

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На II редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 16. новембра 2018. године, прихваћен је извештај ментора др Иване Момчиловић и проф. др Душице Јаношевић о урађеној докторској дисертацији **Данијела И. Пантелића**, докторанда Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом „Елонгациони фактор транслације 1А код кромпира (*Solanum tuberosum* L.): карактеризација изоформи, експресија и улога у одговору биљака на топлотни стрес“, 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 Душица Јаношевић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет и 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 Данијела И. Пантелића под називом „Елонгациони фактор транслације 1А код кромпира (*Solanum tuberosum* L.): карактеризација изоформи, експресија и улога у одговору биљака на топлотни стрес“, урађена је на Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду.

Докторска дисертација је написана на укупно 142 стране. Уводних страна (насловна страна на српском и енглеском језику, страна са информацијама о менторима и члановима комисије, Захвалница, Сажетак, Abstract, Скраћенице и Садржај) има 13. Дисертација се састоји из седам основних поглавља: **Увод** (31 страна), **Циљ рада** (1 страна), **Материјал и методе** (24 стране), **Резултати** (47 страна), **Дискусија** (15 страна), **Закључци** (3 стране) и **Литература** (21 страна). Наведена поглавља дисертације садрже 44 слике, у оквиру којих је приказано 53 графика, осам табела и 288 литературних цитата. На крају дисертације су приложени следећи документи: 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 Данијела И. Пантелића је оригинално истраживање чији је циљ био да се испита елонгациони фактор транслације 1А код кромпира (изоформе, генска фамилија, транскрипти гена), његова експресија у различитим биљним органима током деловања високих температура *in vitro*, *ex vitro* и у пољу, и установи значај и улога у одговору биљака кромпира на топлотни стрес.

У поглављу **Увод** кандидат Данијел И. Пантелић даје преглед савремених сазнања из области физиологије и молекуларне биологије биљака о утицају високих температура (топлотни стрес) на *S. tuberosum* и елонгационом фактору транслације 1А (eEF1A) као мултифункционалном протеину који може имати значаја за толеранцију биљака на деловање фактора абиотичког стреса. Кандидат је детаљно изложио досадашња сазнања о: а) ботаничким особинама кромпира (*Solanum tuberosum* L.) - биљне врсте која је била објекат истраживања; б) утицају високих температура на растење, развиће и принос кромпира; в) структури и основној функцији eEF1A; г) модулацији експресије eEF1A у условима абиотичког стреса; д) додатним улогама eEF1A и њ) протеинима топлотног стреса.

У поглављу **Циљеви рада** изложени су следећи појединачни циљеви истраживања: а) испитивање експресије eEF1A у листовима различитих врста биљака изложених краткотрајном топлотном стресу *ex vitro*; б) испитивање утицаја високе температуре на процес туберизације, растење и развиће различитих сорти кромпира гајених *in vitro*, *ex vitro* и у експерименталном пољу; в) испитивање експресије eEF1A у условима високе температуре код различитих сорти кромпира гајених *in vitro*, *ex vitro* и у експерименталном пољу; г) карактеризација изоформи eEF1A у листовима различитих сорти кромпира у условима високе температуре, гајених *ex vitro* и у експерименталном пољу; д) процена броја копија гена који кодирају eEF1A код различитих сорти кромпира; њ) експресија *eEF1A* гена у условима високе температуре у кртолама кромпира гајеног *ex vitro*; е) идентификација индуцибилних *eEF1A* гена у условима топлотног стреса.

У поглављу **Материјал и методе** су јасно и детаљно описани услови под којима су гајене испитиване сорте кромпира *in vitro*, *ex vitro* и у пољу, као и дизајн експеримената. Приказане су детаљне процедуре за: а) успостављање *in vitro* култура кромпира и испитивање туберизације у условима топлотног стреса; б) гајење биљака кромпира *ex vitro* и испитивање растења, развића и туберизације у условима краткотрајног и дуготрајног топлотног стреса; в) гајење одабраних сорти кромпира у експерименталном пољу и узорковање материјала за анализу протеина; г) одређивање заступљености eEF1A и HSP у биљном материјалу коришћењем 1D SDS-полиакриламид гел електрофорезе и имуноблот анализе; д) карактеризацију eEF1A изоформи коришћењем 2D гел електрофорезе и имуноблот анализе; њ) анализу геномске ДНК и процену броја копија eEF1A гена код одабраних сорти кромпира; е) одређивање експресије *eEF1A* гена методом квантитативног PCR-а (qPCR) и ж) статистичку анализу добијених резултата.

Поглавље **Резултати** састоји се из десет целина и садржи 36 слика, у оквиру којих је приказано 53 графика, које описују резултате добијене у оквиру истраживања. У првој целини су приказани резултати испитивања експресије eEF1A код различитих врста монокотиледоних и дикотиледоних биљака коришћењем имуноблот методе. Добијени резултати показали су да код неколико испитиваних врста (кромпир, пшеница, кукуруз и цвекла) долази до акумулације датог протеина у условима краткотрајног топлотног стреса и да се највеће повећање заступљености eEF1A, од 3,4 пута у односу на контролу, јавља у листовима кромпира. На основу ових резултата, настављено је проучавање експресије eEF1A кромпира у условима топлотног стреса и топлотне толеранције *S. tuberosum*. У другој, трећој, четвртој и петој целини приказани су резултати везани за испитивање утицаја дуготрајног топлотног стреса на преживљавање експлантата, растење изданака, иницијацију микрокртола, растење микрокртола и динамику процеса туберизације код сорти кромпира гајених *in vitro*. Добијени резултати су указали да се две сорте, Désirée и Festival, значајно разликују у

топлотној толеранцији. Дате сорте су означене као топлотно-осетљива сорта *Désirée* и топлотно-толерантна сорта *Festival*. У шестој целини приказани су резултати испитивања експресије *eEF1A* и HSP протеина у изданцима и микрокртолама сорти *Désirée* и *Festival* у условима дуготрајног топлотног стреса *in vitro*. Резултати имуноблот анализе су показали да дуготрајно излагање високој температури доводи до повећања заступљености *eEF1A* у изданцима обе сорте, док је у микрокртолама акумулација датог протеина запажена само код топлотно-толерантне сорте *Festival*. У седмој целини испитиван је утицај високе температуре како на растење и туберизацију биљака кромпира *ex vitro*, тако и експресију *eEF1A* у различитим органима биљака кромпира. Резултати 2D-имуноблот анализе *eEF1A* у листовима сорте *Désirée* су показали да се протеинска трака *eEF1A* (49,2 kDa) састоји од 7-8 полипептида код потпуно развијених листова. Такође, установљено је да је повећање заступљености *eEF1A* током краткотрајног третмана високом температуром последица акумулације полипептида/изоформи из базне групе (pI 8,8-9,5). У оквиру ове целине презентовани су и резултати који указују да дуготрајни третман умерено високом температуром различито утиче на процесе растења, развића и туберизације код две испитиване сорте кромпира. Код сорте *Désirée*, дошло је до значајног повећања висине, броја листова и свеже надземне биомасе биљака у условима дуготрајног топлотног стреса, док је код сорте *Festival* висока температура довела је до смањења висине биљака, мање продукције свеже биомасе и мањег броја листова. Топлотни стрес није имао утицаја на принос миникртола по биљци код сорте *Festival*, док се сорта *Désirée* карактерисала смањењем приноса. Интересантан резултат је пад у броју кртола величине 10-15 mm код сорте *Désirée*, док је код сорте *Festival* уочен пораст броја миникртола ове категорије. Значајно је напоменути да је управо у миникртолама ове категорије величине дошло и до значајног пада у заступљености *eEF1A* код сорте *Désirée* и акумулације датог протеина код сорте *Festival*. У осмој целини испитиван је утицај високе температуре на експресију *eEF1A* у листовима шест сорти/генотипова кромпира гајених у експерименталном пољу, као и спроведена 2D-имуноблот анализа *eEF1A* код одабраних сорти. Резултати указују на разлику у нивоу акумулације овог протеина при деловању високе температуре међу анализираним генотиповима кромпира, као и позитивну корелацију релативне заступљености *eEF1A* у условима топлотног стреса и броја кртола по биљци или приноса сорти у две изузетно топле године (2011. и 2012.). Такође, установљено је да повећању заступљености *eEF1A* у условима топлотног стреса највише доприносе 2-3 полипептида/изоформе базне групе (pI 8,2-9,5). У деветој целини приказани су резултати анализе геномске ДНК шест комерцијалних сорти/генотипова кромпира, као и претрага база података. Анализа геномске ДНК је указала на постојање генске фамилије *eEF1A* која се састоји од 6 и више гена, а претрага база података на постојање 12 комплетних *eEF1A*-кодирајућих секвенци код различитих сорти/генотипова кромпира. Поређење и анализа нуклеотидних секвенци шест *eEF1A* гена дуплог моноплоидног клона DM1-3516R44 *S. tuberosum* је показало да је егзон-интрон структура очувана код ове фамилије гена, као и готово идентичну предвиђену аминокиселинску секвенцу протеина које кодирају. У десетој целини приказани су резултати испитивања експресије *eEF1A* гена у миникртолама кромпира при дуготрајном топлотном стресу. Код сорте *Désirée* установљено је смањење заступљености већине *eEF1A* транскрипата при деловању високе температуре, а највеће такво смањење је детектовано за транскрипт *eEF1A-3*. Код сорте *Festival*, поред транскрипата *eEF1A* гена чији се број није значајно мењао или је опадао у условима дуготрајног стреса, забележено је значајно повећање заступљености транскрипата два *eEF1A* гена. Највеће повећање је забележено за *eEF1A-12* транскрипт (2342,9 пута у односу на контролу), што указује да је *eEF1A-12* ген топлотно индуцибилан и највише

доприноси акумулацији eEF1A протеина у кртолама ове сорте кромпира у условима високе температуре.

У поглављу **Дискусија** кандидат Данијел Пантелић је на адекватан начин, детаљно и критички размотрио и упоредио добијене резултате са постојећим подацима из новије литературе. Успостављање система за испитивање туберизације кромпира у условима топлотног стреса *in vitro* успешно је изведено. На основу података из литературе, као и резултата испитивања топлотно-индуцибилних заштитних протеина HSP17,6 и HSP101, аутор је установио да температура од 29 °C представља високу температуру која не ремети преживљавање и растење експлантата, али утиче на иницијацију и растење микрокртола код топлотно-осетљивих сорти кромпира. Такође, детаљно је описана процедура за проучавање ефекта дуготрајног топлотног стреса током фазе иницијације и почетног растења кртола *ex vitro*, за шта не постоје литературни подаци. У литератури постоји мало података о утицају топлотног стреса на компоненте транслационе машинерије код биљака, а ефекат високе температуре на експресију eEF1A протеина до сада није испитиван код највећег броја биљних врста. До сада је индукција експресије eEF1A у топлотном стресу уочена само код *Triticum aestivum* L. (пшеница) и *Oryza sativa* L. (пиринач). Резултати дисертације Д. Пантелића потврдили су акумулацију eEF1A код пшенице, али указују да и друге врсте, попут кромпира, кукуруза и цвекле, повећавају продукцију eEF1A у одговору на деловање високе температуре. Такође, аутор је установио везу између топлотне толеранције генотипова кромпира, која је окарактерисана параметрима приноса, и акумулације eEF1A у микрокртолама у условима дуготрајног топлотног стреса *in vitro*. Дати налази су потврђени *ex vitro* експериментима где је установљена акумулација eEF1A у већим/старијим миникртолама и формирање већег броја ових миникртола у условима топлотног стреса код топлотно-толерантне сорте, што указује на важну улогу eEF1A у смањењу негативног утицаја топлотног стреса на туберизацију кромпира. Анализом геномске ДНК шест сорти/генотипова кромпира, која је урађена у оквиру дисертације, установљено је постојање 6-10 копија *eEF1A*, што је у складу са подацима из литературе који указују на постојање мултигенске eEF1A фамилије код биљака (4-20 гена). Такође, број детектованих *eEF1A* гена код сорте Désirée се у потпуности подударао са литературним подацима. Анализом заступљености *eEF1A* транскрипата у условима дуготрајног излагања високој температури, установљено је постојање топлотно-индуцибилних *eEF1A* гена, а подаци из литературе указују на повећану експресију еукариотског иницијационог фактора транслације 5A3 код кромпира, што, према аутору, указује да појачана транслација/синтеза протеина може бити одговор неких генотипова кромпира на дуготрајни топлотни стрес.

У поглављу **Закључци** кандидат јасно и прегледно износи најзначајније закључке који су произашли из резултата докторске дисертације. Комисија издваја следеће закључке: 1) топлотно-толерантна сорта кромпира Festival карактерисала се како формирањем већег броја микрокртола, већом просечном масом микрокртола и укупним приносом, тако и акумулацијом eEF1A у микрокртолама у условима дуготрајног топлотног стреса *in vitro* у односу на топлотно-осетљиву сорту Désirée; 2) резултати *ex vitro* експеримента су показали акумулацију eEF1A у већим/старијим миникртолама и формирање већег броја ових миникртола у условима топлотног стреса код топлотно-толерантне сорте Festival у односу на топлотно-осетљиву сорту Désirée, што указује на могућу значајну улогу eEF1A у смањењу негативног утицаја топлотног стреса на туберизацију кромпира; 3) значајна позитивна корелација установљена је између заступљености eEF1A у листовима кромпира при високим температурама и приноса шест сорти кромпира у огледу у пољу током две изузетно топле године (2011.

и 2012.); 4) eEF1A кромпира је протеин од 49,2 kDa који поседује 5-8 изоформи од којих 2-3 полипептида/изоформе из базне групе највише доприносе повећању заступљености eEF1A у условима високе температуре; 5) геномска анализа шест комерцијалних сорти кромпира је указала на постојање *eEF1A* генске фамилије која се састоји од 6 и више гена, а претрага база података на укупно дванаест генских транскрипата код различитих сорти/генотипова; 6) ген који кодира транскрипт *eEF1A-12* термо-толерантне сорте Festival је изузетно индуцибилан у условима високе температуре и вероватно има главни утицај на акумулацију eEF1A протеина у кртолама током топлотног стреса.

У поглављу **Литература** наведено је 288 библиографских јединица, што показује студиозан приступ кандидата изучавању проблематике, како по броју коришћених библиографских јединица, тако и по релевантности њиховог избора.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Pantelić D**, Dragičević I, Rudić J, Fu J, Momčilović I (2018) Effects of high temperature on *in vitro* tuberization and accumulation of stress-responsive proteins in potato. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59 (3): 315-324. **M22**. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13580-018-0043-x>
2. Momčilović I, **Pantelić D**, Zdravković-Korać S, Oljača J, Rudić J, Fu J (2016) Heat-induced accumulation of protein synthesis elongation factor 1A implies an important role in heat tolerance in potato. *Planta*, 244 (3): 671-679. **M21**. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-016-2534-2>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу:

1. **Pantelić D**, Rudić J, Oljača J, Simonović A, Bročić Z, Momčilović I (2018) Heat-induced expression of protein synthesis elongation factor 1A associated with potato heat tolerance. IX International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2018", Jahorina, Bosnia and Herzegovina. Book of Abstracts, 335. **M34**
2. **Pantelić D**, Zdravković-Korać S, Oljača J, Rudić J, Fu J, Momčilović I (2015) Heat-induced accumulation of protein synthesis elongation factor 1A implies an important role in heat tolerance in potato. 2nd International Conference on Plant Biology and 21st Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Petnica, Serbia. Book of Abstracts, 180. **M34**
3. Dragičević I, **Pantelić D**, Oljača J, Kajzerberger M, Momčilović I (2013) Effects of long-term heat stress on *in vitro* tuberization of potato, *Solanum tuberosum* L. 1st International Conference on Plant Biology and 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Subotica, Serbia. Programme and Abstracts, 122. **M34**

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација **Данијела И. Пантелића**, под насловом „**Елонгациони фактор транслације 1А код кромпира (*Solanum tuberosum* L.): карактеризација изоформи, експресија и улога у одговору биљака на топлотни стрес**“, представља свестрано и савремено урађену студију у области физиологије и молекуларне биологије биљака. Добијени резултати представљају релевантну основу за даља истраживања која би дала допринос расветљавању и бољем разумевању механизма толеранције биљака на деловање високе температуре, једног од најзначајнијих фактора абиотичког стреса који ограничава растење, развиће и продуктивност биљака у глобалним размерама. Требало би напоменути да су у овој дисертацији по први пут изнети подаци о утицају високе температуре на eEF1A компоненту транслационе машинерије код кромпира. Резултати дисертације дају свеобухватан приказ како eEF1A изоформи и генске фамилије eEF1A код кромпира, тако и анализе експресије гена и акумулације протеина у условима високе температуре. Такође, установљено је постојање топлотно-индуцибилног *eEF1A* гена чији продукт значајно доприноси акумулацији eEF1A, а тиме и топлотној толеранцији једне од испитиваних сорти/генотипова кромпира, што отвара могућност за његово коришћење у креирању нових, термотолерантних сорти кромпира. Комисија посебно жели да нагласи да је кандидат показао висок степен компетентности у конципирању експеримената и зрелости у критичкој интерпретацији постигнутих резултата и извођењу основних закључака што није увек било сасвим једноставно.

На основу изложеног, као и на основу увида у рад кандидата током реализације ове докторске дисертације, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу овог истраживања успешно остварени и предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати поднети Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације **Данијела И. Пантелића** под насловом: „**Елонгациони фактор транслације 1А код кромпира (*Solanum tuberosum* L.): карактеризација изоформи, експресија и улога у одговору биљака на топлотни стрес**“.

У Београду, 19. 11. 2018. год.

КОМИСИЈА:

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

др Душица Јаношевић, ванредни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

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