

Биолошки факултет
Број захтева: 33/164-1
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: **Јелена Д. Милојевић**

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

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Експресија гена за рибозом-инактивирајући протеин (*SoRIP2*) као маркер за анализу ембриогеног потенцијала спанаћа (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) *in vitro*“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 25.09.2014. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-4057/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Експресија гена за рибозом-инактивирајући протеин (*SoRIP2*) као маркер за анализу ембриогеног потенцијала спанаћа (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) *in vitro*“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 13.03.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/37- 13.03.2015. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Снежана Здравковић-Кораћ	виши научни сарадник	физиологија биљака	Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
2.	др Јелена Савић	научни сарадник	физиологија биљака	Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
3.	др Анета Сабовљевић	ванредни професор	физиологија и молекуларна биологија биљака	Универзитет у Београду- Биолошки факултет

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

33/164-12.6.2015.

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:

Јелене Милојевић под називом:

„Експресија гена за рибозом-инактивирајући протеин (*SoRIP2*) као маркер за анализу ембрионог потенцијала спанаћа (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) *in vitro*”

Универзитет је дана 25.09.2014. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-4057/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Milojević J, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Dragičević I, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2011) Increased regeneration capacity in spinach lines obtained by *in vitro* self-fertilisation. *Sci Hort* 130:681-690. **M21**

Milojević J, Tubić Lj, Nolić V, Mitić N, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B, Zdravković-Korać S (2012) Hygromycin promotes somatic embryogenesis in spinach. *Plant Cell Tiss Org Cult* 109:573-579. **M21**

Milojević J, Tubić Lj, Pavlović S, Mitić N, Čalić D, Vinterhalter B, Zdravković-Korać S (2012)
Long days promote somatic embryogenesis in spinach. *Sci Horti* 142:32-37. **M21**

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 Снежане Здравковић-Кораћ и др Јелене Савић о урађеној докторској дисертацији **Јелене Д. Милојевић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, под насловом **„Експресија гена за рибозом-инактивирајући протеин (*SoRIP2*) као маркер за анализу ембриогеног потенцијала спанаћа (*Spinacia oleracea* L. cv. *Matador*) *in vitro*“** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

Др **Снежана Здравковић-Кораћ**, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

Др **Јелена Савић**, научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

Др **Анета Сабовљевић**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Јелене Д. Милојевић** под насловом **„Експресија гена за рибозом-инактивирајући протеин (*SoRIP2*) као маркер за анализу ембриогеног потенцијала спанаћа (*Spinacia oleracea* L. cv. *Matador*) *in vitro*“** је урађена у Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања Универзитета у Београду, у оквиру пројекта основних истраживања „Биотехнологија *in vitro* – гајене, лековите и угрожене биљне врсте” (бр. 173015,

2011-2015) Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Дисертација је написана на 206 страна и садржи: 17 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** (48 стр.), **Циљеве рада** (2 стр.), **Материјал и методе** (17 стр.), **Резултате** (36 стр.), **Дискусију** (26 стр.), **Закључке** (3 стр.), **Литературу** (52 стр. са 540 референци), и прилоге (Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу) на укупно 5 страна. Дисертација садржи 4 схеме, 6 слика, 8 табела и 57 графика.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **Увод** детаљно су приказана најсавременија сазнања непосредно везана за предмет истраживања докторске дисертације. Најпре је дат концизан преглед свих путева морфогенезе биљака *in vitro*, а затим је врло детаљно описан процес соматске ембриогенезе; наглашене су сличности и разлике између соматске и зиготске ембриогенезе и описан је механизам индукције соматске ембриогенезе. Истакнута је улога гена укључених у најранију фазу индукције овог процеса и описани су молекуларни механизми контроле њихове експресије под утицајем ендогених и егзогених фактора. Дат је преглед литературе о примени ових гена као молекуларних маркера за рану детекцију соматских ембриона и могућност повећања ефикасности процеса соматске ембриогенезе њиховом ектопичном експресијом. Затим је детаљно изложен утицај најзначајнијих фактора који утичу на ефикасност процеса соматске ембриогенезе, са посебним освртом на интеракцију светлости, ауксина и гиберелина, чије се синергистичко деловање показало као изузетно значајно за индукцију соматске ембриогенезе спанаћа у експериментима обухваћеним овом дисертацијом. У наставку је дат детаљан преглед досадашњих достигнућа у регенерацији спанаћа процесима *de novo* органогенезе и соматске ембриогенезе, као и анализа фактора који утичу на ефикасност ових процеса. Изложена је проблематика ниског регенеративног капацитета сорте Матадор, која је од изузетног локалног значаја као једина сорта

спанаћа у понуди домаћих произвођача семена. На крају поглавља Увод, детаљно је описана функција гена за рибозом-инактивирајуће протеине спанаћа (*SoRIP*), који су тестирани као молекуларни маркери за анализу ембриогеног потенцијала у овој докторској дисертацији. Описани су узводни регулаторни елементи ових гена, временска и просторна контрола његове експресије и локализација *SoRIP* протеина у свим органима током онтогенезе биљака спанаћа.

У поглављу **Циљеви рада** наведена је проблематика обрађена овом докторском дисертацијом – објашњење ниског регенеративног потенцијала спанаћа сорте Матадор и испитивање услова под којима се он може повећати. У ту сврху, први циљ истраживања је био одређивање регенеративног потенцијала насумично изабраних јединки ове сорте и њиховог потомства добијеног самооплођењем *in vitro* употребом медијума одређеног састава и типа експлантата који су се у литератури показали као најефикаснији за индукцију регенерације других сорти спанаћа. С циљем додатног повећања ефикасности процеса соматске ембриогенезе, линије са високим и стабилним регенеративним потенцијалом су коришћене за испитивање утицаја интеракције ауксина, светлости и гиберелина на процес соматске ембриогенезе. Пошто је познато да ембриогени потенцијал спанаћа опада током времена култивације, веома важан циљ истраживања у оквиру ове дисертације је био успостављање модел-система за рану и прецизну квантификацију ембриогеног потенцијала праћењем експресије маркер-гена. У складу с тим, анализирана је експресија гена за рибозом-инактивирајуће протеине (*SoRIP*), за које је у литератури показано да коинцидирају са појавом соматских ембриона. Циљ ових експеримената је био тестирање базичне експресије ових гена у експлантатима (фрагментима коренова спанаћа) под неиндуктивним условима и у изолованим соматским ембрионима на различитим ступњевима развића, да би се установило да ли се експресија ових гена може користити за рану детекцију јединки са високим регенеративним потенцијалом. Пошто је познато да гиберелини имају изузетан значај за индукцију *de novo* органогенезе и соматске ембриогенезе спанаћа, циљ ове тезе је био и квантификација експресије кључних гена за метаболизам гиберелина и тестирање корелације њихове експресије са ембриогеним потенцијалом изабраних линија спанаћа.

У поглављу **Материјал и методе** описано је култивисање спанаћа у условима *in vitro*, процедуре за индукцију регенерације из апикалних фрагмената латералних коренова спанаћа и успостављање колекције линија спанаћа са високим и стабилним регенеративним потенцијалом, као и услови под којима је анализиран утицај светлости и гиберелина на процес соматске ембриогенезе спанаћа. У даљем тексту су детаљно описане процедуре за изолацију РНК, реверзну транскрипцију РНК (RT-PCR) и одређивање нивоа експресије гена методом квантитативног RT-PCR (qRT-PCR). Сви протоколи су детаљно приказани, што омогућава потпуну репродуцибилност експеримената. Статистичка значајност анализираних фактора је тестирана анализом варијансе, а средње вредности третмана су упоређене LSD *post-hoc* тестом.

У оквиру поглавља **Резултати** приказани су добијени резултати, у складу са постављеним циљевима докторске дисертације. Применом протокола који је био ефикасан за индукцију регенерације других сорти спанаћа, код сорте Матадор је добијен релативно низак ембриогени одговор. Констатовано је да су јединке са високим ембриогеним потенцијалом врло ретке међу јединкама сорте Матадор. У дисертацији је наглашено да уочена висока варијабилност ембриогеног потенцијала насумично изабраних јединки указује на изузетно значајан утицај генотипа на експресију регенеративног потенцијала спанаћа.

У овој дисертацији је развијен ефикасан и оригиналан приступ за стварање колекције генотипова (линија или јединки) драгоцених за студирање утицаја генетичког фактора на регенеративни потенцијал спанаћа. Регенеративни потенцијал јединки добијених самооплођењем је такође био варијабилан. Код неких линија ембриогени потенцијал је из генерације у генерацију растао, да би после 3-4 циклуса самооплођења биле добијене јединке са изузетно високим регенеративним потенцијалом, какав није запажен у природним популацијама ни после опсежнијих истраживања. Експлантати изоловани са ових јединки су регенерисали соматске ембрионе 4-8 недеља раније од већине насумично изабраних јединки. Посебно је значајно и то што су биљке које су се развиле из соматских ембриона имале сличан регенеративни потенцијал клијанцу из чијих коренова су индуковане. Захваљујући томе, била је доступна велика количина биљног материјала за студирање утицаја регулатора растења и фактора средине на

регенеративни потенцијал спанаћа. Резултати добијени у овој дисертацији недвосмислено потврђују да генотип има највећи утицај на регенеративни потенцијал спанаћа. Да утицај светлости и гиберелина на регенеративни потенцијал не би био маскиран ефектом генотипа, за истраживања је коришћен генетички идентичан материјал, односно за све третмане су коришћени експлантати изоловани са биљака истих линија.

У дисертацији је демонстриран изузетно значајан ефекат светлости и гиберелина на процес соматске ембриогенезе спанаћа. У условима дугог дана (ДД), при фотопериоду од 16h светлости/8h мрака, све тестиране линије су показале већи ембриогени потенцијал него у условима кратког дана (КД), при фотопериоду од 8h светлости/16h мрака, а неке линије су регенерисале само у условима ДД. Све линије су раније регенерисале у условима ДД. Интензитет светлости је такође значајно утицао на регенеративни потенцијал спанаћа. Ефикасност процеса соматске ембриогенезе је била нижа под субоптималним и супраоптималним условима осветљења, а тада је и процес соматске ембриогенезе био одложен у односу на оптималне услове.

Осим ауксина, који је био апсолутно есенцијалан за индукцију пролиферације експлантата и формирање соматских ембриона, па је у свим експериментима био присутан у медијуму у непромењеној концентрацији, гиберелини су такође били неопходни за индукцију соматске ембриогенезе спанаћа. У одсуству гиберелина само су експлантати малог броја линија регенерисали соматске ембрионе, а њихов ембриогени потенцијал је био занемарљив у мраку. Од тестираних гиберелина, GA_3 је имао израженији ефекат на соматску ембриогенезу од GA_1 .

У дисертацији је истакнут синергистички ефекат светлости, ауксина и гиберелина на процес соматске ембриогенезе. Јасно је показано да се пуни ембриогени потенцијал датог генотипа може експримирати само у присуству сва три фактора, у оквиру њиховог оптималног опсега деловања. Изостављање било ког фактора или његово присуство на субоптималном или супраоптималном нивоу је узроковало драматично смањење ефикасности процеса соматске ембриогенезе.

Процена ембриогеног потенцијала класичном квантификацијом соматских ембриона помоћу стереомикроскопа је врло дуготрајан процес, а неопходно је и да индукциони третман траје 12 недеља, јер највећи број јединки почиње да регенерише тек после 6-8 недеља од почетка третмана. Како је стабилност ембриогеног потенцијала биљног материјала краткотрајна, ове линије се могу само кратко користити за истраживања. Због тога је у овој дисертацији развијен модел-систем за рану и прецизну квантификацију ембриогеног потенцијала праћењем експресије гена који кодира рибозом-инактивирајући протеин спанаћа. Анализирана је експресија два гена, *SoRIP1* и *SoRIP2*, али је амплификација *SoRIP1* гена била неспецифична и он је искључен из даље анализе. Да би се утврдила подобност експресије *SoRIP2* за квантификацију ембриогеног потенцијала, његова експресија је анализирана у експлантатима под неиндуктивним условима и соматским ембрионима на различитим ступњевима развића. Демонстрирана је ниска базална експресија *SoRIP2* у експлантатима коренова под неиндуктивним условима, њен нагли скок у соматским ембрионима на глобуларном ступњу развића, а затим нагли пад у соматским ембрионима на котиледонарном ступњу развића. Осим тога, показан је висок степен позитивне корелације између експресије *SoRIP2* после 4 недеље индукционог третмана и конвенционалне процене ембриогеног одговора после 12 недеља овог третмана. Варирање регенеративног потенцијала код различитих индивидуа и у условима ДД и КД је потврђено анализом експресије *SoRIP2*, чиме су верификовани сви закључци донети на основу конвенционалне квантификације.

У овој дисертацији је демонстрирано да изоловани апикални фрагменти латералних коренова спанаћа имају способност перцепције светлости и аутономне биосинтезе гиберелина и после 4 недеље гајења на медијуму без егзогених регулатора растења. Анализом експресије кључних гена за анаболизам (*SoGA20-ox1* и *SoGA3-ox1*) и катаболизам (*SoGA2-ox1*) гиберелина у експлантатима коренова под индуктивним условима, јасно је демонстрирано да физиолошки услови у којима долази до супресије гена за анаболизам и експресије гена за катаболизам гиберелина погодују индукцији процеса соматске ембриогенезе. У складу с тим, истакнуто је да је код линија спанаћа са вишим ембриогеним потенцијалом уочена израженија супресија гена за анаболизам гиберелина.

Претходно уочен синергизам у деловању ауксина, светлости и егзогених гибберелина на индукцију соматске ембриогенезе спанаћа је објашњен покретањем катаболизма гибберелина.

У поглављу **Дискусија** добијени резултати су детаљно објашњени и упоређени са досадашњим сазнањима из ове области физиологије биљака. Најпре су дискутовани резултати који се односе на регенеративни потенцијал експлантата изолованих са насумично изабраних јединки. Истакнуто је да су употребом истог протокола индукована два различита пута регенерације *in vitro*, соматска ембриогенеза у овој дисертацији и *de novo* органогенеза пупољака код две сорте спанаћа у другој студији. Разлике између ових резултата су дискутоване у складу са широко прихваћеним ставом да експресија регенеративног потенцијала зависи од физиолошког стања биљног материјала и његове генетичке основе. Констатовано је да сорта Матадор има низак ембриогени потенцијал и објашњен је његов могући узрок. У наставку дискусије су разматране предности самооплођења у условима *in vitro* за добијање колекције линија са различитим ембриогеним потенцијалом. Спанаћ је доминантно диецка биљка, са око 10% монечких биљака у популацији, које се могу самоопрашити. Код спанаћа није могуће добити чисте линије јер су после неколико циклуса самооплођења све биљке у потомству женске. У условима *in vitro*, експресија пола спанаћа је нестабилнија него у природним условима, па је честа појава андромонецизма и гиномонецизма, односно формирања хермафродитних цветова на оригинално мушким, односно женским биљкама. Тиме је значајно повећана вероватноћа самооплођења драгоцених генотипова. Осим тога, у условима *in vitro* је запажено скраћење генерацијског циклуса. Захваљујући наведеном, током израде ове докторске дисертације формирана је значајна колекција драгоцених генотипова.

Самооплођењем и селекцијом у овој дисертацији су добијене линије са изузетно високим регенеративним потенцијалом, до 50 пута већим од родитељског. Овај резултат је протумачен у светлу сличних примера из литературе, попут мутиране линије Јермалонг *Medicago truncatula*, која је имала 500 пута већи ембриогени потенцијал у односу на дивљу линију Јермалонг. Иако генетичка основа ембриогеног потенцијала још увек није разјашњена, из литературе је јасно да је то квантитативна особина, а повећање ембриогеног

потенцијала сорте Матадор током неколико циклуса самооплођења је објашњено у овој дисертацији као последица повећања хомозиготности гена који детерминишу ову особину.

У даљем тексту Дискусије је детаљно образложен значај студирања утицаја генотипа на ембриогени потенцијал на нивоу индивидуе. С обзиром да фреквенца регенерације соматских ембриона из експлантата различитих индивидуа варира у опсегу 0-100%, јасно је да насумично узорковање јединки за експеримент може значајно утицати на резултат и да је тада за поуздан резултат потребан велики узорак. Како је истакнуто у дисертацији, велика варијабилност резултата која је типична за технике културе биљних ткива и органа се бар делимично може објаснити начином узорковања биљног материјала. У дискусији је истакнут пример из литературе који се односи на утицај светлости на органогени потенцијал спанаћа, у коме су као последица насумичног узорковања добијени неконзистентни резултати и ниска статистичка значајност између третмана. Насупрот томе, у овој дисертацији је, елиминацијом утицаја генетичког фактора, недвосмислено показан позитиван ефекат ДД тремана на регенеративни потенцијал сорте Матадор. Ови резултати су у складу са великим бројем података добијених код других биљних врста. Резултати ове дисертације су показали изузетан значај гиберелина за индукцију регенерације и то је у складу са скоро свим студијама које су урађене на спанаћу.

У овој дисертацији, ген *SoRIP2* се показао као добар маркер за соматску ембриогенезу, за разлику од гена *SoRIP1*. Ови резултати су у нескладу са резултатима добијеним код две јапанске сорте спанаћа из којих су клонирани ови гени. Ген *SoRIP1* је сматран погоднијим маркером за соматску ембриогенезу, имајући у виду његове регулаторне елементе и просторну и временску експресију. Међутим, у овој дисертацији је показана неспецифична амплификација овог гена. Пошто је амплификација гена *SoRIP2* била специфична и његова експресија је коинцидирала са раном фазом соматске ембриогенезе, у овој дисертацији је демонстрирано да се ген *SoRIP2* може користити као маркер за соматску ембриогенезу. У Дискусији је наглашено да просторна и временска експресија *SoRIP2* одговара експресији гена *LEAFY COTYLEDON*, који су централни регулатори соматске ембриогенезе. Истакнута је предност квантификације

ембриогеног потенцијала експресијом *SoRIP2*, јер је тим убрзаним поступком могуће обавити опсежнија истраживања, док је регенеративни потенцијал добијених линија стабилан.

У даљем тексту Дискусије коментарисана је ткивна специфичност експресије кључних гена за метаболизам гибберелина код других биљних врста, попут арабидопсиса. Док код арабидопсиса ове гене кодирају фамилије гена, чији чланови имају различиту ткивну специфичност експресије, код спанаћа је клониран само по један ген за *GA20-ox* и *GA3-ox* и три гена за *GA2-ox*. Мада је експресија ових гена проучавана у различитим органима спанаћа, у литератури нема података да се ови гени експримирају у корену спанаћа. У овој дисертацији је први пут демонстрирано да се гени *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* и *SoGA2-ox1* експримирају у корену спанаћа. Осим тога, први пут је показано да се ови гени експримирају у изолованим фрагментима коренова, као и да изоловани фрагменти имају способност перцепције светлости и биосинтезе гибберелина у одсуству егзогених регулатора растења. Стимулација катаболизма гибберелина детектована у овој дисертацији је била у корелацији са индукцијом соматске ембриогенезе. У дисертацији је дискутовано да је код различитих биљних врста стимулација експресије гена *GA2-ox* за катаболизам биоактивних гибберелина била у корелацији са повећаним ембриогеним капацитетом.

Синергизам у деловању светлости, ауксина и гибберелина, демонстриран у овој дисертацији, је објашњен интеракцијом ових фактора; светлост индукује биосинтезу ауксина и гибберелина; ауксини стимулишу биосинтезу гибберелина, а гибберелини стимулишу поларни транспорт ауксина, који увек претходи важним догађајима у биљној ћелији, укључујући прелазак из вегетативног на ембрионално развиће.

У поглављу **Закључци** изведени су концизни закључци на основу резултата добијених у докторској дисертацији. Низак ембриогени потенцијал сорте спанаћа Матадор је објашњен чињеницом да су јединке са високим ембриогеним потенцијалом ретке, али да се полазећи од јединки са умереним ембриогеним потенцијалом, кроз 3-4 циклуса самооплођења, могу добити јединке са изузетно високим ембриогеним потенцијалом. Осим утицаја генотипа, који је несумњиво најзначајнији фактор, ауксини, светлост и гибберелини су од изузетног значаја за

индукцију процеса соматске ембриогенезе спанаћа. Одсуство бло ког од набројаних фактора, или његово присуство на субоптималном или супраоптималном нивоу, потпуно инхибира процес соматске ембриогенезе или драстично смањује његову ефикасност. Анализа експресије гена *SoRIP2*, која показује нагло повећање у соматским ембрионима током глобуларног ступња развића, довела је до закључка да се овај ген може користити као маркер за рану и поуздану квантификацију ембриогеног одговора.

У поглављу **Литература** наведено је 540 библиографских јединица, од којих је већина публикована у водећим часописима из области биологије биљака. Актуелност истраживања приказаних у овој докторској дисертацији најбоље илуструје чињеница да је 22% публикација коришћених током израде ове докторске дисертације публиковано у последњих 5 година.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

1. **Milojević J**, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Dragičević I, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2011) Increased regeneration capacity in spinach lines obtained by *in vitro* self-fertilisation. *Sci Hortic* 130:681-690. **M21**
2. **Milojević J**, Tubić Lj, Nolić V, Mitić N, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B, Zdravković-Korać S (2012) Hygromycin promotes somatic embryogenesis in spinach. *Plant Cell Tiss Org Cult* 109:573-579. **M21**
3. **Milojević J**, Tubić Lj, Pavlović S, Mitić N, Čalić D, Vinterhalter B, Zdravković-Korać S (2012) Long days promote somatic embryogenesis in spinach. *Sci Hortic* 142:32-37. **M21**

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Milojević J**, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2010) Impact of photoperiod on spinach regeneration capacity. Proceedings of the 3rd International Symposium “New Researches in Biotechnology” SimpBTH2010. Faculty of Biotechnology (USAMV) and Center for Microbial Biotechnology (BIOTECHGEN) Bucharest, Romania, pp. 55-60. **M33**
2. **Milojević J**, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Čalić-Dragosavac D, Dragičević I, Vinterhalter B (2010) High individual variation in regeneration response of spinach. Proceedings of the 3rd International Symposium “New Researches in Biotechnology” SimpBTH2010. Faculty of Biotechnology (USAMV) and Center for Microbial Biotechnology (BIOTECHGEN) Bucharest, Romania, pp. 46-54. **M33**

3. Zdravković-Korać S, **Milojević J**, Tubić Lj, Mitić N, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2010) Hygromycin stimulates somatic embryogenesis from root sections of spinach. Proceedings of the 3rd International Symposium “New Researches in Biotechnology” SimpBTH2010. Faculty of Biotechnology (USAMV) and Center for Microbial Biotechnology (BIOTECHGEN) Bucharest, Romania, pp. 112-118. **M33**
4. **Milojević J**, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2010) Impact of photoperiod on spinach regeneration capacity. 3rd International Symposium of Biotechnology. 18-19th November, Bucharest, Romania, Book of abstracts, p. 42. **M34**
5. **Milojević J**, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Čalić-Dragosavac D, Dragičević I, Vinterhalter B (2010) High individual variation in regeneration response of spinach. 3rd International Symposium of Biotechnology. 18-19th November, Bucharest, Romania, Book of abstracts, p. 41. **M34**
6. Zdravković-Korać S, **Milojević J**, Tubić Lj, Mitić N, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2010) Hygromycin stimulates somatic embryogenesis from root sections of spinach. 3rd International Symposium of Biotechnology. 18-19th November, Bucharest, Romania, Book of abstracts, p. 54. **M34**
7. **Milojević J**, Tubić Lj, Todorović S, Mitić N, Vinterhalter B, Zdravković-Korać S (2013) Synergistic effect of light and gibberellins on induction of somatic embryogenesis in spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador). 1st International Conference on Plant Biology and 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Subotica, Serbia, 4-7th June, Book of abstracts, p. 26. **M34**
8. **Milojević J**, Savić J, Dragičević M, Tubić Lj, Devrnja N, Zdravković-Korać S (2013) *SoRIP2* gene might be a good marker for somatic embryogenesis in spinach. 1st International Conference on Plant Biology and 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Subotica, Serbia, 4-7th June, Book of abstracts, p. 24. **M34**

Конгресна саопштења на скуповима националног значаја

1. **Milojević J**, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Čalić-Dragosavac D, Dragičević I, Vinterhalter B (2009) Selekcija visoko regenerativnih linija spanaća (*Spinacia oleracea* L.) rekalitrantne sorte Matador. XVIII Simpozijum Društva za fiziologiju biljaka Srbije, Vršac, 25-27. maj, str. 52. **M64**
2. **Milojević J**, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2011) Photoperiod impact on somatic embryogenesis in spinach. XIX Symposium of the Serbian Plant Physiology Society. Banja Vrujci 13-15th June, Book of abstracts, p. 44. **M64**
3. **Milojević J**, Zdravković-Korać S, Mitić N, Tubić Lj, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2011) Somatic embryogenesis in spinach is stimulated by low dose of hygromycin. XIX Symposium of the Serbian Plant Physiology Society. Banja Vrujci 13-15th June, Book of abstracts, p. 72. **M64**

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Јелене Д. Милојевић**, под насловом „**Експресија гена за рибозом-инактивирајући протеин (SoRIP2) као маркер за анализу ембриогеног потенцијала спанаћа (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) *in vitro***“ је оригиналан и значајан допринос разумевању индукције процеса соматске ембриогенезе ове биљне врсте. Осим фундаменталног доприноса области физиологије биљака, овај рад има и апликативни потенцијал у оплемењивању ове важне сорте спанаћа савременим методама генетичког инжењерства. У дисертацији су дефинисани фактори који имају одлучујући утицај на ефикасност процеса соматске ембриогенезе. Оригиналним приступом је процењен индивидуални утицај сваког фактора и њихове интеракције на овај процес. Осим тога, развијен је практичан и врло ефикасан модел-систем за рану квантификацију ембриогеног потенцијала. Резултати ове дисертације су одлична основа за даље истраживање молекуларних механизма који леже у основи процеса соматске ембриогенезе.

Комисија констатује да су постављени циљеви ове тезе у потпуности реализовани савременим методама, а резултати јасно представљени и адекватно илустровани. Кандидаткиња је током израде докторске дисертације развила изузетну способност планирања експеримената, анализе добијених резултата и њиховог тумачења у складу са актуелном светском научном литературом. Иако се резултати ове дисертације односе на побољшање регенеративног потенцијала сорте која има изузетан значај за домаће тржиште, али није у великој мери заступљена на светском тржишту, добијени резултати имају шири значај. Најбоља илустрација за то је чињеница да је др Edwin Herman, уредник угледног издања „Agricell Report“, у прегледу штампе издвојио два рада из докторске дисертације Јелене Милојевић као значајан допринос области културе биљних ћелија, ткива и органа. Осим тога, за резултате из докторске дисертације кандидаткиња је награђена за саопштење на симпозијуму Друштва за физиологију биљака Србије у Вршцу 2009. године. Публикације из тезе кандидаткиње су до сада цитиране 8 пута у часописима 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 кандидаткиње **Јелене Д. Милојевић**, истраживача сарадника, под насловом „**Експресија гена за рибозом-инактивирајући протеин (SoRIP2) као маркер за анализу ембриогеног потенцијала спанаћа (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) *in vitro***“.

КОМИСИЈА:

Др Снежана Здравковић-Кораћ
виши научни сарадник Института за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“
Универзитета у Београду

Др Јелена Савић
научни сарадник Института за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“
Универзитета у Београду

Др Анета Сабовљевић
ванредни професор Биолошког факултета
Универзитета у Београду

У Београду, 15.04.2015. године