

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10.09.2021. године, на основу молбе ментора, др Марка Сабовљевића, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Милорада Вујичића, доцента Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Марије В. Ћосић**, асистенткиње Биолошког факултета Универзитета у Београду под насловом: **„Ефекат апсцисинске киселине у одговору одабраних врста бриофита на стрес изазван натријум-хлоридом“**, у саставу: др Марко Сабовљевић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Милорад Вујичић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду и др Милош Мојовић, редовни професор, Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација Марије В. Ћосић под насловом „Ефекат апсцисинске киселине у одговору одабраних врста бриофита на стрес изазван натријум-хлоридом“ садржи укупно 200 страна пагираног и непагираног текста написаног према Упутству о облику и садржају докторске дисертације која се брани на Универзитету у Београду. Пагирани текст обухвата укупно 182 стране и уобличен је у следеће целине: Увод (стр. 1 - 42), Циљеви рада (стр. 43), Материјал и методе (стр. 44 - 56), Резултати (стр. 57 - 134), Дискусија (стр. 135 - 157), Закључци (стр. 158) и Литература (стр. 159-182). Непагирани текст обухвата: насловну страну на српском и енглеском језику, списак ментора и чланова Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације, изјаве захвалности, сажетак на српском и енглеском језику, листу скраћеница, садржај докторске дисертације, биографију аутора и Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

У поглављу Литература наведено је 376 библиографских јединица распоређених по абecedном реду и правилно цитираних у тексту. Докторска дисертација садржи укупно 57 слика (15 у поглављу Увод, 2 у поглављу Материјал и методе и 40 у поглављу Резултати), 17 табела (2 у поглављу Материјал и методе и 15 у поглављу Резултати) и 34 графикона у поглављу Резултати.

## Анализа докторске дисертације

У докторској дисертацији кандидаткиње Марије Ћосић приказани су резултати проучавања ефеката егзогено додате апсцисинске киселине и натријум-хлорида, са посебним освртом на дефинисање разлика и сличности у механизмима толеранције и резистенције на стрес изазван солима код одабраних врста маховина (*Physcomitrella patens*, *Henediela heimii*, *Entosthodon hungaricus*) као и разлике и сличности одговора на стрес у односу на васкуларне биљке.

Прво поглавље **Увод** је подељено у 10 подпоглавља, у којима је дат преглед научних сазнања у складу са објектима и предметом истраживања у овој докторској дисертацији. Прва четири подпоглавља се односе на описивање општих карактеристика бриофита, њихове еволуције и филогеније, бројности и распрострањења, са посебним акцентом на животни циклус бриофита и начине њиховог вегетативног размножавања у природи и лабораторијским условима. Наведене информације су од значаја за детаљније упознавање бриофита, групе биљака које су ређе проучаване и за које постоји мање податка у поређењу са васкуларним биљкама. Пето подпоглавље детаљно описује морфологију и анатомију бриофита, што је веома значајно пошто се у овој дисертацији одређене анализе тичу праћења промена на анатомском и морфолошком нивоу. У шестом подпоглављу је описан значај бриофита, где се посебно истиче њихов значај не само у еколошком смислу, већ и у савременим експерименталним истраживањима. Седмо подпоглавље Физиологија стреса код биљака, подељено је у додатне 4 целине у којима се кандидаткиња детаљно бави физиологијом стреса код биљака са посебним освртом на ефекте које натријум-хлорид има на биљке. Посебно се посвећује пажња одговору како васкуларних биљака тако и бриофита на стрес изазван натријум-хлоридом, као и описивању постојећих механизма толеранције на стрес. У осмом подпоглављу се детаљније описује улога примарних и секундарних метаболита, као и начина како они могу допринети повећању толеранције и резистенције на стрес изазван натријум-хлоридом. Савремени доступни литературни подаци који се тичу физиологије стреса код бриофита су интерпретирани и упоређивани са познатим подацима добијеним на васкуларним биљкама. Овакав приступ у поређењу података који се тичу васкуларних биљака са доступним подацима који се тичу истраживања на бриофитама има изузетан значај како за екофизиологију биљака, тако и за еволуциону биологију. Поред описа различитих начина на који се може остварити толеранција на стрес изазван солима, у деветом подпоглављу се детаљно описују особине апсцисинске киселине и њени ефекти на морфолошке промене и на експресију гена кључних за одговор и толеранцију бриофита на стрес изазван натријум-хлоридом. Последње, десето подпоглавље се бави детаљним описом биологије и екологије одабраних врста маховина и образложењем зашто су изабране као моделу у овом типу експерименталног истраживања.

У наредном поглављу докторске дисертације су јасно дефинисани и таксативно наведени основни **Циљеви рада** и то: 1) испитивање утицаја егзогено додате апсцисинске киселине код одабраних врста маховина на стрес изазван натријум-хлоридом, 2) праћење промена на морфолошком нивоу услед деловања апсцисинске киселине и натријум-

хлорида и њиховог комбинованог деловања, 3) праћење промена на биохемијском нивоу, тачније квалитативне и квантитативне промене садржаја шећера, фенолних једињења, као и кватитативне промене терпеноида услед деловања апсцисинске киселине и натријум-хлорида и њиховог комбинованог деловања, 4) хистохемијска анализа испитиваних метаболита, 5) праћење продукције реактивних облика кисеоника и квантификација оксидативног стреса у експерименталним условима, 6) дефинисање механизма толеранције одабраних врста маховина и њихове резистенције на стрес изазван натријум-хлоридом, 7) дефинисање сличности и разлика у механизмима одговора на стрес изазван натријум-хлоридом међу испитиваним врстама и 8) дефинисање улоге апсцисинске киселине у одговору испитиваних врста маховина на стрес изазван натријум-хлоридом.

У поглављу **Материјал и методе** детаљно је описан дизајн експерименталног истраживања у овој докторској дисертацији, као и технике стерилног рада и припреме хранљивих подлога за гајење и умножавање биљног материјала у култури *in vitro*. Наведени су сви детаљи који се тичу порекла биљног материјала и контролираних услова у специјалним коморама за гајење биљака. За све апарате, хемикалије и потрошни материјал коришћен за експерименталну поставку наведени су произвођачи. Детаљно су описане методе којима су анализирани параметари морфогенезе, као и начини документовања морфо-анатомских промена на биљкама. За спектрофотометријску анализу фотосинтетичких пигмената детаљно је наведен протокол и формуле којима се квантификује концентрација пигмената. Свака од колориметријских метода коришћена за анализу секундарних метаболита (укупна фенолна једињења, фенолне киселине, флавоноиди, флавоноли, терпеноиди и тритерпени) и антиоксидативног капацитета испитиваних врста маховина (DPPH, редукциони потенцијал екстракта и  $\beta$ -каротен/линолна киселина тест) је веома детаљно описана и наведени су аутори према којима су методе модификоване и оптимизоване. Дат је детаљан протокол за квантификацију фенолних једињења UHPLC/ DAD/ ( $\pm$ ) HESI - MS2 методом при чему је коришћено неколико комерцијално доступних стандарда (кафена киселина, р-кумаринска киселина, апигенин, лутеолин, кверцитрин, изокверцитрин, изооријентин, нарингенин, ванилин, рутин и камферол). Квантификација шећера и шећерних алкохола је вршена HPLC – PAD методом, уз коришћење великог броја стандарда (арабиноза, глукоза, фруктоза, рибоза, галактоза, ксилоза, сахароза, малтоза, трехалоза, тураноза, гентиобиоза, изомалтоза, мелибиоза, изомалтотриоза, малтотриоза, тураноза, паноза, рафиноза, стахиоза, манитол, ерититрол, галактитол, глицерол и сорбитол). Додатно, квантификована је продукција реактивних облика кисеоника, првенствено хидроксил и аскорбил радикала коришћењем електронске парамагнетне резонантне спинске спектроскопије (EPR). Детаљно је описан принцип рада уређаја и на који начин се детектују слободни радикали у живом, свежем биљном материјалу. Неколико хистохемијских анализа (за фенолна једињења, шећере, липиде и терпене) је коришћено за потврду присуства и евентуалне локализације у ћелијама филоида и протонеме, при чему је описан поступак прављења микроскопских препарата и рада на флуоресцентом

светлосном микроскопу. За сваку појединачну анализу карактеристичну за одређену групу метаболита дат је детаљан протокол. Поред тога, описана је статистичка обрада података у програму STATISTICA8, уз коришћење анализе варијансе и Фишеровог post-hoc теста за поређење сличности између група.

У оквиру поглавља **Резултати** кандидаткиња најпре описује резултате који се односе на анализу параметара морфогенезе (преживљавање, индекс мултипликације и пречник секундарне протонеме) и како се они мењају у зависности од присуства натријум-хлорида и предтретмана апсцисинском киселином. Повишене концентрације натријум-хлорида утичу на смањење параметара морфогенезе, док апсцисинкса киселина повећава преживљавање и утиче на формирање структура за преживљавање код брио-халофита. У другом подпоглављу описано је како се концентрација фотосинтетичких пигмената повећава услед деловања натријум-хлорида, док услед предтретмана апсцисинском киселином, долази до смањења концентрације пигмената. Даље се кандидаткиња бави описивањем резултата добијених анализом фенолних једињења и терпеноида. Установљено је да укупни феноли, фенолне киселине, флавоноиди и флавоноли незнатно опадају услед екстремно високих концентрација натријум-хлорида, док предтретман апсцисинском киселином утиче на стабилнију промену у концентрацији и садржају фенола када се биљке изложе деловању натријум-хлорида. Промена концентрације кумарина није у корелацији са повећањем концентрације натријум-хлорида. Квантификација фенолних једињења указује на то да се у највећој мери уочава пораст концентрације кафеине киселине код врсте *P. patens*, р-кумаринске киселине код *E. hungaricus* и камферола код врсте *H. heimii* услед деловања натријум-хлорида. Предтретман апсцисинском киселином условљава смањење концентрације р-кумаринске киселине код *E. hungaricus*, али и на значајан пораст концентрације кафеине киселине и изооријентина и изорамнетина код *H. heimii*. Укупни терпени и тритерпени су приказани графички и добијени резултати указују да свака врста реагује другачије на додат натријум-хлорид у хранљиву подлогу у погледу синтезе терпеноида и тритерпена. У наредном подпоглављу се описује антиоксидативни потенцијал екстракта испитиваних биљака и установљено је коришћењем више анализа да предтретман апсцисинском киселином утиче на повећање антиоксидативног потенцијала када се биљке изложе дејству натријум-хлорида. Квантитативна анализа шећера је показала да су доминантно присутни глукоза, фруктоза и сахароза код све три испитиване врсте, али да је промена концентрације ових шећера специфична за сваку од испитиваних врста. Испитиване врсте реагују различито у зависности од примењене концентрације натријум-хлорида и предтретмана апсцисинском киселином. Поред већ поменутих шећера, обрађени су и резултати добијени за промену квалитативног састава различитих шећера и шећерних алкохола. Посебно се истичу резултати за шећере који евентуално могу указати на специфичност одговора на стрес солима код одређене врсте, као што су рибоза, трехалоза, изомалтоза и шећерни алкохоли. У шестом подпоглављу су детаљно представљени резултати који указују на продукцију хидроксилног радикала и аскорбил радикала код испитиваних врста. Посебно је

наглашена разлика у количини слободних радикала који се продукују код брио-халофита и модел врсте *P. patens* услед присуства натријум-хлорида у хранљивој подлози. Предтретман апсцисинском киселином утиче на повећање продукције хидроксил радикала и појаву аскорбил радикала код брио-халофита. У последњем подпоглављу приказане су микроскопске слике које потврђују присуство испитиваних метаболита и указују на јасну разлику у количини (која је потврђена биохемијским методама) и у локализацији.

Резултати су детаљно анализирани и упоређени са доступним литературним подацима у поглављу **Дискусија**. Најпре је дискутован утицај натријум-хлорида и апсцисинске киселине, као и њихове комбинације, на промену параметара морфогенезе, на присуство или одсуство одређених структура. Упоређивани су подаци са резултатима публикованим за истраживања која се тичу физиологије стреса код бриофита и изнете су тврдње и докази за објашњење таквих резултата. Даље, користећи доступне податке објављене на васкуларним биљкама и маховинама, дискутовани су резултати из ове докторске дисертације при чему су установљене неке правилности, али и неке разлике са постојећим подацима. Посебно је дискутован позитиван ефекат натријум-хлорида на морфогенезу и синтезу фотосинтетичких пигмената, са освртом на стимулаторни ефекат ниских концентрација натријум-хлорида. Детаљно је продискутован ефекат апсцисинске киселине на формирање брахицита и тмема, које повећавају шансу за преживљавање неповољних услова. У наредном подпоглављу је интензивно дискутована промена концентрације фенолних једињења и терпеноида, као и липидних једињења, која се често идентификују уз терпеноиде. Направљено је поређење са доступним резултатима добијеним како на бриофитама, тако и на васкуларним биљкама. Јасно су дискутоване улоге појединих метаболита и начин на који они могу допринети толеранцији на стрес изазван натријум-хлоридом. Показане су одређене нове чињенице на основу којих су изведени закључци о улози апсцисинске киселине на повећану или смањену синтезу и акумулацију, што је додатно упоређивано са резултатима добијеним у хистохемијским анализама. Даље је дискутован антиоксидативни потенцијал испитиваних врста маховина, са посебим освртом на улогу неензимске компоненте и могућих начина на који се биљке боре са оксидативним стресом. Детаљно су продискутовани резултати добијени квантификацијом шећера и шећерних алкохола, при чему су највише објашњавани начини синтезе мохосахарида и дисахарида или деградације сложенијих шећера и њихова потенцијална улога у одбрани од стреса изазваног натријум-хлоридом. Посебна пажња је посвећена специфичним шећерима који су наведени у литератури. На крају, продукција слободних радикала је описана и резултати су упоређени са доступним подацима из литературе. Детаљно су размотрени могући механизми настанка или уклањања хидроксил и аскорбил радикала. У овом делу се претпоставља активност ензимске компоненте, као и евентуална локализација продукције радикала у ћелијама.

У поглављу **Закључци** прецизно су наведени закључци до којих се дошло на основу резултата приказаних у овој докторској дисертацији. Утврђено је да испитиване врсте поседују изванредан степен толеранције на стрес изазван натријум-хлоридом и да се

она остварује укључивањем различитих механизма. У одређеним сегментима постоје извесне сличности између испитиваних врста маховина, док се јасно уочавају и одређене разлике. Егзогена апсцисинска киселина повећава преживљавање бриофита, изазивајући промене на морфолошком нивоу, посебно код брио-халофита. Концентрација фотосинтетичких пигмената, као и садржај секундарних метаболита је карактеристична за врсту. Фенолна једињења се синтетишу и акумулирају претежно у цитоплазми ћелија протонеме и филоида услед деловања натријум-хлорида, док апсцисинска киселина утиче на транспозицију фенолних једињења у ћелијске зидове и на њихово задебљавање. Код фунароидних маховина доминантно је присутна р-кумаринска киселина, док се код врсте *H. heimii* не може детектовати њено присуство, већ су доминантни флавоноиди. Поред фенолних једињења терпеноиди су компонента заступљена у великој мери код брио-халофита и промена њихове концентрације је *species*-специфична услед деловања натријум-хлорида. Апсцисинска киселина доводи до повећања терпеноида код фунароидних маховина, док утиче на смањење код *H. heimii*. Шећери су присутни у великој мери код све три испитиване врсте и претежно се детектују у цитоплазми и ћелијском зиду. Као специфичан шећер чија се концентрација повећава *species*-специфично код брио-халофита је изомалтоза. Испитиване бриофите се одликују високим антиоксидативним капацитетом. Додатно, код брио-халофита се продукција хидроксил радикала одржава на ниском нивоу, за разлику од модел врсте *P. patens*, чак и у присуству екстремно високих концентрација натријум-хлорида. Апсцисинска киселина утиче на повећање продукције хидроксил радикала и појаву аскорбил радикала код брио-халофита.

У оквиру поглавља **Литература** абecedним редом је наведено 376 библиографских јединица. Сви цитати су коришћени на одговарајућим местима у тексту и коректно наведени. Наведена литература се односи на публикације водећих светских часописа у области биљне физиологије и физиологије бриофита.

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

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Ćosić M**, Vujičić M, Sabovljević M & Sabovljević A. 2020. Effects of ABA and NaCl on physiological responses in selected bryophyte species. *Botany* **98(11)**: 639-650. DOI: 10.1139/cjb-2020-0041, **M22**  
<https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/cjb-2020-0041>
2. **Ćosić M**, Vujičić M, Sabovljević M & Sabovljević A. 2020. Effects of salt on selected bryophyte species tested under controlled conditions. *Botanica Serbica* **44(1)**: 27-35. DOI: 10.2298/BOTSERB2001027C, **M23**  
<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=1821-21582001027C#.YSN9szEzZ1s>

## Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Ćosić M**, Vujičić M, Lončarević I, Sabovljević A & Sabovljević M. 2018. Does ABA pretreatment affect ecophysiological status of bryo-halophyte *Entosthodon hungaricus* during salt stress? 3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Biology and 22<sup>nd</sup> SPPS Meeting, Belgrade, Serbia, 9-12.06.2018. Book of Abstracts, p. 56, **M34**

### Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Ефекат апсцисинске киселине у одговору одабраних врста бриофита на стрес изазван натријум-хлоридом“ аутора Марије В. Ћосић, констатујемо да утврђено подудараре текста износи 1%. Овај степен подударности последица је коришћења општих израза неизбежних у испитиваној проблематици или метода коришћених током израде студије. Такође, подудараре је показано код претходно публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. Преклапања по сегментима износе мање од 1%.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, Комисија сматра да извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Марије В. Ћосић, под насловом „Ефекат апсцисинске киселине у одговору одабраних врста бриофита на стрес изазван натријум-хлоридом“.

### Мишљење и предлог Комисије

На основу изложене анализе докторске дисертације **Марије В. Ћосић** Комисија сматра да су сви циљеви истраживања наведени у пријави теме ове дисертације успешно реализовани и добијени резултати приказани и коментарисани на адекватан начин, а у складу са савременом литературом. Резултати добијени током израде ове дисертације представљају оригиналан и значајан научни рад, због чега ова докторска дисертација испуњава све критеријуме прописане стандардима Универзитета у Београду. Кандидаткиња је успела да анализира велику количину добијених података за три испитиване врсте и у закључцима истакне значајне разлике у деловању апсцисинске киселине и натријум-хлорида. Треба истаћи да је кандидаткиња на основу обрађених резултата успешно дала претпоставке о механизмима деловања натријум-хлорида и апсисинске киселине.

Осим тога, у оквиру ове дисертације је по први пут рађена EPR анализа на бриофитама. Стога ова дисертација представља значајан допринос разумевања физиологије стреса код биљака у фундаменталном смислу, са великим потенцијалом за примену добијених резултата у даљим како фундаменталним, тако и апликативним истраживањима.

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидату **Марији В. Ћосић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом: „**Ефекат апсцисинске киселине у одговору одабраних врста бриофита на стрес изазван натријум-хлоридом**”.

#### **КОМИСИЈА:**

У Београду, 10.09.2021. године

---

**др Марко Сабовљевић**, редовни професор,  
Биолошки факултет Универзитета у Београду

---

**др Милорад Вујичић**, доцент,  
Биолошки факултет Универзитета у Београду

---

**др Милош Мојовић**, редовни професор,  
Факултет за физичку хемију Универзитета у Београду