштите и продукције биолошки активних једињења" (бр. 173024). Експериментални део дисертације урађен је на Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" и у Лабораторији за физиологију биљака Универзитета у *Wageningen*-у, Холандија.

Докторска дисертација је написана на 261 страни. Уводних страна (Насловна страна на српском и енглеском језику, Страна са информацијама о менторима и члановима комисије, Захвалница, Резиме на српском и енглеском језику и Садржај) има 13. Дисертација се састоји из поглавља: Увод (32 стране), Циљ рада (1 страна), Материјал и методе (44 стране), Резултати (76 страна), Дискусија (35 страна), Закључци (2 стране), Литература (27 страна са 236 референци), Прилози (38 страна) и Листа скраћеница са речником (5 страна).

Дисертација садржи 92 слике (9 у поглављу Увод, 10 у поглављу Материјал и методе, 72 у поглављу Резултати и 1 у поглављу Дискусија) и 32 табеле (1 у поглављу Увод, 21 у поглављу Материјал и Методе, 7 у поглављу Резултати и 3 у поглављу Прилози). На крају дисертације су приложена следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна).

### **Анализа докторске дисертације:**

Ова дисертација припада области физиологије и молекуларне биологије биљака.

У **Уводу**, подељеном на четири потпоглавља, су дате теоријске концепције на којима се базира дисертација и досадашња сазнања из научних области које су у непосредној вези са предметом истраживања. У првом потпоглављу **Увода** су изнети основни подаци о врсти *Cichorium intybus*, са акцентом на употреби цикорије у традиционалној медицини и секундарним метаболитима који је карактеришу, а посебно сесквитерпенским лактонима типа гвајанолида. У другом потпоглављу је описана разноврсност и подела ових једињења, њихова биолошка активност и познат део биосинтетског пута у сродним биљним врстама. Сесквитерпенски лактони потичу од гермакрена А, који синтетише гермакрен А-синтаза (GAS) од фарнезил дифосфата. GAS ген код цикорије постоји у дужој (*GAS long*) и краћој (*GAS short*) форми. Гермакрен А се потом оксидује, циклизује и даље модификује, дејством гермакрен А-оксидазе (GAO) и костунолид-синтазе. Добијени костунолид је прекурсор сесквитерпенских лактона типа гвајанолида, еудезманолида и гермакранолида. Дат је преглед литературе о различитим варијантама ових ензима и гена који их кодирају у сродним биљним врстама из фамилије *Asteraceae*. Трећи део **Увода** бави се трансформацијом биљака агробактеријама, па је описан механизам генетичке трансформације бактеријским и котрансформације бактеријским и дизајнираним бинарним плазмидима. Размотрен је и утицај бактеријских онкогена на фенотип трансформисаних биљака и њихов секундарни метаболизам. У овом делу је дат и осврт на агроинфилтрацију, као методу пролазне трансформације корисну за брзу проверу експресије трансгена у биљкама. Посебно потпоглавље посвећено је прегледу литературе о трансформацији и регенерацији цикорије у култури. Последње потпоглавље **Увода** бави се методама проучавања генске експресије, укључујући qRT-PCR и промоторске фузије са репортер генима. Описане су специфичности β-глукуронидазе (GUS) и зеленог и црвеног флуоресцентног протеина (GFP и DsRED), као репортер гена коришћених у овој студији. Детаљно је описано и посттранскрипционо утишавање гена преко РНК интерференце, са акцентом на предности коришћења *amiRNA* конструктора.

У **Циљу рада** су наведени циљеви истраживања докторске дисертације, а који се односе на проширење знања о биосинтези гвајанолида код цикорије. Почетни циљ дисертације био је трансформација цикорије уз помоћ *Agrobacterium rhizogenes*, успостављање културе трансформисаних коренова и добијање регенерисаних трансгених биљака. Један од циљева је био и испитивање ефеката експресије бактеријских онкогена и флоралне транзиције на акумулацију гвајанолида у регенерантима. У циљу испитивања функције промотора GAS и GAO гена, предвиђено је праћење експресије репортера у промоторским фузијама. У оквиру овог рада предвиђено је и испитивање улоге две варијанте GAS гена у биосинтези гвајанолида кроз њихово утишавање РНК интерференцом.

Поглавље **Материјал и методе** обухвата детаљан опис модел система и метода коришћених у експериментима. Описан је биљни материјал коришћен за успостављање асептичних култура, коришћени бактеријски сојеви, као и услови гајења биљака и бактерија. Наведене су стандардне и модификоване методе за изолацију нуклеинских киселина из биљака и бактерија, методе реверзне транскрипције и варијанте техника PCR амплификације коришћене у различите сврхе током експеримената. Дат је детаљан опис методе *Gateway* клонирања, којом су конструисани вектори за трансформацију биљака, као и протоколи за трансформацију бактерија, агроинфилтрацију салате и стабилну трансформацију цикорије. Наведени су начини детекције активности репортера, укључујући GUS хистохемијско бојење и флуоресцентну макро- и микроскопију. Описана је квантификација експресије qRT-PCR-ом, као и LC-MS метода квалитативне и квантитативне анализе гвајанолида и њихових деривата.

У поглављу **Резултати** приказани су експериментални резултати истраживања организовани у неколико тематских целина. У првом делу приказано је успостављање *in vitro* културе цикорије и тестирање успешности трансформације са два соја *A.rhizogenes*, A4M70GUS и MSU440, где је A4M70GUS дао задовољавајуће резултате. Добијени трансгени коренови су спонтано давали изданке, који су се ожиљавали и потом спонтано цветали у култури *in vitro*. Окарактерисани су и параметри растења и мултипликације добијених клонова. Затим је анализирана продукција гвајанолида у нетрансформисаним и трансформисаним културама коренова и регенераната у вегетативној и генеративној фази. Код трансформисаних биљака уочен је пораст садржаја гвајанолида при флоралној транзицији, што се поклапало са профилем експресије *RoIC* гена.

Други део **Резултата** бави се анализом промотора *GAS* и *GAO* гена цикорије и обухвата локализацију секвенци промотора у геному цикорије, њихову изолацију и клонирање у векторе за експресију у биљкама, затим проверу функционалности конструктора агроинфилтрацијом и на крају трансформацију цикорије конструисаним векторима. Изолован је један промотор за *GAS long*, два за *GAS short* и један промотор за *GAO*, који су фузионисани са GFP репортером. Сва четири промотора показала су се функционалним агроинфилтрацијом на зеленој салати. Трансформација цикорије овим конструкторима је била успешна, а трансформанте је било могуће идентификовати у раној фази на основу флуоресценције маркера за котрансформацију, DsRED-а, и/или PCR анализом. Флуоресцентна анализа активности промотора обухватила је више нивоа визуализације макро- и микроскопијом, коришћењем конструисаног LED система са филтерима, бинокуларне флуоресцентне лупе, флуоресцентног инвертног микроскопа и конфокалног микроскопа. На свим нивоима испитивања установљен је озбиљан проблем аутофлуоресценције биљног ткива, као и мешање флуоресцентних сигнала емисије DsRED и GFP репортера, што је онемогућило поуздану детекцију активности промотора фузионисаног за GFP. Ради превазилажења овог проблема, активност промотора је окарактерисана уз помоћ RT-PCR и qRT-PCR техника. Активност изолованих промотора је на овај начин потврђена у цикорији, а ниво њихове активности подударало се са резултатима добијеним при агроинфилтрацији, где су промотори за *GAS long* и *GAO* били јачи од оба промотора за *GAS short*. Установљено је и да *GAS long* није ткивно специфичан, док су *GAS short* промотори били активнији у корену него другим деловима биљака.

У трећем делу **Резултата**, приказана је конструкција *amiRNA* фрагмената за специфично утишавање *GAS long* и *GAS short* гена, њихова провера агроинфилтрацијом на салати и стабилна трансформација цикорије овим конструкторима. Направљена су по два конструкта

за утишавање сваког од гена и још два за утишавање оба гена истовремено. При трансформацији цикорије, конструкти су успешно интегрисани у геном цикорије, што је проверено PCR анализом и праћењем флуоресценције DsRED маркера за котрансформацију. Ефекат *amiRNA* конструката на утишавање *GAS* гена процењен је мерењем нивоа експресије тих гена и мерењем садржаја метаболита који су низводно у путу биосинтезе - неколико оксалата гвајанолида. Установљено је да је код већине добијених клонова дошло до утишавања ових гена, што је било видљиво и на нивоу експресије гена и на нивоу садржаја метаболита. Конкретно смањење ова два параметра је зависило од посматраног клона, гена и метаболита, а кретало се између 18 и 200 пута у односу на нетрансформисану контролу. Утишавање није било специфично према гену, па су сви тестирани конструкти утишавали оба гена истовремено. Корелацијом између експресије гена и садржаја једињења установљено је да су највероватније оба ова гена одговорна за биосинтезу гвајанолида у цикорији.

У поглављу **Дискусија** добијени резултати дискутовани су у светлу најновијих података из литературе. У првом делу овог поглавља дискутоване су могућности размножавања цикорије у условима *in vitro*, са посебним освртом на спонтану регенерацију изданака у култури коренова и касније спонтано цветање биљака у култури, до чега, према подацима из литературе, не долази увек. Потом је дискутована могућност трансформације цикорије различитим сојевима *A. rhizogenes*, ефикасност трансформације, као и фенотипске карактеристике добијених регенераната. У трећем делу **Дискусије** разматрана је котрансформација бинарним векторима, ефикасност трансфера Т-ДНК са тих вектора и значај ране детекције трансформаната уз помоћ DsRED флуоресценције. Добијене ефикасности котрансформације биле су сличне литературним подацима или више, а DsRED детекција се показала поузданом и осетљивом. Затим је дискутован утицај трансформације цикорије помоћу *A. rhizogenes* и развојног стадијума биљке на продукцију секундарних метаболита. У овом делу дат је посебан осврт на литературне податке о сезонским варијацијама садржаја сесквитерпенских лактона код цикорије и садржаја у трансформисаним кореновима цикорије. Подаци о садржају посматраних метаболита у трансгеним регенерантима цикорије су први пут приказани у овој тези. Корелација између експресије бактеријских гена у регенерантима и садржаја гвајанолида, дискутована је у контексту утицаја експресије појединачних *Rol* гена на различите секундарне метаболите биљака.

Пето поглавље **Дискусије** бави се проблематиком флуоресцентних репортер гена, аутофлуоресценцијом различитих биљних ткива, одабиром репортера и проблемима који се јављају услед мешања сигнала DsRED и GFP репортера. Према подацима из литературе, експресију ова два репортера у истом ткиву било је могуће детектовати само у врло специфичним експерименталним поставкама, при чему поједини аутори у потпуности занемарују могућност мешања сигнала, већ ове репортере користе као да су апсолутно компатибилни. У овој тези показано је да до мешања сигнала ова два репортера долази у тој мери да је немогуће раздвојити њихову флуоресценцију, осим можда методом деконволуције сигнала. Следећи део **Дискусије** се бави анализом промотора у контексту њихове варијабилне јачине и ткивне специфичности и поређењем са литературним подацима о експресији гена чији су промотори изоловани. Подаци о експресији *GAS* и *GAO* гена су врло оскудни и углавном ограничени на сродне биљне врсте, осим једне студије на цикорији. Разматран је и еволутивни значај постојања две форме *GAS* ензима у контексту диференцијалне експресије и два различита промотора *GAS short* гена, са освртом на могући механизам еволуције промотора. У последњем одељку дискутовано је утишавање *GAS* гена *amiRNA* конструкатима, уз могуће објашњење неспецифичног

утишавања два *GAS* гена преко ефекта транзитивности. Наведени су малобројни примери утишавања гена из биосинтезе терпена и истакнуто је да су резултати утишавања *GAS* гена добијени у овој тези први успешан покушај смањења нивоа сесквитерпенских лактона до сада.

У поглављу **Закључци** јасно су изнесени основни закључци, добијени на основу анализе резултата. Закључци јасно дефинишу процесе генетичке трансформације, регенерације цикорије и продукције гвајанолида у *in vitro* условима. Закључено је да је DsRED користан као маркер за котрансформацију, али и да је његово присуство у ткиву онемогућило флуоресцентну детекцију GFP маркера, са којим је инкомпатибилан. Закључено је да су сви изоловани промотори активни и у салати и у цикорији, као и да је промотор *GAS short* гена најактивнији у корену цикорије. Утишавање *GAS long* и *GAS short* гена је успешно обављено, али није било специфично према гену. На основу овог резултата је изведен закључак да су ова два гена вероватно заједно одговорна за биосинтезу гвајанолида.

У поглављу **Литература** дат је списак од 236 цитираних библиографских јединица које су употребљене приликом израде и писања докторске дисертације. Коришћени су адекватни литературни наводи, што говори о студиозном приступу аутора анализи резултата ове докторске дисертације.

У поглављу **Прилози** приложени су додатни резултати истраживања, као што су обимнији подаци о флуоресценцији добијених трансгених клонова и експресији GFP гена у биљкама, из којих су извучени одређени закључци у дисертацији, али који су били преобимни да би се нашли у поглављу **Резултати**. Иза поглавља **Прилози** налазе се поглавља **Листа скраћеница са речником** и **Биографија аутора**, у коме је изложена кратка и садржајна биографија аутора докторске дисертације.

#### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

##### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

1. **Bogdanović M. D.**, Todorović S. I., Banjanac T., Dragičević M. B., Verstappen F. W. A., Bouwmeester H. J., Simonović A. D. (2014): Production of guaianolides in *Agrobacterium rhizogenes* - transformed chicory regenerants flowering in vitro. *Industrial Crops and Products* 60: 52-59 **M21**

##### **Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

1. **Bogdanović M.**, Todorović S., Banjanac T., Dragičević M., Verstappen F., Bouwmeester H., Simonović A. (2013). Sesquiterpene lactone production in transformed chicory. XX symposium of the Serbian Plant Physiology Society, 4-7. June 2013, Subotica, Book of Abstracts, p. 93. **M34**
2. **Bogdanović M.**, Todorović S., Dragičević M., Cankar K., Beekwilder J., Bouwmeester H., Simonović A. (2013). Vector construction for promoter analyses in chicory and fluorescence evaluation by agroinfiltration. XX symposium of the Serbian Plant Physiology Society, 4-7. June 2013, Subotica, Book of Abstracts, p. 60. **M34**

##### **Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја**

1. Todorović S., Banjanac T., **Bogdanović M.**, Dragičević M., Simonović A., Giba Z., **M64**



Grubišić D. (2011). *In vitro* culture establishment and biomass production of *Cichorium intybus* L. hairy roots. 19<sup>th</sup> symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Banja Vrujci, Serbia, Book of abstracts, p. 79

### Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију Милице Богдановић, чији смо приказ дали у извештају, као и на основу приложене библиографије, сматрамо да је теза написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме, да је у њој коришћена адекватна и савремена експериментална методологија и да садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Докторска дисертација Милице Богдановић представља оригиналан научни допринос у оквиру истраживања биолошких основа биосинтезе сесквитерпенских лактона гвајанолидног типа. У оквиру ове дисертације, по први пут је окарактерисана продукција гвајанолида у трансформисаним регенерантима цикорије, јачина и активност промотора *GAS* и *GAO* гена, а утишавањем *GAS* гена добијен смањен садржај гвајанолида. Од посебног значаја су методе *Gateway* клонирања, агроинфилтрације и утишавања гена, које је кандидат Милица Богдановић савладала у Лабораторији за физиологију биљака Универзитета у *Wageningen*-у, а које ће од сада бити применљиве и у матичној лабораторији, на Одељењу за физиологију биљака ИБИСС-а.

Имајући у виду значај, научну вредност и обим резултата, начин на који су резултати изложени и интерпретирани, као и високу самосталност и студиозност самог кандидата, Комисија са великим задовољством предлаже Научно-наставном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидату Милице Богдановић јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и -оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена**“

### КОМИСИЈА:

---

др Ана Симоновић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду

---

др Ангелина Суботић, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду

---

др Тијана Цветић Антић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду

У Београду, 9. 12. 2014. године.