

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 10.06.2016. године, прихваћен је извештај ментора **др Богдана Николића** и **др Тијане Цветић Антић** о урађеној докторској дисертацији **Hadi K. Waisija**, истраживача сарадника Института за водопривреду „Јарослав Черни“, под насловом „**Утицај брасиностероида 24-епибрасинолида на клијање и ране фазе растења и развића различитих хибрида кукуруза (*Zea mays L.*)**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

др Богдан Николић, научни сарадник Института за заштиту биља и животну средину у Београду;

др Тијана Цветић Антић, доцент, Универзитет у Београду -Биолошки факултет;

др Златко Гиба, ванредни професор, Универзитет у Београду -Биолошки факултет;

др Јелена Трифковић, доцент, Универзитет у Београду -Хемијски факултет;

др Бојан Јанковић, научни сарадник, Универзитет у Београду –Факултет за физичку хемију.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Hadi K. Waisija** под насловом „**Утицај брасиностероида 24-епибрасинолида на клијање и ране фазе растења и развића различитих хибрида кукуруза (*Zea mays L.*)**“ је урађена у Институту за водопривреду „Јарослав Черни“, Институту за заштиту биља и животну средину, катедри за динамику и структуру материје Факултета за физичку хемију, лабораторији за ЕПР спектроскопију Факултета за физичку хемију у Београду, Институту за ботанику и ботаничкој башти „Јевремовац“ и лабораторији за анализу хране и хеометрију Хемијског факултета у Београду, у оквиру пројеката биотехнолошког истраживања „Разрада интегрисаног управљања и примене савремених принципа сузбијања штетних организама у заштити биља“ ТР 31018 и технолошког истраживања ТР 31080 „Биодиверзитет као потенцијал у екоремедијационим технологијама оштећених екосистема“.

Дисертација је написана на 197 страна и садржи: 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** (42 стр.), **Циљеве рада** (1 стр.), **Материјал и методе** (21 стр.), **Резултате и Дискусију** (100 стр.), **Закључке** (3 стр.), **Литературу** (27 стр. са 264 референце), и прилоге (Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу) на укупно 4 стране. Дисертација садржи збирно 52 слике и графика (нису посебно означене у тексту), од којих 17 слика и 35 графика, као и 21 табелу.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **Увод** детаљно су приказана најсавременија сазнања непосредно везана за предмет истраживања докторске дисертације. Најпре је дата класификација врсте *Zea mays* (L.), као и преглед специфичности у физиологији развића ове врсте. Описан је хабитус и велики морфолошки варијабилитет овог економски веома значајног представника фамилије *Poaceae*, након чега је анализирано порекло и основни типови гајеног кукуруза по продуктивно технолошким карактеристикама, које се умногоме ослањају на специфичности физиологије и морфологије појединих генотипских класа гајеног кукуруза. Наглашен је хемијски састав (претежно скроб, уз присуство протеина, уља и других материја) два хибрида кукуруза (ZP 434, ZP 704), који су предмет ове тезе. Дат је и преглед физиолошких карактеристика клијања семена кукуруза, са нагласком на значај хемијског састава тог семена, као и утицај различитих фотохормона на процес клијања, где се истиче интеракција гиберелина, брасиностероида (BRs) и абсцисинске киселине. Потом је дат опис брасиностероидних фитохормона, који је започет историјским прегледом истраживања, од открића специфичних реакција биљака на екстракте полена још 1940-тих, преко изоловања активног принципа (карактеристичног за поменуте развојне реакције) и његове потпуне хемијске карактеризације 1970-тих, затим карактеризације физиолошких ефеката и специфичног биотеста за BRs 1980-тих, уз потврду дејства истих преко проналажења мутаната специфичних за њихову синтезу 1990-тих и даљих појашњења механизма дејства BRs методама молекуларне биологије 2000-тих. Дат је кратак опис распрострањености BRs у биљном свету, да би се прешло на детаљан опис путева њихове синтезе, метаболизма и механизма дејства, са нагласком на њиховој хемијској сличности са анималним стероидима, и специфичности механизма њиховог дејства плазмалемским рецептором за BRs и каскадним сигналним путевима, умногоме различитим од сигналних путева анималних стероидних хормона. Затим је дат детаљан опис физиолошких ефеката BRs, са описом биотестова, мутаната и инхибитора дејства, па детаљним описом улоге BRs у деоби и експанзији ћелија биљака, потом краћим описом њиховог утицаја на процесе диференцијације биљних ткива (нпр. ксилогенеза). Разматрана је улога BRs у образовању и физиологији семена и клијања, као и у регулацији фотосинтезе, метаболизма шећера, минералне исхране и токсичности, затим секундарног метаболизма, и модулације реакције биљака на стресне услове животне средине. Такође је дат опис примене кинетичких и термодинамичких мерења и прорачуна ради описа процеса дехидратације у биљним системима, са посебним нагласком на тзв. стакласте прелазе, карактеристичну појаву за физиологију семена.

У поглављу **Циљеви рада** су истакнути најважнији задаци које је кандидат поставио са циљем:

- Утврђивања степена утицаја егзогено додатог 24-епибрасинолида (24-ЕБЛ) на клијање семена, промене у растењу и биомаси клијанаца два хибрида (ZP 434, ZP 704) кукуруза током периода од седам (7) дана;
- Утврђивања утицаја егзогено додатог 24-EBL на промену садржаја фенолних једињења, шећера, минералних елемената и фотосинтетских пигмената у клијанцима поменутих хибрида кукуруза;

- Испитивања одговора делова клијанаца (плумула, радикула, остатак семена) предметних хибрида кукуруза у присуству егзогено додатог 24-EBL на стрес изазван повишеном температуром и пратећом дехидратацијом, применом различитих кинетичких и термодинамичких метода;
- Одређивања оптималне концентрације егзогено додатог 24-EBL, која би могла имати заштитну улогу у раним фазама развића клијанаца поменутих хибрида кукуруза.

У поглављу **Материјал и методе** приказане су особине испитиваних хибрида, коришћене хемикалије и услови гајења клијанаца кукуруза. Описане су процедуре за одређивање клијавости семена, морфометријских параметара, анализу фотосинтетичких пигмената и Вигор индекса II (SVI-II). Детаљно су описане методе екстракције, квантитативног и квалитативног одређивања садржаја шећера у клијанцима јонском хроматографијом, екстракција и одређивање количине минералних елемената оптичком емисионом спектрометријом са спрегнутом плазмом (ICP/OES) у свим деловима клијанаца. Описана је оптимизована метода за екстракцију полифенола из клијанаца кукуруза, као и методе за анализу и идентификацију фенолних једињења танкослојном хроматографијом и ултраефикасном течном хроматографијом са масеним детектором високе резолуције (UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS). Описан је поступак детекције реактивних кисеоничних и азотних врста електронском парамагнетном резонанцом у присуству спинског трапа. Сви протоколи су дати детаљно и прецизно, што омогућава потпуну и репродуцибилност резултата. Детаљно је описан и образложен кинетички и термодинамички приступ испитивања механизма дехидратације клијанаца кукуруза. Добијени резултати су подвргнути анализи варијансе (One-way и Two-way ANOVA тестови). Статистичка анализа је урађена применом софтверских програма STATISTICA v.7 (StatSoft, Inc.) и IBM SPSS Statistics v.20 (SPSS, Inc.).

У оквиру поглавља **Резултати и дискусија** приказани су, дискутовани и међусобно повезивани добијени резултати, у складу са постављеним циљевима докторске дисертације. Нађено је да додаток егзогеног 24-EBL различито утиче на клијавост семена испитиваних хибрида кукуруза (ZP 434 и ZP 704). Највећи утицај 24-EBL на клијање семена оба хибрида кукуруза запажен је при највишој примењеној концентрацији тог фитохормона (5.2×10^{-7} M), која је довела до инхибиције клијања од 14% код хибрида ZP 434 и 28% код хибрида ZP 704. Показано је да су клијанци хибрида ZP 434 осетљивији на дејство егзогеног 24-EBL у односу на клијанце хибрида ZP 704, зато што семена хибрида ZP 434 имају високу клијавост при дејству свих испитиваних концентрација 24-EBL, док хибрид ZP 704 има тако високу клијавост једино при најнижој испитиваној концентрацији (5.2×10^{-15} M) 24-EBL. Утврђено је да ниже концентрације егзогено додатог 24-EBL имају позитиван ефекат на издуживање плумуле код клијанаца хибрида ZP 434. Третман 24-EBL делује негативно на прераспodelу свеже масе у плумули хибрида ZP 704, док се запажа извесно увећање укупне свеже масе код клијанаца хибрида ZP 434 третираних 5.2×10^{-11} M 24-EBL. Третман различитим концентрацијама 24-EBL нема битног утицаја на свежу масу коренова клијанаца хибрида ZP 704, све до највише примењене концентрације 24-EBL (5.2×10^{-7} M), када се запажа инхибиторно дејство. Клијанци хибрида ZP 434 имају веће вредности SVI-II, при нижим примењеним концентрацијама 24-EBL у поређењу са

контролним узорцима, док клијанци хибрида ZP 704 имају ниже вредности SVI-II при свим примењеним концентрацијама егзогеног 24-EBL у поређењу са контролним узорцима, што додатно потврђује ранији налаз о различитој осетљивости семена и клијанаца испитиваних хибрида кукуруза према егзогено додатом 24-EBL. У тези се на основу ових резултата дискутује да ће клијанци хибрида ZP 434, третирани нижим концентрацијама 24-EBL (од 5.2×10^{-15} до 5.2×10^{-12} M) имати веће шансе за преживљавање и повећану толеранцију на различите негативне срединске факторе током раних фаза вегетативног развоја.

Ниске вредности односа хлорофила *a* и хлорофила *b* (Chl *a/b*) у плумулама оба испитивана хибрида кукуруза сведоче о слабој развијености и активности фотосинтетског апарата, што је очекивано за овако ране фазе развића.

На основу анализе садржаја шећера запажа се да је садржај глукозе и фруктозе у плумули и радикули хибрида ZP 434 генерално низак, осим при третману највишом концентрацијом 24-EBL (5.2×10^{-7} M). Плумула и радикула клијанаца хибрида ZP 704 садрже значајно већу количину глукозе и фруктозе. Садржај сахарозе у плумулама и радикулама оба хибрида углавном расте са повећањем концентрације примењеног 24-EBL, док је у остатку семена садржај сахарозе низак. При третману 24-EBL, садржај арабинозе опада у свим органима клијанаца хибрида ZP 434, док са порастом концентрације примењеног 24-EBL значајно расте садржај овог шећера у плумулама клијанаца хибрида ZP 704. Садржај сорбитола у остатку семена и плумулама клијанаца хибрида ZP 434 варира са тенденцијом пораста, све до примењене концентрације 24-EBL од 5.2×10^{-11} M, док при вишим концентрацијама опада. Ове промене се не дешавају код клијанаца хибрида ZP 704, при чему запажамо да је највећи садржај овог шећерног алкохола у радикулама оба хибрида третираних највишом концентрацијом 24-EBL (5.2×10^{-7} M). Садржај трехалозе је знатно нижи код клијанаца хибрида ZP 434 у односу на клијанце хибрида ZP 704, при чему постоје и разлике између ова два хибрида и у расподели овог дисахарида у органима клијанаца, као и у промени садржаја трехалозе под дејством различитих концентрација 24-EBL. Садржај рафинозе у органима клијанаца оба хибрида опада код клијанаца третираних најнижом концентрацијом 24-EBL (у односу на контролу), док при примени виших концентрација овог фитохормона, почев од 5.2×10^{-12} M садржај рафинозе расте, посебно изражено у плумулама. Испитан је и утицај различитих концентрација 24-EBL на садржај галактитола, рибозе, изомалтозе, изомалтотриозе, малтозе, малтотриозе, ксилозе, мелибиозе, панозе, манозе и рамнозе у органима клијанаца.

На основу анализе садржаја есенцијалних, несенцијалних и токсичних минералних елемената у органима оба испитивана хибрида кукуруза, закључено је да 24-EBL, посебно када је присутан у ниским концентрацијама (испод 5.2×10^{-12} M) делује протективно, јер спречава нагомилавање потенцијално токсичних (Mn, Zn, Cu, Fe) и токсичних (Cr, Ni, Cd) метала у плумули и радикули клијанаца. Сличан тренд је запажен и у случају извесне ексклузије за биљку токсичног Na из плумуле и радикуле клијанаца оба хибрида, под дејством 24-EBL примењеног у ниским концентрацијама. Запажено је и да 24-EBL не смета акумулацији магнезијума и молибдена у плумулама и радикулама клијанаца оба испитивана хибрида кукуруза. На основу свега изнетог претпостављено је да би клијанци

третирани 24-EVL могли да живе на земљишту загађеном тешким металима, што би их чинило погодним за рекултивацију, али не и фиторемедијацију таквих терена.

Утврђено је постојање великог броја поларнијих фенолних једињења и мањег броја неполарнијих флавоноида који су заступљенији у хибриду ZP 434 у односу на хибрид ZP 704. Такође је нађено да високе концентрације 24-EVL имају ефекат на смањење садржаја полифенола у клијанцима испитиваних хибрида кукуруза. Методом масене спектрометрије високе резолуције идентификована су полифенолна једињења различитих класа у испитиваним узорцима и нађено је да 24-EVL различито делује на њихову акумулацију код испитиваних хибрида кукуруза. У хибриду ZP 434 идентификован је већи број полифенолних једињења у односу на хибрид ZP 704. Код оба испитивана хибрида садржај полифенола је већи у плумули него у радикули.

Нађено је да различите концентрације 24-EVL имају различити утицај на садржај реактивних кисеоничних и азотних врста у клијанцима испитиваних хибрида кукуруза. Тако у клијанцима хибрида ZP 434 запажамо да ниже концентрације примењеног 24-EVL повећавају укупну количину реактивних кисеоничних и азотних врста, док је при вишим концентрацијама 24-EVL, њихова количина смањена у односу на контролу. Запажено је да је најмање тих реактивних врста детектовано у контролним узорцима, а веома мало при третману 24-EVL од 5.2×10^{-13} M.

На основу изоконверзионог приступа примењеног на клијанцима испитиваних хибрида кукуруза претпостављено је да привидна енергија активације вероватно зависи од интеракције молекула воде са протеинским структурама ових клијанаца, нарочито у раним фазама дехидратационог процеса. Такође је нађено да 24-EVL у свим испитиваним концентрацијама има значајан утицај на промену изоконверзионог реакционог профила код плумуле и радикуле хибрида ZP 434, али и на исте профиле плумула клијанаца ZP 704, при концентрацијама 24-EVL од 5.2×10^{-9} и 5.2×10^{-12} M.

Нађено је код радикуле ZP 434 хибрида да је вредност привидне енергије активације директно пропорционална садржају трехалозе, који расте при нижим концентрацијама 24-EVL. Код контролних клијанаца оба хибрида нађено је да се дехидратација одвија по механизму првог реда, који се може приписати губитку првог воденог слоја од међуслојева који чине систем. Такође је утврђено да пораст температуре смањује дифузиони ефекат, највероватније услед пораста равнотежног садржаја молекула воде који се ослобађају из делова клијанаца, где улога протеина и њихове околине може утицати на брзину дехидратације. Установљено је да код клијанаца ZP 434, 24-EVL највероватније утиче на дехидратационе процесе преко високог садржаја фосфора у деловима клијанаца. Претпостављено је да егзогено примењени 24-EVL утиче на осетљивост плумуле клијанаца на дехидратациони стрес путем интеракције воде са примарним аминок групама полиамина. 24-EVL ниских концентрација највероватније омогућава интеракцију полиамина и воде водоничним везама. На то указује чињеница да добијене вредности енергије активације код клијанаца оба хибрида одговарају енергијама дисоцијације водоничне везе.

На основу анализе са кинетичким предвиђањем процеса, показано је да екстремно високе температуре снабдевају систем клијанаца ZP 704 довољном количином енергије, чиме се повећава мобилност воде, а тиме и брзина дехидратације, што води скраћењу живота тих клијанаца. Термодинамичком анализом клијанаца оба испитивана хибрида

кукуруза третирана различитим концентрацијама 24-EBL нађено је да сви делови клијанаца ZP 704, у поређењу са клијанцима ZP 434, показују већу стабилност (у енергетском погледу) током процеса дехидратације. На основу енталпијско-ентропијске компензационе теорије, нађено је да је механизам десорпције воде у клијанцима испитиваних хибрида кукуруза ентропијски контролисан. Добијени резултати указују и да микроструктура клијанаца није стабилна и да трпи промене током процеса. Такође, на основу ВЕТ и модификованог ВЕТ приступа, нађено је да клијанци ZP 704 у присуству 24-EBL лакше одају воду за разлику од клијанаца ZP 434, код кога 24-EBL узрокује отежано одавање воде. Пораст температуре код клијанаца ZP 704 доводи до снижавања притиска ширења и бржег одавања воде из радикуле, што није случај код клијанаца ZP 434.

У поглављу **Закључци** изведени су концизни закључци на основу резултата добијених у докторској дисертацији. Нађено је да постоји различита осетљивост клијанаца испитиваних хибрида кукуруза према егзогено додатом 24-EBL и да постоји концентрациона зависност. Нађено је и да плумула и радикула оба хибрида различито реагују на егзогено додат 24-EBL. Такође је нађено да 24-EBL утиче на фотосинтетске пигменте тј. на однос хлорофила *a* и хлорофила *b*, у суштини не мења хетеротрофну природу клијанаца поменутих хибрида кукуруза. Нађено је и да се мења прерасподела различитих шећера у деловима клијанаца оба хибрида кукуруза и да те промене зависе од концентрације егзогено додатог 24-EBL, али и од хибрида. Такође је нађено да 24-EBL ограничава транспорт потенцијално токсичних и токсичних метала ка плумули и радикули. Нађено је да 24-EBL утиче на прерасподелу како поларних, тако и укупних фенолних једињења између различитих делова клијанаца, као и на квалитативни и квантитативни састав оба хибрида кукуруза. Такође је нађено да 24-EBL утиче на продукцију реактивних кисеоничних и азотних врста и да тај утицај зависи и од хибрида кукуруза. Нађено је и да 24-EBL утиче на промене кинетичких и термодинамичких параметара током процеса дехидратације делова клијанаца оба испитивана хибрида кукуруза, при чему те промене зависе, како од концентрације 24-EBL, тако и од органа клијанца и хибрида. Нађено је да те промене кинетичких и термодинамичких параметара током процеса дехидратације зависе од статуса протеинских комплекса у клијанцу, од садржаја шећера трехалозе, као и од садржаја фосфора у клијанцима, при чему су те промене специфичне за различите органе и хибриде тих клијанаца.

У поглављу **Литература** наведено је 264 библиографске јединице, 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 велики део литературе о биљним хормонима коришћене током израде ове докторске дисертације публиковано након 2010. године.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Waisi H., Kosović A., Krstić Đ., Milojković-Opsenica D., Nikolić B., Dragičević V., Trifković J. (2015): Polyphenolic profile of maize seedlings treated with 24-epibrassinolide, *Journal of Chemistry*, Vol. 2015, Article ID 976971, ISSN 0973-4945, Publisher: Hindawi Publishing Corporation, 10 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/976971> **M23**
2. Waisi H., Nikolić B., Petković A., Janković B., Lalević B., Raičević V., Giba Z. (2016): Influence of 24-epibrassinolide on seedling growth and distribution of mineral elements in two maize hybrids. *Chemical industry (OnLine-First)* (DOI:10.2298/HEMIND160318030W), **M23**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Waisi H., Nikolić B., Lalević B., Raičević V., Dragičević V., Milojković M., Ormai M. (2016): Influence of 24-epibrassinolide on seedlings of two maize hybrids. *5th international symposium on agricultural sciences AgroRes 2016*, February 29 – March 3, 2016, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina, *Book of abstracts*, pp. 164. **M34**
2. Waisi H., Nikolić B., Lalević B., Raičević V., Đukanović L., Milojković M., Kovačević D. (2016): The effect of 24-epibrassinolide on seed vigour of two maize hybrids. *5th international symposium on agricultural sciences, AgroRes 2016*, February 29 – March 3, 2016, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina, *Book of abstracts* pp. 163. **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Waisi H., Dragičević V., Nikolić B., Đukanović L., Živanović M., Jovanović V., Đurović S. (2013): Preliminary observation of the effect of different concentration of 24-epibrassinolide on germination of seeds of two maize hybrids. *20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society*, 4.-7. june 2013, Subotica, Serbia, *Book of abstracts* pp. 33 **M64**

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација дипл. биолога Нади Вaisија „Утицај брасиностероида 24-епибрасинолида на клијање и ране фазе растења и развића различитих хибрида кукуруза (*Zea mays* L.)“ је оригиналан и значајан допринос разумевању процеса клијања и раних фаза развића клијанаца кукуруза, са посебним освртом на утицај егзогено додатог фитохормона 24-EBL. У овом раду је наглашен и значај физиолошких, биохемијских и енергетских промена индукованих 24-EBL које утичу на отпорност клијанаца кукуруза на неповољне услове животне средине. С обзиром на то да је оптимално одвијање првих фаза развића кукуруза од пресудне важности за остварење доброг приноса кукуруза, као најважније ратарске биљне културе у свету и код нас, очигледан је апликативни значај проучавања утицаја егзогено додатог 24-EBL на клијање семена и прве вегетативне развојне фазе клијанаца кукуруза. Резултати ове дисертације су одлична основа за даље

истраживање различитих механизма (молекуларних и физиолошких) током клијања семена житних трава и првих вегетативних развојних фаза клијанаца кукуруза и сродних врста житних трава.

Комисија констатује да су постављени циљеви ове тезе у потпуности реализовани савременим методама, а резултати јасно представљени и адекватно илустровани. Кандидат је током израде докторске дисертације развио изузетну способност планирања експеримената, анализе добијених резултата и њиховог тумачења у складу са актуелном светском научном литературом. Из докторске тезе су до сада публикована 2 рада у међународном часопису на којима је кандидат први аутор, 2 саопштења на скуповима међународног значаја и 1 саопштење на скупу националног значаја.

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 кандидата Hadi K. Waisija, под насловом „**Утицај брасиностероида 24-епибрасинолида на клијање и ране фазе растења и развића различитих хибрида кукуруза (*Zea mays* L.)**“.

КОМИСИЈА:

ментор др Богдан Николић, научни сарадник,
Институт за заштиту биља и животну средину

ментор др Тијана Цветић Антић, доцент,
Биолошки факултет Универзитета у Београду

др Златко Гиба, ванредни професор,
Биолошки факултет Универзитета у Београду

др Јелена Трифковић, доцент,
Хемијски факултет Универзитета у Београду

др Бојан Јанковић, научни сарадник,
Факултет за физичку хемију Универзитета у Београду

У Београду, 14.07.2016. године.