

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 о урађеној докторској дисертацији **Милорада М. Вујичића**, асистента на Биолошком факултету Универзитета у Београду, под насловом „**Биохемијски и екофизиолошки одговори одабраних врста маховина на контролисани стрес изазван солима у аксеничним условима**“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

Др **Анета Сабовљевић**, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет – ментор,

Др **Марко Сабовљевић**, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет – ментор,

Др **Данијела Мишић**, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић” – члан

Др **Снежана Милошевић**, научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић” - члан

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Милорада Вујичића** под насловом „**Биохемијски и екофизиолошки одговори одабраних врста маховина на контролисани стрес изазван солима у аксеничним условима**“ је урађена у Институту за ботанику и ботаничкој башти Јевремовац, Биолошког факултета Универзитета у Београду, у оквиру пројекта основних истраживања „Физиолошка, хемијска и молекуларна анализа диверзитета одабраних, ретких и угрожених биљних врста у циљу *ex situ* заштите и продукције биолошки активних једињења” (бр. 173024, 2011-2016) Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Дисертација је написана на 204 стране и садржи: 19 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** (55 стр.), **Циљеве рада** (1 стр.), **Материјал и методе** (17 стр.), **Резултате** (78 стр.), **Дискусију** (16 стр.), **Закључке** (3 стр.), **Литературу** (23 стр. са 372 референци), 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 37 слика, 23 табеле и 41 график.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **Увод** детаљно су приказана најновија сазнања непосредно везана за предмет истраживања докторске дисертације. Детаљно се наводе досадашња сазнања из

екофизиологије и физиологије стреса код бриофита и дата је компарација у физиолошком и биохемијском одговору на стрес изазван солима код бриофита и васкуларних биљака. Истакнута је улога апсцисинске киселине, као хормона стреса, у одбрани у водном дефициту и стресу изазваном солима код бриофита. Затим је дат детаљан приказ о оксидативном стресу који се јавља као секундарни тип стреса и као последица стреса изазваног солима. 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 и направљена је паралела између антиоксидативних система код бриофита и васкуларних биљака. На крају овог поглавља дат је опис објеката истраживања, *Physcomitrella patens*, *Entosthodon hungaricus* и *Henediella heimii*. Истакнута је биологија испитиваних врста, укључујући распрострањење и животни циклус све три врсте. Такође је дат приказ досадашњих сазнања о физиологији испитиваних врста, обзиром да је једино *P. patens*, као модел организам у физиологији и молекуларној биологији бриофита, довољно истражена.

У поглављу **Циљеви рада** су истакнути најважнији задаци које је кандидат поставио у испитивању физиолошких, биохемијских и еколошких одговора три врсте маховина на стрес изазван солима. Први циљ истраживања је био испитивање утицаја апсцисинске киселине (АБА) у морфогенези одабраних врста маховина. Такође је праћен и утицај АБА као сигналног молекула и значај предтретмана овим хормоном на повећање отпорности на стрес изазван солима. Следећи циљ односио се на успостављање *in vitro* система за пропацију ретких и / или угрожених врста маховина *E. hungaricus* и *H. heimii*. Обзиром даје улога две есенцијалне групе биљних хормона (ауксина и цитокинина) веома важна у морфогенези биљака, испитивана је улога индол-3-бутерне киселине (ИБА) и 6-бензиламинопурина (БАП) у процесу морфогенезе наведене две врсте маховина. С обзиром на значајну разлику у биологији три испитиване врсте маховина, следећи циљ истраживања у оквиру ове дисертације је био испитивање и поређење механизма који су одговорни за преживљавање и толеранцију на краткотрајни и дуготрајни стрес изазван солима код *P. patens*, *E. hungaricus* и *H. heimii*.

У поглављу **Материјал и методе** описане су процедуре за успостављање *in vitro* система за пропацију две врсте маховина (*E. hungaricus* и *H. heimii*), процедуре за спектрофотометријску анализу фотосинтетичких пигмената и пролина, као и за квантитативну анализу фенола и одређивање антиоксидативног капацитета биљака. Осим тога, дат је протокол за изолацију и квантификацију фотосинтетичких пигмената и токоферола путем течне хроматографије под високим притиском. Такође, приказана је и детаљна процедура за изолацију укупних солубилних протеина, као и за анализу изоформи ензима антиоксидативног система нативном електрофорезом и спектрофотометријским одређивањем њихове активности. На крају поглавља су наведене методе које се односе на анализу фенолних једињења помоћу течне хроматографије под ултра високим притиском са МС/МС масеном спектрофотометријом, као и метода за анализу садржаја шећера методом течне хроматографије под високим притиском са пулсном амперометријском детекцијом. Сви протоколи су детаљно приказани, што омогућава потпуну репродуцибилност експеримената. Статистичка значајност анализираних фактора је тестирана анализом варијансе, а средње вредности су упоређене *LSD post-hoc* тестом.

У оквиру поглавља **Резултати** приказани су добијени резултати, у складу са постављеним циљевима докторске дисертације. Успостављене су *in vitro* културе врста *E. hungaricus* и *H. heimii*. Као почетни материјал за успостављање аксеничних култура

коришћени су спорофити и/или гаметофити и показано је да је значајно боља успешност стерилизације и преживљавања када је коришћен спорофит. Показано је да биљни хормони имају битну улогу у морфогенези ове две врсте маховина. Код врсте *E. hungaricus* на развиће протонеме позитиван утицај имају ауксини (ИБА), па је протонема била највећег дијаметра у случају када су у хранљивој подлози били додати само ауксини. Сличан тренд развића секундарне протонеме забележен је и код врсте *H. heimii*, иако су у овом случају најбоље развијену протонему имале биљке које су расле на подлози са умереним концентрацијама ИБА ($1\mu\text{M}$) и ниским до умереним концентрацијама БАП ($0.03\mu\text{M}$ и $1\mu\text{M}$). Највеће вредности индекса мултипликације (преко 60 новоформираних пупољака по почетом експлантату) код врсте *E. hungaricus* су забележене у случају биљака раслих на ниским концентрацијама ИБА ($0.1\mu\text{M}$ и $0.3\mu\text{M}$) или на комбинацији ниских концентрација ИБА ($0.1\mu\text{M}$) и БАП ($0.03\mu\text{M}$). Код врсте *H. heimii* је тренд другачији, па је највећа вредност индекса мултипликације забележена на високим концентрацијама ИБА ($10\mu\text{M}$) и умереним концентрацијама БАП ($0.3\mu\text{M}$).

Показано је да АБА има позитиван ефекат на мултипликацију изданака и повећање биомасе код *P. patens* када је примењена у ниским концентрацијама ($0.03\mu\text{M}$). Примена овог хормона у високим концентрацијама ($3\text{--}15\mu\text{M}$) имала је негативан ефекат на све тестиране параметре: индекс мултипликације, биомасу и количину фотосинтетичких пигмената код врсте *P. patens*.

У дисертацији је демонстриран висок ниво преживљавања све три испитиване врсте у случајевима када су биљке биле изложене краткотрајном или дуготрајном стресу изазваном солима. Показано је да индекс мултипликације значајно опада код свих врста у случају када су биљке биле изложене високим концентрацијама соли ($100\text{--}500\text{mM NaCl}$). Сличан тренд је забележен и када се прати развиће секундарне протонеме. Високе концентрације соли доводе до смањене количине фотосинтетичких пигмената (хлорофили и каротеноиди). Код све три врсте су неоксантин и лутеин доминантни типови ксантофила. Биљке изложене дуготрајном стресу су имале знатно нижу количину фотосинтетичких пигмената у односу на биљке изложене краткотрајном стресу солима. Токоферол, као значајан антиоксиданс у биљним системима, се акумулирао у навећој количини код врсте *H. heimii* у случају краткотрајног и дуготрајног стреса солима. Показано је да се највећа количина фенола синтетише код врсте *P. patens* без обзира да ли су биљке излагане краткотрајном или дуготрајном стресу. Ова врста продукује и до десет пута већу количину укупних фенола од остале две врсте маховина, које су факултативно халофитне врсте. Ензими оксидативне заштите показују различиту активност у зависности од врсте и дужине стреса којем су биљке изложене. Највећа активност ензима пероксидаза је забележена код врсте *P. patens*. Код факултативно халофитних врста, *E. hungaricus* и *H. heimii*, веома важну улогу има ензим супероксид дисмутаза, чија активност расте са порастом интензитета стреса. Код све три врсте активност ензима каталаза расте са порастом интензитета стреса, осим у случају када су биљке изложене највишим концентрацијама соли.

Резултати ове дисертације указују на значајну разлику у механизмима адаптације испитиваних врста на стрес изазван солима. Факултативно халофитне врсте у одбрани од стреса солима примарно и у највећој мери активирају ензиме антиоксидативне заштите, док је за врсту *P. patens* карактеристично да синтетише велике количине фенола, те се одбрана од стреса пре свега базира на неензимским компонентама.

У поглављу **Дискусија** добијени резултати су детаљно објашњени и упоређени са досадашњим сазнањима из ове области физиологије биљака. Најпре је истакнут значај успостављених аксеничних култура две факултативно халофитне врсте *E. hungaricus* и *H. heimii*, обзиром на специфичности објеката и тешкоће у стерилизацији биљног материјала. Упоређен је пут морфогенезе и утицај хормона, ИБА и БАП, код две наведене врсте маховина са истим процесима код других врста маховина код којих су рађена слична истраживања. Констатовано је да су успостављени успешни протоколи за стерилизацију биљног материјала ове две врсте и да су оптимизвани услови за продукцију довољне количине биљака које могу бити коришћене у одговарајућим истраживањима.

У даљем тексту Дискусије коментарисани су резултати који се односе на утицај стреса изазваног солима на преживљавање и биохемијске и физиолошке параметре код три врсте маховина, укључујући две факултативно халофитне врсте и модел врсту *P. patens*. Констатовано је да у условима стреса солима ниског интензитета, биљке нормално обављају своје физиолошке и биохемијске процесе. Такође је дато поређење са сличним истраживањима код других врста маховина и показано је да све три испитиване маховине у овом истраживању реагују очекивано, у складу са биологијом врсте и адаптацијама које су развиле. Степен преживљавања је био висок код свих врста, као и садржај фотосинтетичких пигмената, што није карактеристика код већине васкуларних биљака. Истакнуто је да постепено излагање стресу, као и предтретман хормоном АБА могу довести до повећане отпорности испитиваних врста на стрес изазван солима.

Према подацима из литературе, повећана синтеза фенола, који имају антиоксидативну функцију, се дешава у случају слабог до умереног салинитета у подлози. Овакав тренд је забележен и код модел организма *P. patens*, док је код друге две испитиване врсте врсте *E. hungaricus* и *H. heimii*, количина синтетисаних фенола била мања у поређењу са модел врстом. Код све три врсте је доминантно једињење из групе фенола била п-кумарна киселина, која је синтетисана код свих испитиваних врста у стресу солима. У литератури се такође наводи да је п-кумарна киселина код маховина била најефикаснија у одбрани од реактивних врста кисеоника и да се прдукује у великим количинаа када су биљке изложене условима стреса. Генерално, код све три испитиване врсте (*P. patens*, *E. hungaricus* и *H. heimii*) током стреса солима се дешава модификација у метаболизму фенолних једињења који се одликује повећаном синтезом п-кумарне киселине и смањеним интензитетом флавоноида. У овом поглављу је такође приказано поређење у синтези шећера, као сигналних молекула у стресу, код различитих представника бриофита и васкуларних биљака. Резултати добијени у овој докторској дисертацији су у сагласности са литературним подацима, обзиром да су сахароза, глукоза и фруктоза били доминантни шећери које су синтетисале све три испитиване врсте.

На крају овог поглавља, дискутовано је о значају и ефикасности ензимских компонената у систему одбране маховина од оксидативног стреса који се јавља као последица стреса солима. Три кључна ензима, каталазе, пероксидазе и супероксид дисмутазе, су биле активне код све три испитиване врсте (*P. patens*, *E. hungaricus* и *H. heimii*) током стреса солима, што је и било очекивано поређењем са литературним подацима за друге врсте бриофита, као и за васкуларне биљке.

У поглављу **Закључци** изведени су концизни закључци на основу резултата добијених у докторској дисертацији. Развијени су успешни протоколи за успостављање

in vitro културе факултативно халофитних врста *E. hungaricus* и *H. heimii*. Повећањем концентрације хормона из групе цитокинина (БАП) код врсте *E. hungaricus* долази до стимулације индукције нових пупољака, док је код врсте *H. heimii* ситуација другачија и јавља се инхибиција стварања пупољака. Такође, показано је да третман ниским концентрацијама хормона АБА позитивно утиче на продукцију биомасе, синтезу каротеноида и мултипликацију изданака код маховине *P. patens*. При краткотрајном излагању маховина стресу солима и током ниског интензитета овог типа стреса, није уочено смањено преживљавање, као ни негатива ефекат на синтезу фотосинтетичких пигмената код све три испитиване врсте. Концентрација укупних каротеноида, у случају дуготрајног стреса, опада са повећањем интензитета стреса код врста *P. patens* и *E. hungaricus*, док је код врсте *H. heimii* тренд другачији. Концентрација пролина опада са порастом интензитета стреса током дугог излагања стресу солима, при чему у исто време расте однос пролина и слободних аминокиселина. Током стреса солима се повећава количина укупних фенола синтетисаних у биљкама. Код врсте *P. patens* је детектована највећа количина укупних фенола и токоферола у условима стреса, у поређењу са осталим испитиваним врстама маховина. Доминантан шећер који се синтетише код свих врста је сахароза, док су глукоза и фруктоза присутне у знатно нижим концентрацијама. Активност ензима пероксидаза опада са порастом интензитета стреса код свих врста маховина. Активност езима супероксид дисмутазе расте током стреса код факултативно халофитних врста *E. hungaricus* и *H. heimii* док опада код врсте *P. patens*. Ензим каталаза има повећану активност на slabим до умереним интензитетима стреса код све три испитиване врсте. Механизми адаптације на стрес изазван солима се разликују код три врсте маховина. Код *P. patens* је доминантан неензимски тип заштите од стреса, док код факултативно халофитних врста *E. hungaricus* и *H. heimii* ензими антиоксидативне заштите имају кључну улогу у одбрани од стреса изазваног солима.

У поглављу **Литература** наведено је 372 библиографске јединице, од којих је већина публикована у водећим часописима из области науке о биљкама.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

1. **Vujičić M**, Sabovljević A, Milošević S, Segarra-Moragues JG, Sabovljević M. **M22**
2015. Effects of abscisic acid (ABA) on development of selected bryophyte species. *Plant Biosystems*, DOI: 10.1080/11263504.2014.1000423.
2. Sabovljević M, Papp B, Sabovljević A, **Vujičić M**, Szurdoki E, Segarra-Moragues J.G. 2012. *In vitro* micropropagation of rare and endangered moss **M23**
Entosthodon hungaricus (Funariaceae). *Bioscience Journal* 28(4): 632-640.

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја (M34)

1. **Vujičić M**, Milošević S, Sabovljević A, Sabovljević M. 2009. Abscisic acid effects activities of catalases and peroxydases in bryophytes *Atrichum undulatum*

(Hedw.) P. Beauv., *Marchantia polymorpha* L. and *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. in *in vitro* conditions. Moss 2009 (Washington University in St.Louis), St.Luis, October 22-25. Book of Abstracts: p. 50.

2. **Vujičić M**, Papp B, Sabovljević A, Szurdoki E, Sabovljević M. 2012. *In vitro* establishment, propagation and conservation of the rare and endangered moss halophyte *Hennediella heimii*. 8th Conference of European Committee for Conservation of Bryophytes: Bryophyte conservation – follow up on the 2010 Biodiversity Target. Budapest, Hungary, April 18-21. Book of Abstracts p. 36.
3. Petrović N, Petrović B, **Vujičić M**, Šinžar-Sekulić J, Sabovljević M, Sabovljević A. 2013. Influence of plant growth regulators on the morphogenesis of the rare and endangered moss *Entostodon hungaricus*. 1st International Conference on Plant Biology - 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, June 4-7, Subotica, Programme and Abstracts, p. 30.
4. **Vujičić M**, Milošević S, Papp B, Szurdoki E, Sabovljević M, Sabovljević A. 2013. Does antioxydative system increase salt stress survival in facultative halophytic moss *Entostodon hungaricus*? 4th Croatian Botanical Symposium with internacional participation, September 27-29, 2013, Split, Book of abstracts, p. 148
5. Sabovljević M, **Vujičić M**, Papp B, Petrović N, Petrović B, Szurdoki E, Sabovljević A. 2013. Insights into biology of the moss *Entostodon hungaricus*. A konferenciat Pocs Tamas professzor urnak ajaljuk, 80 szuletesnapja alkalmabol. Eger, Hungary, 30.09.-01.10. 2013. Book of Abstracts: p. 28.
6. **Vujičić M**, Sabovljević M, Milošević S, Nikolić N, Sabovljević A. 2014. Effects of NaCl on proline and free amino acid concentration in bryophytes *Entostodon hungaricus* and *Physcomitrella patens in vitro*. Third Balkan Scientific Conference on Biology, Plovdiv, Bulgaria, 30.05.-01.06.2014. Book of Abstracts: p. 73.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Милорада М. Вујичића**, под насловом „**Биохемијски и екофизиолошки одговори одабраних врста маховина на контролисани стрес изазван солима у аксеничним условима**“ је оригиналан и значајан допринос разумевању процеса адаптације на стрес изазван солима код три врсте маховина, *P. patens*, *E. hungaricus* и *H. heimii*. Овај рад има веома важан фундаментални допринос у области екофизиологије и биохемије бриофита. У дисертацији су дефинисани потенцијални механизми који имају одлучујући утицај на ефикасност одбране од стреса изазваног солима код испитиваних врста маховина. Оригиналним приступом је процењен утицај различитих компонената у систему заштите од стреса и њихове интеракције на механизме одбране од стреса солима.

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 директно публикована 2 рада у међународним часописима, као и 6 саопштења на скуповима међународног 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 **Милорада М. Вујичића**, под насловом **„Биохемијски и екофизиолошки одговори одабраних врста маховина на контролирани стрес изазван солима у аксеничним условима“**.

КОМИСИЈА:

Др Анета Сабовљевић

ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет

Др Марко Сабовљевић

ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет

Др Данијела Мишић

виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

Др Снежана Милошевић

научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

У Београду, 03.08.2016. године