

Биолошки факултет
Број захтева: 33/162-1
Датум: 12.6.2015.

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: **Биљана К. Филиповић**

студент докторских студија на студијском програму Биологија, Физиологија и молекуларна биологија биљака.

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Улога арабиногалактанских протеина у процесу морфогенезе *in vitro* код кичице (*Centaurium erythraea Rafn.*)“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 28.02.2013. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-750/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Улога арабиногалактанских протеина у процесу морфогенезе *in vitro* код кичице (*Centaurium erythraea Rafn.*)“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 13.03.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/39- 13.03.2015. год. у саставу:

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

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 12. јуна 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

33/162-12.6.2015.

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 VIII редовној седници одржаној 12.6.2015. године, донело је

О Д Л У К У

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

Биљане Филиповић, под називом:

„Улога арабиногалактанских протеина у процесу морфогенезе *in vitro* код кичице (*Centaurea erythraea* Rafn.)“.

Универзитет је дана 28.02.2013. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-750/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Filipović B., Simonović D., Trifunović M., Dmitrović S., Savić J., Jevremović S., Subotić A. (2015): Plant regeneration in leaf culture of *Centaurea erythraea* Rafn. Part 1: The role of antioxidant enzymes. Plant Cell Tissue Organ Culture 121 (3): 703-719. **M22**

Simonović A., **Filipović B.**, Trifunović M., Malkov S., Milinković V., Jevremović S., Subotić A. (2015): Plant regeneration in leaf culture of *Centaurium erythraea* Rafn. Part 2: The role of arabinogalactan proteins. Plant Cell Tissue Organ Culture 121 (3): 721-739. **M22**

Декан Биолошког факултета

Доставити:

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

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.03.2015. године, прихваћен је извештај ментора др Ангелине Суботић и др Иване Драгићевић о урађеној докторској дисертацији **Биљане К. Филиповић**, истраживача сарадника у Институту за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, Универзитета у Београду, под насловом:

“Улога арабиногалактанских протеина у процесу морфогенезе *in vitro* код кичице (*Centaurea erythraea Rafn.*)”,

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

1. **др Ангелина Суботић**, научни саветник, Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, Универзитет у Београду
2. **др Иван Драгићевић**, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду
3. **др Ана Симоновић**, виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, Универзитет у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Биљане К. Филиповић под насловом “Улога арабиногалактанских протеина у процесу морфогенезе *in vitro* код кичице (*Centaurea erythraea Rafn.*)”, урађена је у оквиру пројекта основних истраживања Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, бр. **173024**, а истраживања су обављена у Институту за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, Универзитета у Београду. Дисертација је написана на **181** страни и садржи **44** слике и **18** табела. Уводних страна (Насловна страна на српском и енглеском језику, Страна са информацијама о менторима и члановима комисије, Захвалница, Резиме на српском и енглеском језику, Садржај и Скраћенице) има **13**. Дисертација обухвата следећа поглавља: **Увод (35 страна)**, **Циљ рада (1 страна)**, **Материјал и методе (25 страна)**, **Резултати (55 страна)**, **Дискусија (34 стране)**, **Закључци (2 стране)** и **Литература (29 страна; 265 библиографских јединица)**. 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:

Докторска дисертација Биљане К. Филиповић припада области физиологије и молекуларне биологије биљака.

У уводном делу приказана су досадашња сазнања из научних области које су у непосредној вези са предметом истраживања ове докторске дисертације. Поглавље **УВОД** подељено је на пет потпоглавља: Морфогенеза биљака у условима *in vitro*, Биохемијски и молекуларни аспекти соматске ембриогенезе, Арабиногалактански протеини, Оксидативни стрес код биљака и Опште карактеристике врсте *Centaureum erythraea* Rafn. У првом потпоглављу **УВОДА** су описане основне карактеристике процеса морфогенезе у условима *in vitro*, са посебним освртом на соматску ембриогенезу и органогенезу. Наглашене су разлике између ових морфогенетских процеса, и истакнута улога регулатора растења и светлости у индукцији ових процеса. У другом потпоглављу дат је преглед сазнања из области физиолошких, биохемијских и молекуларних аспеката соматске ембриогенезе. У трећем потпоглављу детаљно су приказана досадашња сазнања о структури и подели арабиногалактанских протеина (AGP), као и детаљан преглед њихове улоге у регулацији процеса растења и развића код биљака. У четвртном потпоглављу дат је преглед савремених сазнања из области физиологије стреса код биљака. У овом делу је описан утицај различитих стресних фактора који могу деловати на биљке у култури *in vitro* и довести до појаве оксидативног стреса. Посебно је истакнута улога стресних фактора у индукцији соматске ембриогенезе и значај истраживања овог развојног процеса на биохемијском нивоу чиме би се расветлила улога антиоксидативних ензима у процесу регенерације биљака. У петом потпоглављу је дат приказ ботаничких карактеристика и лековитих својстава кичице. Кичица је биљка широког лековитог спектра деловања, захваљујући присуству фармаколошки активних супстанци, секоиридоида и ксантона, који имају антифунгално, антибактеријско и хепатопротективно дејство. Такође је дат детаљан преглед свих досадашњих истраживања у области *in vitro* регенерације и генетичких трансформација кичице.

У поглављу **ЦИЉ РАДА** описан је основни научни задатак докторске дисертације и дефинисани су циљеви у реализацији постављеног истраживачког задатка. Основни научни задатак био је проучавање појединих биохемијских и молекуларних аспеката *in vitro* морфогенезе кичице у циљу расветљавања развојне пластичности ове биљне врсте која се испољава у условима *in vitro*. Реализација научног задатка укључила је остваривање следећих циљева: испитивање оптималних услова за индукцију морфогенетских процеса из одсецака листова кичице, у циљу компаративне анализе ових развојних процеса на биохемијском и молекуларном нивоу; одређивање активности и профила изоформи антиоксидативних ензима, супероксид дисмутаза, каталаза и пероксидаза, ради утврђивања њихове улоге током процеса *in vitro* морфогенезе; испитивање улоге арабиногалактанских протеина у процесу индукције морфогенезе *in vitro* код кичице, применом различитих приступа заснованих на интеракцији арабиногалактанских протеина са “Yariv”-реагенсом (β GlcY) и моноклоналним антителима; идентификацију гена који кодирају арабиногалактанске протеине, потврду исправности секвенци директним секвенцирањем и биоинформатичку карактеризацију протеинских продуката ових гена; анализу експресије *AGP* гена током индукције процеса морфогенезе *in vitro* ради утврђивања њихове улоге у различитим морфогенетским процесима.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** јасно и детаљно су описане методе и услови под којима су извођени експерименти. У првом делу овог поглавља описан је биљни материјал коришћен за успостављање *in vitro* култура и дат састав хранљивих подлога за гајење биљака и индукцију процеса соматске ембриогенезе и органогенезе.

Такође су описани услови гајења биљака *in vitro*. Испитан је ефекат β GlcY на процес морфогенезе *in vitro* кичице, а састав хранљивих подлога са овим реагенсом је такође приказан. Наведена је класична метода за анатомска истраживања индукције морфогенезе. Детаљно су описани протоколи за одређивање активности антиоксидативних ензима, електрофорезом у полиакриламидном гелу и спектрофотометријском квантификацијом. Описана је метода радијалне дифузије за одређивање концентрације АGR током процеса морфогенезе *in vitro*, као и метода укрштене електрофорезе за одређивање квалитативних особина АGR. Поменуто методе радијалне дифузије и укрштене електрофорезе засноване су на интеракцији АGR са β GlcY. Кандидат је такође детаљно описао имунохистохемијску методу за локализацију АGR. Наведени су протоколи за изолацију РНК, методу реверзне транскрипције и техника PCR амплификације. Дат је детаљан опис методе за секвенцирање потенцијалних АGR транскрипата и квантификације експресије qRT-PCR-ом. Наведени су потупци и програми који су коришћени за биоинформатичку карактеризацију добијених протеинских секвенци. Након статистичке обраде резултата утврђена је њихова значајност применом одговарајућих статистичких тестова.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ**, у четири целине систематично и детаљно су описани сви добијени резултати, који су прегледно приказани табелама и сликама. На почетку поглавља **РЕЗУЛТАТИ** описани су морфогенетски процеси *in vitro* из одсецака листова кичице. Добијени подаци показали су да се, у зависности од светлосног режима и хранљиве подлоге, на одсечцима листова кичице одвијају четири различита морфогенетска процеса. На хранљивој подлози без регулатора растења и на светлости одвијао се процес директне органогенезе пупољака, а у мраку процес директне ризогенезе. Регенерација биљака путем соматске ембриогенезе је постигнута на хранљивим подлогама са регулаторима растења 2,4-D и CPPU на оба светлосна режима, док је процес органогенезе индукован на истим подлогама само на светлости. Други део **РЕЗУЛТАТА** бави се анатомским истраживањем процеса морфогенезе *in vitro* у циљу одређивања порекла регенераната из одсецака листова кичице, соматских ембриона и адвентивних пупољака. Утврђено је да су процеси соматске ембриогенезе и органогенезе индуковани на хранљивим подлогама са регулаторима растења, индиректни и асинхрони. Ћелије које имају ембриогени потенцијал локализоване су у субепидермалном слоју гајених одсецака листова кичице, док су ћелије са органогеним потенцијалом локализоване у мезофилу и субепидермалном слоју. У трећем делу **РЕЗУЛТАТА** анализирана је активност ензимског антиоксидативног система кичице током процеса морфогенезе. Установљено је да је активност антиоксидативних ензима SOD и CAT повишена услед повреде листова кичице до које је дошло приликом изоловања експлантата. Током процеса морфогенезе на свим хранљивим подлогама активност POX је била снажно индукована. У следећем делу овог поглавља приказани су резултати истраживања која се односе на испитивање улоге АGR у процесу морфогенезе *in vitro* код кичице, а која су обухватила више приступа испитивања. Упоредним испитивањем и поређењем ефеката β GlcY, који је додат у хранљиве подлоге, на различите морфогенетске процесе показано је да се ови процеси разликују по својој осетљивости на поменути реагенс. Најосетљивији је био процес соматске ембриогенезе, јер је смањење броја соматских ембриона по експлантату било најизраженије, док је процес директне органогенезе био осетљивији у односу на процес индиректне органогенезе. Процес директне ризогенезе је био неосетљив на утицај β GlcY. Затим је анализирана концентрација арабиногалактанских протеина током индукције различитих морфогенетских процеса. Установљено је повећање концентрације АGR протеина током свих морфогенетских процеса, али је до повећања најпре дошло на хранљивим подлогама са регулаторима растења. Такође је показано да додавање β GlcY у хранљиве подлоге није

утицало на концентрацију AGP у експлантатима. Установљене су разлике у преципитационим максимумима AGP изолованих са појединих третмана, мада су електрофоретски профили били слични и електрофоретска мобилност висока. Локализација специфичних AGP епитопа коришћењем моноклоналних антитела је показала да су AGP са LM2 епитопом присутни у ембрионом ткиву и раним стадијумима развића соматских ембриона, мада је слабије изражено присуство детектовано у ћелијским зидовима свих ћелија листа, док су JIM4 и JIM13 епитопи детектовани током даље диференцијације соматских ембриона. У циљу даљег испитивања улоге арабиногалактанских протеина у морфогенези *in vitro* кичице идентификовани су гени који кодирају арабиногалактанске протеине у транскриптому корена и листа кичице (*CeAGP1*, *CeAGP2*, *CeAGP3* и *CeAGP4*), а затим је исправност секвенци проверена директним секвенцирањем. Биоинформатичком анализом добијених протеинских секвенци AGP кичице помоћу различитих програма и поређењем са аминокиселинским секвенцама ортологних протеина из других биљака, потврђено је присуство структурних одлика карактеристичних за AGP, N-сигналног пептида, AGP домена и GPI-сигналне секвенце на C-терминусу. Установљено је да *CeAGP1*, *CeAGP2* и *CeAGP4* садрже FAS домен, док *CeAGP3* садржи DUF1070 домен. Анализирана је експресија четири *AGP* гена током морфогенезе кичице qRT-PCR методом, а добијени резултати су показали да се *CeAGP1* специфично индукује током соматске ембриогенезе, док се *CeAGP3* неспецифично индукује током морфогенезе на свим третманима.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, кандидат је на адекватан и детаљан начин повезао резултате овог истраживања са резултатима сличних истраживања објављених у међународним научним часописима. У првом делу овог поглавља дискутована је могућност регенерације из одсецака листова кичице и посебно је наглашено да је коришћењем ових експлантата и варирањем светлосног режима и ниских концентрација регулатора растења добијен високо регенеративан систем. Наведени резултати су потврдили податке из литературе о високој регенеративној способности кичице испољеној у условима *in vitro*. Потом је дискутована улога антиоксидативних ензима током морфогенезе кичице, која је по први пут испитана у овом раду. У трећем делу **ДИСКУСИЈЕ** детаљно је дискутована улога AGP у процесу морфогенезе кичице, упоређујући добијене резултате применом различитих методолошких приступа са резултатима других аутора, добијеним код других биљних врста. Посебно је истакнуто да су у овој дисертацији први пут идентификовани и секвенцирани *AGP* гени кичице. Подаци који се односе на испитивање промена експресије *AGP* гена током процеса соматске ембриогенезе и органогенезе су врло оскудни у литератури. У овој тези је показано да је експресија *AGP* гена повишена током процеса морфогенезе *in vitro* код кичице. Резултати ове докторске дисертације представљају прву анализу морфогенетских процеса код кичице на молекуларном нивоу и као такви чине добру основу за даља истраживања у области растења и развића биљака, посебно идентификације нових *AGP* гена и истраживања њихове улоге првенствено у процесима соматске ембриогенезе и органогенезе код кичице.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, на јасан начин су сумирани основни закључци који у потпуности произилазе из добијених резултата ове докторске дисертације и одговарају задатим циљевима. Закључено је да је полазећи од одсецака листова кичице, варирањем концентрација и односа регулатора растења, 2,4-D и CPPU, у хранљивој подлози, као и светлосног режима, добијена *in vitro* морфогенеза и то путем четири различита морфогенетска процеса: директне органогенезе пупољака, индиректне органогенезе пупољака, директне ризогенезе и индиректне соматске ембриогенезе. Испитивање појединих биохемијских и молекуларних аспеката током индукције ових развојних процеса донело је нова сазнања о улози антиоксидативних ензима и AGP у процесу морфогенезе *in vitro* код кичице. Гени који кодирају поједине AGP код кичице су по први

пут секвенцирани и идентификовани и вероватно представљају део веће фамилије *AGP* гена. Такође је показано да два од четири секвенцирана *AGP* гена имају улогу у морфогенетским процесима, при чему је улога *CeAGP1* специфична за процес индиректне соматске ембриогенезе, на основу чега је закључено да би *CeAGP1* могао представљати потенцијални маркер соматске ембриогенезе.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** приказан је списак од **265** цитираних научних публикација из области истраживања. У анализи резултата ове докторске дисертације коришћени су релевантни литературни наводи.

У поглављу **БИОГРАФИЈА АУТОРА** изложена је кратка и садржајна биографија аутора докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Filipović B.**, Simonović D., Trifunović M., Dmitrović S., Savić J., Jevremović S., Subotić A. (2015): Plant regeneration in leaf culture of *Centaureum erythraea* Rafn. Part 1: The role of antioxidant enzymes. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 121 (3): 703-719. **M21**
2. Simonović A., **Filipović B.**, Trifunović M., Malkov S., Milinković V., Jevremović S., Subotić A. (2015): Plant regeneration in leaf culture of *Centaureum erythraea* Rafn. Part 2: The role of arabinogalactan proteins. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 121 (3): 721-739. **M21**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Filipović B.**, Simonović A., Dragičević M., Savić J., Dmitrović S., Subotić A. (2013): Antioxidative enzyme activities during in vitro morphogenesis from leaf explants of *Centaureum erythraea* Rafn. XX symposium of the Serbian Plant Physiology Society, 4-7. June 2013, Subotica, Book of Abstracts, p. 62. **M34**
2. Simonović A., **Filipović B.**, Malkov S., Tanić N., Milinković V., Dragičević M., Subotić A. (2013): Arabinogalactan protein gene family from *Centaureum erythraea* Rafn. XX symposium of the Serbian Plant Physiology Society, 4-7. June 2013, Subotica, Book of Abstracts, p. 59. **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Filipović B.**, Subotić A., Grubišić D. (2011): Induction of somatic embryogenesis and organogenesis in leaf culture of *Centaureum erythraea* Rafn. XIX symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Banja Vrujci, Serbia, Book of Abstracts, p. 69. **M64**

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Биљане Филиповић је научно оправдана и даје значајни допринос развоју истраживања у области физиологије, биохемије и молекуларне биологије биљака.

У свом раду кандидат је обрађивао актуелне проблеме од општег значаја за науку, посебно у области растења и развића биљака. Својим истраживањима Биљана Филиповић је успоставила погодан модел-систем за компаративну анализу процеса соматске ембриогенезе и органогенезе код кичице на биохемијском и молекуларном нивоу. Резултати ове докторске дисертације доприносе расветљавању и бољем разумевању развојне пластичности код кичице која се испољава у условима *in vitro*. Кандидат је у својој докторској дисертацији по први пут објавио резултате који се односе на улогу антиоксидативних ензима и арабиногалактасних протеина током процеса соматске ембриогенезе и органогенезе код кичице. Посебан научни допринос ове докторске дисертације, се огледа у томе што су секвенцирани и идентификовани гени који кодирају арабиногалактанске протеине код кичице. Један од четири идентификована гена има специфичну улогу у процесу индиректне соматске ембриогенезе, на основу чега би он могао представљати потенцијални маркер овог развојног процеса код кичице. Део резултата своје докторске дисертације је публикован у два рада из категорије М22. Биљана Филиповић је у раду исказала самосталност у планирању и извођењу експеримената, као и познавање научних области које задата тема обухвата.

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 Биљане Филиповић под насловом: **“Улога арабиногалактанских протеина у процесу морфогенезе *in vitro* код кичице (*Centaureum erythraea* Rafn.)”**.

КОМИСИЈА:

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

др Ивана Драгићевић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

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

У Београду, 11.05.2015. године.