

## ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ  
кандидата Ружице Ждеро Павловић

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>	
1.	Датум и орган који је именовео комисију: 13.07.2017. Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду, XXXI седница
2.	Састав комисије са знаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) <b>др Неда Мимица-Дукић</b>, редовни професор, ужа научна област Биохемија, 01.08.2003. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду – председник</li> <li>(2) <b>др Борис Поповић</b>, ванредни професор, ужа научна област Хемија и биохемија, 12.03.2014. године, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду- ментор</li> <li>(3) <b>др Ивана Беара</b>, ванредни професор, ужа научна област Биохемија, 01.03.2016., Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду-ментор</li> <li>(4) <b>др Саша Орловић</b>, редовни професор, Хортикултура и пејзажна архитектура, 03.06.2010. Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, научни саветник, ужа научна област Генетика и оплемењивање шумског дрвећа, 11.05.2005, Институт за низијско шумарство и животну средину, Нови Сад – члан</li> </ol>
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>	
1.	Име, име једног родитеља, презиме: <b>Ружица, Златко, Ждеро Павловић</b>
2.	Датум рођења, општина, држава: 04.06.1987. Нови Сад, Р. Србија
3.	Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, Биохемија, Мастер биохемичар
4.	Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2011. година, Докторске академске студије биохемије
5.	Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: /
6.	Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: /
<b>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b>	
„Биохемијски механизми отпорности клонова тополе ( <i>Populus spp.</i> ) на водни стрес“	

#### IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.

Докторска дисертација „Биохемијски механизми отпорности клонова тополе (*Populus* spp.) на водни стрес“, кандидата Ружице Ждеро Павловић је написана на српском језику, латиничним писмом, са кључном документацијском информацијом на српском и енглеском језику и једним поглављем (Summary) на енглеском језику. Дисертација је написана на 202 страна од којих је 164 у штампаној верзији, а 38 страна у Додатном материјалу приложеном на ЦД-у. Дисертација садржи: 80 слика, 21 табелу (9 у Додатном материјалу на ЦД-у), 9 графикона (9 у Додатном материјалу на ЦД-у), 376 литературних навода и 22 хистограма. Текст је подељен у осам поглавља (УВОД–3 стране, ОПШТИ ДЕО–45 страна, ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО– 19 страна, РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА– 54 стране, ЗАКЉУЧАК– 5 страна, SUMMARY– 2 стране, ЛИТЕРАТУРА– 35 страна, ПРИЛОГ- Додатни материјал на ЦД-у).

Поред наведеног дисертација садржи захвалницу, садржај и списак скраћеница, а након литературних навода следи биографија кандидаткиње и кључна документацијска информација на српском и енглеском језику.

#### V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

- На почетку докторске дисертације налази се **САДРЖАЈ** (3 стране) који даје преглед основних целина дисертације (поглавља и потпоглавља) ради брзе претраге дисертације, и јасног прегледа свих делова тезе.
- **УВОД** - У овом делу дају се уводна разматрања, дефинише се проблем и предмет истраживања уз навођење кључних аспеката које ће се разматрати у дисертацији. На јасан и концизан начин указано је читаоцу да се биљке због климатских промена суочавају са новим условима средине на које нису адаптиране, те је опстанак биљака у оваквим условима један од актуелних проблема са којима се суочавају научници широм света. Истакнута је потреба селекције пољопривредних култура и генотипова дрвећа са већом толеранцијом на штетне услове, што је у складу са предметом испитивања ове дисертације. Истовремено је наглашено да је толерантност биљака према оксидативном стресу изазваним недостатком воде, врло комплексна особина контролисана великим бројем механизма од ћелијског нивоа до нивоа биљке као целине. Дефинисани циљеви истраживања су били:
  - ✓ испитивање утицаја водног стреса (различитих концентрација полиетилен гликола 6000 у хидропонима и култури ткива) на антиоксидантне осовине, параметре оксидативног стреса, фенолни метаболизам као и метаболизам пролина и садржај глицин-бетаина у различитим органима тополе,
  - ✓ одабир клона тополе најотпорнијег на деловање водног и оксидативног стреса на основу анализе антиоксидантног статуса тополе, и
  - ✓ дефинисање параметра који представља најбољи индикатор отпорности тополе на сушу.
- **ОПШТИ ДЕО** дисертације (45 страна) подељен је на 3 потпоглавља. Прво потпоглавље (*Проблем водног стреса*) осврће се на сушу као један од најважнијих абиотичких фактора који ограничава раст, развој и продуктивност биљака, доводи до промена у метаболизму биљака као и до појаве оксидативног стреса и настајања велике количине слободних радикала. У оквиру овог потпоглавља су описани механизми адаптације биљака на сушу, затим метаболизам пролина и глицин-бетаина, једињења која доприносе осмотском прилагођавању. У другом потпоглављу (*Биљке и оксидативни стрес*) дефинисан је појам оксидативног стреса, реактивне врсте кисеоника и азота, појава липидне пероксидације и оксидације протеина. Такође, у оквиру овог поглавља је описана биолошка улога азот-оксида као и најзначајнији ензимски и неензимски антиоксиданати и флуоресцентне методе детекције. Треће потпоглавље (*Особине рода Populus*) описује род *Populus* L., тополу као модел дрво, привредни значај и фенолна једињења присутна у врстама *Populus*.
- **ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО** (19 страна) обухвата детаљан опис експеримената у култури

тквива и у хидропонима као и начин припреме екстракта листа и корена топола. Описане су методе за одређивање активности антиоксидантних ензима (супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), гвајакол-пероксидаза (GPx), глутатион-пероксидаза (GSH-Px), аскорбат-пероксидаза (ASC-Px), глутатион-редуктаза (GR)), ензима укључених у метаболизам фенола (фенилаланинамонијум-лијазе (PAL) и полифенол-оксидазе (PPO)), садржаја растворљивих протеина, количине редукованог глутатиона, количине малонилдиалдехида (МДА), интензитета оксидације протеина и количине водоник-пероксида. Описана је метода за ЕСР спектроскопско одређивање хидроксил радикала, затим методе за одређивање садржаја пигмената, пролина и глицин-бетаина као и активности ензима пролин-дехидрогеназе. Затим су описане методе одређивања нивоа реактивних кисеоничних и азотних врста, и вијабилности хелија помоћу флуоресцентног микроскопа. У оквиру овог поглавља дат је детаљан опис одређивања фенолног профила листа и корена тополе помоћу течне хроматографије под притиском (HPLC), метода којима се утврђује способност екстракта да неутрализују радикалске врсте (DPPH и супероксид анјон радикал), FRAP методе као и опис тестова који одређују садржај укупних фенола, флавоноида и проантоцијанидина. За статистичку обраду експерименталних резултата коришћени су савремени софтверски програми, а резултати су обрађени на адекватан и валидан начин.

- У поглављу **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА** (54 стране) приказани су и дискутовани добијени резултати, подељени у три подпоглавља. Резултати истраживања су приказани јасно, уз концизна текстуална тумачења и илустративне слике и хистограме који презентују делове истраживања. У целини посматрано, обимни резултати ове дисертације су веома прегледно и на правилан начин приказани, а такође студиозно анализирани и интерпретирани. У овом поглављу детаљно су поређени резултати истраживања са резултатима других аутора, који су се бавили сличном проблематиком. Наводи литературе су детаљно проучени и има их у довољном броју. У првом делу анализиран је биохемијски одговор културе тквива клона М-1 на водни стрес изазван полиетилен гликолом 6000. Приказани су резултати мерења активности антиоксидантних ензима (SOD, CAT, GSH-Px, GPx, GR), ензима укључених у метаболизам фенола (PAL и PPO), количине редукованог глутатиона, количине МДА, интензитета оксидације протеина и количине водоник-пероксида, затим садржаја глицин-бетаина и пролина, као и активности ензима пролин-дехидрогеназе. У оквиру овог потпоглавља приказани су резултати одређивања нивоа реактивних кисеоничних и азотних врста, и вијабилности хелија помоћу флуоресцентног микроскопа. Други и трећи део овог поглавља односи се на резултате експеримента у хидропонима. Други део чине резултати и дискусија утицаја водног стреса изазваног са полиетилен гликолом (ПЕГ) 6000 на антиоксидантни систем, параметре оксидативног стреса, метаболизам пролина и глицин-бетаина у листу и корену одабраних клонова тополе. У трећем делу су приказани резултати испитивања фенолног профила и антиоксидантног капацитета листа и корена одабраних клонова тополе.
- У **ЗАКЉУЧКУ** (4 страна) су сумирани и истакнути најзначајнији резултати дисертације.
- У поглављу **SUMMARY** (2 стране) дат је кратак извод дисертације са сумираним и истакнутим најзначајнијим резултатима на енглеском језику.
- **ЛИТЕРАТУРА** (35 страна) цитирана у овој докторској тези обухвата 376 библиографских јединица и указује на значај и актуелност остварених истраживања.
- У **ПРИЛОГУ** су приказане калибрационе криве, графикони и спектри који допуњују поглавље **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА**.

ПРИЛОГ се налази на крају дисертације као ДОДАТНИ МАТЕРИЈАЛ у електронској форми на ЦД-у и не постоји у штампаној верзији докторске дисертације.

## **VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

**Радови објављени у међународним часописима:**

1. Popović, M. B., Štajner, D., **Ždero Pavlović, R.**, Tumbas Šaponjac, V., Čanadanović Brunet, J., Orlović, S. (2016): Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 105: 242-250. (M21)
2. Popović, B.M., Štajner, D., **Ždero-Pavlović, R.**, Tari, I., Csiszár, J., Gallé, Á., Galović, V., Trudić, B., Orlović, S. (2017): Biochemical response of hybrid black poplar tissue culture (*Populus × canadensis*) on water stress. *Journal of plant research*, 130(3): 559-570. (M22)

**Саопштења на међународним научним скуповима штампана у целости:**

1. Štajner, D., Popović, M. B., **Ždero Pavlović, R.**, Blagojević, B., Galović, V. (2016): Antioxidative response of poplar tissue culture exposed to PEG 6000. *The 22<sup>th</sup> International Symposium on Analytical and Environmental Problems*, Szeged, Hungary, October 10. 267-269.
2. Štajner, D., Popović, M. B., **Ždero Pavlović, R.**, Pilipović, A. (2014): Activities of antioxidant enzymes in poplar plants during osmotic stress. *The 20<sup>th</sup> International Symposium on Analytical and Environmental Problems*, Szeged, Hungary, September 22. 98-101.

**Саопштења на међународним научним скуповима**

1. Popović, B., Štajner, D., **Ždero Pavlović, R.**, Galović V., Tari, I., Csiszar, J., Blagojević, B. (2015): Detection of RNOS in poplar tissue culture under PEG-induced drought stress, *2<sup>nd</sup> International Conference on Plant Biology and 21<sup>th</sup> Symposium of the Serbian plant physiology society and COST action FA1106 Quality Food Workshop*, Petnica, Serbia, June 17-20. Book of abstracts, 182.

**VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА**

На основу спроведених истраживања утицаја различитих концентracија ПЕГ 6000 на биохемијске параметре клона црне тополе М-1 у *in vitro* култури ткива изведени су следећи закључци:

- Испитивање вијабилности ћелија и нивоа реактивних кисеоничних и азотних врста (*Reactive Nitrogen and Oxygene Species*, RNOS) у условима водног стреса изазваног са ПЕГ 6000 су једноставни и корисни параметри који су показали да се са повећањем интензитета стреса смањује вијабилност ћелија а повећава ниво NO<sup>•</sup> и ONOO<sup>-</sup>.
- Ниво ROS се повећао значајно при 200 mOsm стресу, што је праћено порастом нивоа МДА при истим условима. Карбонил протеини су значајно повећани само при 100 mOsm стресу, док се ниво водоник пероксида смањивао са повећањем интензитета стреса, што указује на комплексну регулацију унутарћелијског нивоа H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при водном стресу.
- У условима водног стреса код испитаног клона активност појединих антиоксидантних ензима се повећава, највише GSH-Px и GPx, али и SOD при 200 mOsm стресу, док се антиоксидантна активност и садржај фенола смањује.
- Од испитаних параметара осмотског стреса, количина пролина се повећала у условима 200 mOsm стреса, док се активност ензима пролин дехидрогеназе, укљученог у катаболизам пролина смањила при датим условима; садржај глицин-бетаина се многоструко повећао са повећањем интензитета стреса.

На основу спроведених истраживања утицаја различитих концентracија ПЕГ 6000 на биохемијске параметре у листу и корену различитих клонова тополе (М-1, Б-229 и ПЕ19/66) у хидропонском експерименту изведени су следећи закључци:

- Примењени третмани ПЕГ 6000 (100 mOsm и 200 mOsm) у узорцима корена сва три клона тополе нису довели до значајних повећања активности антиоксидантних ензима, али су у узорцима листа довели до значајних повећања активности SOD и ASC-Px код клона В-229, затим код клона М-1 су забележена повећања активности GPx, GSH-Px и ASC-Px и код клона ПЕ19/66 повећање активности ASC-Px и GSH-Px. Код клона В-229 је забележено значајно повећање количине глутатиона у листу при 100 mOsm третману као и у корену при 200 mOsm третману. Значајно повећање количине глутатиона забележено је још код клона

- M-1 у узорцима корена при 100 mOsm третману.
- У узорцима листа код сва три клона долази до повећања количине H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и интензитета оксидације протеина. Интензитет липидне пероксидације се повећава само код клона M-1 у условима 200 mOsm стреса, што је у складу са резултатом забележеним у култури ткива овог клона. У узорцима корена код сва три клона је при 200 mOsm третману утврђено да долази до повећања интензитета липидне пероксидације и количине H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, док се интензитет оксидације протеина не мења значајно у односу на контролу.
  - ЕСР спектралном анализом утврђено је да екстракти листа испитаних клонова имају инхибиторни ефекат на стварање хидрокси радикала, који се у условима водног стреса значајно повећао код клона M-1 и код клона ПЕ19/66 у условима 100 mOsm стреса.
  - Количина пролина се повећала у условима водног стреса у листу, док је у корену повећање забележено само код клона M-1 при 100 mOsm третману.
  - Активност ензима PDH укљученог у катаболизам пролина се смањила условима водног стреса код клона M-1 и у листу и у корену, док се код клона B-229 смањила само при 100 mOsm третману.
  - Садржај GB се повећавао условима водног стреса и у листу и у корену код сва три клона.
  - HPLC анализом одабраних полифенолних компоненти у екстрактима листа и корена три испитана клона M-1, B-229 и ПЕ19/66 као најзаступљеније компоненте утврђене су катехин (од 17.68 до 26.94 mg/g s.e. у листу и у корену од 5.75 до 33.82 mg/g s.e.) и салицин (од 2.86 до 4.90 mg/g s.e. у листу и у корену од 3.49 до 5.47 mg/g s.e.), затим је у екстрактима листа утврђено присуство протокатехинске киселине (детектована у количини од 1.69 до 3.99 mg/g s.e) и у екстрактима корена *p*-хидроксибензојеве киселине (детектована у количини од 1.51 до 1.93 mg/g s.e).
  - Водни стрес изазван са PEG 6000 углавном утиче на смањење садржаја полифенолних компоненти. Повећање садржаја у условима водног стреса је утврђено само у неким случајевима. Уколико се као критеријум посматрају само промене веће од 50% у односу на контролу, онда је лакше уочити разлике које је водни стрес изазвао код различитих клонова. Највише промена већих од 50% у односу на контролу у условима водног стреса је уочено код клона B-229, где је у екстракту листа под утицајем 200 mOsm стреса одређено повећање садржаја хлорогенске киселине и *p*- хидроксибензојеве киселине, док се у екстракту корена истог клона по повећао садржај салицилне и изоферулне киселине при 100 mOsm стресу, као и хрисина, мирицетина и кемферола у условима 100 mOsm и 200 mOsm стреса. Код клона ПЕ19/66 је забележен мањи број компонент чији се садржај повећао у условима водног стреса у односу на клон B-229. У екстракту листа клона ПЕ19/66 је под утицајем 100 mOsm стреса одређено повећање хлорогенске киселине и кемферола, док је у екстракту корена утврђено повећање садржаја протокатехинске киселине и хрисина под утицајем 200 mOsm стреса и мирицетина под утицајем 100 mOsm стреса. Код клона M-1 у условима водног стреса нису забележена повећања већа од 50%.
  - У условима водног стреса је код екстракта B-229 клона одређено повећање садржаја флавоноида и проантоцијанидина, а садржај укупних фенола је на нивоу контроле. Код друга два клона укупни феноли и флавоноиди се смањују.
  - Процентом антиоксидантне активности применом тестова који су засновани на трансферу електрона (неутрализација DPPH• радикала и одређивање редукционе способности - FRAP тест) и неутрализацији слободнорадикалских врста (капацитет „хватања“ O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) утврђено је да се једино антиоксидантни капацитет клона B-229 повећава у условима стреса.
  - Активност ензима PPO укљученог у катаболизам фенола се смањила у условима водног стреса код клона B-229 при 100 mOsm третману; док се активност ензима PAL укљученог у биосинтезу фенола у условима водног стреса изазваног са PEG 6000 повећала само код клона B-229 у листу и у корену
  - Регресиона анализа показује да су сва полифенолна једињења у позитивној корелацији са укупним фенолима, флавоноидима и наведеним антиоксидантним активностима, сем *p*-хидроксибензојеве киселине и кафеине киселине, што указује на то да ове две киселине имају неку другу физиолошку улогу током водног стреса и да им главна функција није антиоксидантна.
  - PCA анализом је потврђена повезаност између одређених полифенолних параметара и

<p>антиоксидантне активности као и ензима укључених у метаболизам фенола (PAL и PPO).</p> <p>У оба експеримента уочено је да је акумулација пролина и глицин-бетаина у условима водног стреса изазваног са ПЕГ 6000 најважнија стратегија отпорности на стрес и превазилажењу водног дефицита, тако да се ови параметри могу дефинисати као најбољи индикатори отпорности тополе на сушу. Овим је хипотеза постављена у уводном делу дисертације да водни стрес утиче на антиоксидантни систем изазивајући индукцију активности појединих антиоксиданата, као и промене у метаболизму пролина и глицин-бетаина у потпуности верификована.</p> <p>Закључци представљени у дисертацији су произашли из добијених резултата и указују на значај и научни допринос спроведених истраживања.</p>
<p><b>VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА</b>  Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.</p>
<p>Кандидат је рационално приступио обради и анализи експерименталних података који су успешно подељени у логичке целине. Резултати истраживања су аналитички представљени, статистички обрађени, детаљно дискутовани и критички поређени са резултатима из цитиране литературе. Прегледности резултата значајно су допринели графички прикази (хистограми) и систематичне табеле. Анализа и дискусија резултата у светлу досадашњих сазнања из ове проблематике омогућила је кандидату извођење одговарајућих закључака који дају одговоре на постављене циљеве у овој докторској дисертацији.</p> <p>Због свега наведеног је комисија позитивно оценила начин приказа и тумачења резултата истраживања.</p>
<p><b>IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b></p> <p>Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање</p>
<p>1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме</p> <p>Докторска дисертација је у потпуности написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме докторске дисертације.</p>
<p>2. Да ли дисертација садржи све битне елементе</p> <p>Докторска дисертација садржи све битне елементе који су предвиђени за израду.</p>
<p>3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци</p> <p>На основу комплетног увида у докторску дисертацију, постављене циљеве истраживања, прегледа литературе, правилно постављеног огледа као и на основу добијених резултата и изведених закључака који су применљиви у пракси докторска дисертација представља оригиналан научни рад са фундаменталним и практичним значајем.</p> <p>Допринос овог рада се огледа у утврђивању способности адаптације и отпорности појединих клонова тополе на услове водног стреса и представља добру основу за одабир клонова са највећом толерантношћу на оксидативни стрес изазван водним стресом.</p> <p>Посебан акценат комисија ставља на резултате ове дисертације, који имају и изузетан практичан значај, омогућавајући поуздано дефинисање потенцијала испитиваних клонова за опстанак у променљивим условима спољашње средине, у складу са актуелним климатским променама, које укључују смањење количине падавина и ограничену доступност воде. На основу адаптивних промена биохемијских особина биљака у условима водног дефицита, експериментални подаци дају поуздане смернице за одабир клонова погодних за ефикасно пошумљавање.</p>
<p>4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања</p> <p>По мишљењу комисије ова докторска дисертација нема значајних недостатака.</p>

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже да се докторска дисертација под називом „**Биохемијски механизми отпорности клонова тополе (*Populus spp.*) на водни стрес**“ прихвати, а кандидату **Ружици Ждеро Павловић** одобри одбрана дисертације.

У Новом Саду, 14.07.2017.

**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

---

**др Неда Мимица-Дукић**, редовни професор,  
Природно-математички факултет,  
Универзитет у Новом Саду, председник

---

**др Борис Поповић**, ванредни професор,  
Пољопривредни факултет,  
Универзитет у Новом Саду, ментор

---

**др Ивана Беара**, ванредни професор,  
Природно-математички факултет,  
Универзитет у Новом Саду, ментор

---

**др Саша Орловић**, редовни професор,  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду,  
и научни саветник,  
Институт за низијско шумарство и животну средину,  
Универзитет у Новом Саду, члан