

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Београд

Студентски трг 1

Предмет: Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације и испуњености услова кандидата Љиљане Костић Крављанац

ВЕЋУ ЗА СТУДИЈЕ ПРИ УНИВЕРЗИТЕТУ У БЕОГРАДУ

Одлуком Већа за студије при Универзитету у Београду број 06-167/П1-853/2-09, донетој на седници 28.02.2014. године, именовани смо за чланове комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације пријављене под насловом “Модулирање ризосферних процеса и прилагођавање пшенице различитим мерама поправке земљишта оштећених рудничком јаловином“, кандидаткиње Љиљане Костић Крављанац, дипломираног биолога заштите животне средине (докторске студије: Управљање животном средином).

На основу пручене документације која нам је достављена подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

Биографски подаци кандидата

Љиљана Костић Крављанац рођена је 19.10.1978. године у Београду, где је завршила основну и Средњу медицинску школу. Биолошки факултет Универзитета у Београду (смер Екологија и заштита животне средине), завршила је 2005. године са просечном оценом 9.31 и дипломским радом “Земљиште као станиште“, који је оцењен највишом оценом (10). Докторске академске студије на Универзитету у Београду, на смеру Управљање животном средином уписала је 2005. године и положила све програмом предвиђене испите са просечном оценом 9.88.

Од 2006. године запослена је у Институту за земљиште у Топчидеру (Београд), најпре као истраживач приправник, а од 2009. године као истраживач сарадник. Од марта 2011. године прелази у Институт за мултидисциплинарна истраживања ради израде докторске дисертације у оквиру пројекта основних истраживања “ОН-173028: Минерални стрес и адаптације биљака на маргиналним пољопривредним земљиштима“, којим руководи Мирослав Николић.

Актуелне области истраживања Љиљане Костић Крављанац су минерална исхрана биљака, плодност и загађење земљишта. Области ужег интересовања су динамика фосфора у ризосфери и физиолошке адаптације корена житарица на дефицит фосфора, са посебним фокусом на улогу исхране силицијумом у превазилажењу вишеструког минералног стреса на земљиштима неповољних карактеристика (маргинална пољопривредна земљишта).

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
СТУДЕНТСКИ ТРГ Бр. 1
БЕОГРАД

23 MAR 2014

Из области предложене докторске дисертације Љиљана Костић Крављанац до сада је публиковала три рада у међународним научним часописима са импакт фактором, три рада у националним часописима, као и 6 саопштења на међународним конференцијама *in extensio* или у изводу.

Следи списак публикација кандидаткиње класификованих према критеријумима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије:

- Nikolic N., **Kostic Lj.**, Djordjevic A., Nikolic M. 2011. Phosphorus deficiency is the major limiting factor for wheat on alluvium polluted by the copper mine pyrite tailings: a black box approach. *Plant and Soil* 339: 485-498. (M21; IF: 2.733; *Soil Science* 2/33)
- Mrvić V., **Kostić Kravljanaц Lj.**, Čakmak D., Sikirić B., Brebanović B., Perović V., Nikoloski M. 2011. Pedogeochemical mapping and background limit of trace elements in soils of Branicevo Province (Serbia). *Journal of Geochemical Exploration* 109: 18-25. (M22; IF: 2.125; *Geochemistry & Geophysics* 24/77)
- Saljnikov E., Čakmak D., **Kostic Lj.**, and Maksimovic S. 2009. Labile fractions of soil organic carbon in mollisols from different climatic regions. *Agrochimica* 53: 376-385. (M23; IF: 0.288; *Soil Science* 30/31)
- Kostić Kravljanaц Lj.**, Brebanović B., Zdravković M., Martinović Lj., Stanojković A., Cokić Z. 2010. Content of microelements and heavy metals in soils of Krupanj municipal. *Zemljište i biljka* 59: 51-60. (M51)
- Maksimović S., Pivić R., **Kostić Kravljanaц Lj.**, Nikoloski M., Perović V., Koković N., Jakovljević M., Molerović S. 2010. Level of soil endanger with detrimental substances on the boarder od ash disposal in the area Obrenovac. *Zemljište i biljka* 59: 39-50. (M51)
- Saljnikov E., **Kostic Kravljanaц Lj.**, and Jaramaz, D. 2009. Characterization of SOM: the role and determination of soil labile carbon. *Zemljište i biljka* 58:215-224. (M51)
- Pavlovic J., Samardzic J., Ilic P., Maksimovic V., **Kostic Lj.**, Stevic N., Nikolic N., Liang Y.C., Nikolic M. (2011): Silicon ameliorates iron deficiency chlorosis in strategy I plants: first evidence and possible mechanism(s). *Proceedings of the 5th International Conference on Silicon in Agriculture*, September 13-18, 2011 Beijing, China, pp 137-138. (M32; позивно писмо организатора упућено М. Николићу)
- Nikoloski M., Mrvić V., **Kostić Kravljanaц Lj.**, Zdravković M., Čakmak D., Brebanović B., Koković N. 2010. Possibilities for safe food production in relation to trace elements Ni and Cr in Sumadija and Valjevo region. *XIV International ECO-Conference 2010*, Novi Sad, Serbia, pp. 65-73. (M33)
- Kostić Kravljanaц Lj.**, Mrvic V., Perovic V., Kokovic N., Sikiric B., Jaramaz D., Saljnikov E. 2010. Content of selected trace elements Cu, Zn, Cd, Pb and possibilites of safe food production *XIV International ECO-Conference 2010*, Novi Sad, Serbia, pp 57-65. (M33)
- Delić D., Stajković, O., Mićanović D., **Kostić Kravljanaц Lj.**, Bogić Miličić B., Knežević Vukčević J. 2008. Presence and activity of *S. meliloti* used as indicator of N-fixation potential of different soil types. *Proceedings of the First International Conference: State, Possibilities and Perspectives of Rural Development on Area of Huge Open-pit Minings*, pp. 437-444. (M33)
- Kostić Kravljanaц Lj.**, Samardžić J., Nina Nikolić N., Liang Y.C., Nikolić M. 2013. The mechanisms of Si-mediated alleviation of P deficiency in wheat grown in acid soils polluted by mine tailings. *1st International Conference on Plant Biology and 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society*, June 4-7, Subotica, Serbia. Abstracts, p. 48. (M34)
- Bosnić P., Savić J., **Kostić Kravljanaц Lj.**, Stević N., Pavlović J., Lazić M., Marjanović-Jeromela A., Hristov N., Nikolić N., Nikolić M. 2013. Zn concentrations in wheat grains along the gradient of

Предмет и садржај дисертације

Деградација земљишта је једна од главних препрека постизању глобалних циљева одрживог развоја, прокламованих Агендом 21 Уједињених нација (УН), како са аспекта производње довољне количине хране за растућу људску популацију, тако и са аспекта очувања животне средине. Преко 30% пољопривредних земљишта у свету је антропогено деградирано, а дефицит и токсичност минералних елемената који се на њима јавља представља појединачно најзначајнији фактор који, са једне стране, ограничава приносе стартешки важних усева у свету, а са друге има и велики утицај на здравље људске популације. Сматра се да је рударским активностима трајно оштећено око 1% од укупне површине земљине коре, од чега значајан део чини пољопривредно земљиште, које је неповратно изгубљено за производњу хране. Рударско-топионичарски басен Бор представља једну од четири “вруће тачке” у Србији, чији се негативни утицај на животну средину шири и на суседне државе Бугарску и Румунију. Као последица неадекватног одлагања велике количине рударског отпада са високим садржајем бакра и сулфида дошло је до неконтролисаног изливања флотационе јаловине у водотокове тимочког слива, чиме је потпуно уништено преко десет хиљада хектара пољопривредног земљишта, а још већа површина је значајно оштећена. Као последица минеролошког састава руде, главни примарни загађивачи су бакар, арсен и цинк, а поред тога, секундарним оксидационим процесима у јаловини наталоженој преко алувијалног обрадивог земљишта долази и до значајне ацидификације земљишта. У таквој екстремно киселој средини повећава се растворљивост и испирање не само токсичних, већ и хранљивих елемената, као и имобилизација ионако малих количина фракција фосфора приступачног за биљке.

Поправка оваквих секундарно киселих земљишта је неопходна да би се, пре свега, ублажиле негативне последице деградације земљишта, као што су даље загађење површинских и подземних вода и улазак токсичних елемената у ланце исхране, али и повећање приноса усева на делимично оштећеним земљиштима, која се и даље обрађују. Најчешће коришћене мере поправке ових делимично оштећених земљишта, које се тренутно примењују у пракси су уношење минералних ђубрива и ређе креча. Међутим, употреба пре свега минералних ђубрива често не даје задовољавајуће резултате, зато што се фосфатна компонента минералних ђубрива у таквом земљишту трансформише у облике које биљка не може да усвоји, а повећање норми ђубрења, осим што је економски нерационално, носи ризик да, због честог плављења Тимока, дође и до еутрофикације површинских вода. Због тога се поправка таквих земљишта мора веома пажљиво спроводити уз избор одрживих и по животну средину безопасних метода. Једна од таквих иновативних метода могла би бити употреба ђубрива на бази силицијума, за који постоје растући интерес у свету, као јединог познатог минералног елемента који ефикасно делује на ублажавање различитих врста абиотског стреса код биљака.

Прва интеракција између биљке и земљишта дешава се у зони која се налази непосредно уз корен биљке и назива се ризосфера. Промене у ризосфери које настају као последица активности корена су бројне, а са аспекта растења и развића биљака најважније су промене приступачности минералних елемената, односно повећање приступачности есенцијалних, а смањење приступачности фитотоксичних елемената. Физиолошка улога ексудата корена, а посебно органских киселина, на мобилизацију/имобилизацију минералних елемената у ризосфери није довољно јасна и зависи од многих фактора: од особина самог земљишта, биљне врсте и генотипа, као и од промена у метаболизму, односно од концентрација и профила органских киселина. Различите биљне врсте имају и различит одговор корена на дефицит хранљивих минералних елемената; тако је, на пример, код неких врста ексудација органских киселина индукована дефицитом фосфора у ризосфери, док је код других врста као што је то пшеница (модел биљка у овим истраживањима) ексудација органских киселина примарно индукована токсичним облицима алуминијума. Поред крајње контроверзних резултата у литератури када је реч о улози органских киселина из корена у аквизицији фосфора у ризосфери, још већу непознаницу представља молекуларна основа регулације ових процеса.

Сумирајући све напред изнето, централни предмет истраживања ове дисертације представља проналажење одрживих и ефикасних мера поправке оштећених земљишта које могу да у позитивном смеру утичу на процесе у ризосфери пшенице, како би се ова економски значајна пољопривредна култура могла прилагодити успевању у стресним условима који владају у земљиштима оштећеним рударском јаловином (дефицит хранива и токсичност метала и арсена).

Научни циљ дисертације

Главни циљ ове дисертације је да се (1) проучи како примена различитих мера за поправку земљишта оштећених рударском јаловином утиче на процесе у ризосфери пшенице, (2) разјасне сложени физиолошки и молекуларни механизми којима се пшеница прилагођава дефициту фосфора и токсичним концентрацијама бакра и арсена у ризосфери и на крају (3) утврди протокол за поправку таквих земљишта на бази интердисциплинарног приступа који узима у обзир процесе у земљишту (ризосфери) и биљци и предложи за практичну примену на већој скали.

Основне хипотезе

Основне хипотезе од којих креће ова дисертација су:

1. да ће се ефекат мера за поправку пољопривредних земљишта оштећених рударским активностима, на којима су главни претпостављени ограничавајући фактори за растење пшенице дефицит фосфора и токсичност метала појачати уколико се одговарајућим интервенцијама на нивоу метаболизма корена индукује излучивање органских киселина. Органске киселине (првенствено малати и цитрати), као јаки хелатори метала, омогућиће са једне стране

повећање растворљивости тешко растворљивих металофосфата, чиме се омогућава да фосфатни анјон буде транспортован кроз плазмамембрану ћелија корена укључивањем фосфатних транспортера симпортног типа, а са друге стране стабилизацију метала у ризосфери и спречавање њиховог уласка у ланце исхране.

2. да је код пшенице механизам ексудације органских киселина из корена, синергистички индукован токсичним концентрацијама Al^{3+} јона у ризосфери и дефицитом фосфора (*in planta*), насупрот важећој догми да је за ефекат појачане ексудације карбоксилата из корена на киселим земљиштима узрок повећана концентрација токсичних облика алуминијума у ризосфери, који се у пољским условима тешко може раздвојити од дефицита приступачног фосфора, којем се приписује секундарни (последични) ефекат.
3. да ће третирање биљака силицијумом (у различитим облицима), који је познат као једини минерални елемент који ублажава последице мултиплог стреса код биљака, позитивно утицати не само на имобилизацију и *in planta* детоксификацију токсичних метала, односно мобилизацију приступачног фосфора у ризосфери, већ и на усвајање и транспорт фосфора путем сигналне улоге силицијумске киселине у експресији гена који кодирају биосинтезу транспортера за ефлукс органских анјона (*TaALMT1*, *TaMATE1*) и инфлукс фосфора (*TaPT1*, *asPT2*) у корену пшенице.

Задаци истраживања

Задаци истраживања ове докторске дисертације су:

1. дефинисање организирајућих фактора за производњу пшенице у земљиштима која су у различитом степену оштећена изливањем пиритне јаловине у сливу Тимока (теренска истраживања) и сакупљање земљишта за касније експерименте у лабораторијским условима.
2. одређивање садржаја хранљивих и потенцијално токсичних елемената у тим земљиштима (укупних и приступачних облика различитим стандардним аналитичким методама).
3. извођење експеримената у ризотронима, са пшеницом (модел биљка) гајеном на земљиштима различитог степена оштећења уз примену различитих мера поправке и то: 1) уношење органске материје (стајњак); 2) уношење креча; 3) уношење минералних NPK ђубрива; 4) уношење ђубрива на бази силицијума, као и различите комбинације ових мера.
4. испитивање хемијских промена у ризосфери (садржај приступачних облика хранљивих и потенцијално токсичних минералних елемената, рН реакција), сакупљање ексудата корена и анализа органских киселина и оцена ефекта наведених мера поправке земљишта на растење (сува биомаса корена и надземног дела), минерални састав биљних ткива и експресија одабраних гена пшенице, који кодирају транспортере фосфора (*TaPT1* и *TaPT2*), фосфоенол

пируват карбоксилазу (*TaPEPC*) и анјонске канале за ефлукс карбоксилата у ризосферу (*TaMATE1* и *TaALMT1*).

5. посебна анализа заједничког деловања наведених мера поправке земљишта и адаптивних реакција корена на промене хемијског састава ризосферног земљишта (макро- и микрохранљиви и потенцијално токсични елементи), с посебним фокусом на динамичке промене фракција фосфора и приступачног силицијума.

Методe

Имајући у виду мултидисциплинарни карактер ове дисертације, предвиђена истраживања захтевају примену већег броја метода, од испитивања механичких и хемијских својстава земљишта и пиритне јаловине (извора загађења) до експресије одабраних гена који кодирају транспортере фосфора (*TaPT1* и *TaPT2*), фосфоенол пируват карбоксилазу (*PEPC*) и анјонске канале за ефлукс карбоксилата у ризосферу (*TaMATE1* и *TaALMT1*) у корену пшенице.

А) Методе гајења биљака у оригинално дизајнираним ризотронима са флексибилним приступом корену и ризосферном земљишту.

Б) Методе анализе земљишта

- испитивање мехничког састава земљишта обавиће се гранулометријски
- одређивање потенцијалне и хидролитичке киселости земљишта одредиће се потенциометријски у водном и калијум хлоридном екстракту земљишта
- одређивање органске материје (N, C, S) у земљишту обавиће се директно, HCNS анализатором
- одређивање укупног сдржаја минералних елемената обавиће се методом ICP-OES након дигестије узорка у концентрованој HNO₃.
- одређивање приступачних облика хранљивих елемената обавиће се се методом ICP-OES након екстракција различитим екстракционим средствима.
- секвенциона екстракција фракција фосфора у ризосфери и колориметријско мерење концентрација

В) Методе анализе биљних ткива

- одређивања садржаја минералних елемената методом ICP-OES, након дигестије узорка у смеси HNO₃:H₂O₂ (3:2)
- одређивање садржаја азота HCNS анализатором
- сакупљање ексудата корена у ризосфери оригинално развијеном методом
- анализа органских киселина методом HPLC.

Г) Молекуларне методе

- екстракција RNA из сегмената ткива корена
- квантитативна Real-time PCR

Д) Статистичка анализа података коришћењем софтвера *Statistica 6*.

3.5. Научна оправданост и мултидисциплинарност

Иако загађење земљишта представља глобални проблем, који је широко проучаван са различитих аспеката, о ризосферним процесима који се одвијају приликом поправке таквих земљишта се мало зна. Стога би се главни научни допринос ове тезе огледао у бољем разумевању динамичких промена у ризосфери као резултанта деловања мера поправке земљишта са једне стране, и биохемијских процеса у корену пшенице, као адаптивних реакција на услове вишеструког минералног стреса специфичаног за земљишта оштећених рударским активностима са друге стране. Ова истраживања омогућиће и расветљавање улоге силицијума у ублажавању стреса дефицита фосфора, имајући у виду да не постоје публикована истраживања која пружају објашњење механизма на физиолошком и молекуларном нивоу.

Имајући у виду да ће бити тестиране различите мелиоративне мере, предложена докторска дисертација имала би и практични значај за одабир најподесније технологије гајења житарица на оштећеним алувијалним земљиштима у сливу Тимока. Посебан научни допринос ове докторске дисертације представљаће боље упознавање адаптација пшенице (на физиолошком и молекуларном нивоу) као одговор на различите мере поправке ових оштећених земљишта са израженим дефицитом фосфора. Такође, ова истраживања омогућиће да се боље сагледају сложене интеракције корена и земљишта и разјасни улога мера поправке у модулацији ризосферних процеса. И на крају, важан практичан допринос ове докторске дисертације је иновативна примена ђубрива на бази силицијума ради повећања толерантности пшенице на вишеструке стресне факторе.

Мултидисциплинарни карактер ове дисертације у области животне средине огледа се у тесној повезаности неколико научних дисциплина као што су: педологија (хемија земљишта), физиологија биљака (минерална исхрана) и молекуларна биологија, као и граничних области рударства и геологије (загађење животне средине).

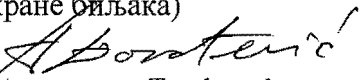
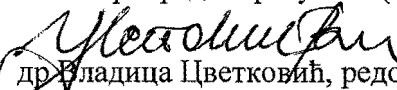
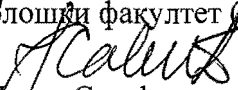
Закључак и предлог

На основу изложеног комисија сматра да је предложена тема глобално актуелна и да ће резултати који се из ње очекују претстављати значајан научни допринос у решавању како теоретских (физиолошки и молекуларни адаптивни механизми корена), тако и практичних проблема гајења пшенице на маргиналним земљиштима. Иновативни приступ ове дисертације огледа се у фокусирању на комплексне процесе, који се одвијају у ризосфери, на додирној површини земљишта и биљке (корена). Предложене истраживачке методе (хемијске, биохемијске и молекуларне) су одговарајуће, савремене и доступне кандидаткињи у оквиру пројекта на коме је ангажована, те у пуној мери одговарју мултидисциплинарном карактеру ове дисертације у граничним областима наука о животној средини, земљишту и биљкама. Кандидаткиња је својим досадашњим радом и постигнутим резултатима показала способност за научно-истраживачки рад и успешно је одбранила навадену тему дисертације у оквиру предмета *Специјални курс*, који је положила са највишом оценом.

Комисија сматра да постоје сви предуслови да се постављени научни циљеви успешно остваре, те предлаже Већу за студије при Универзитету у Београду да

прихвати овај извештај и Љиљани Костић Крављанац одобри израду докторске дисертације под насловом: “Модулирање ризосферних процеса и прилагођавање пшенице различитим мерама поправке земљишта оштећених рудничком јаловином“. Истовремено, комисија предлаже да се за менторе ове дисертације именују др Мирослав Николић, научни саветник Института за мултидисциплинарна истраживања (научна област: физиологија исхране биљака) и др Алксандар Ђорђевић, редовни професор Пољопривредног факултета (научна област: педологија).

Чланови комисије:

- 
1. др Мирослав Николић, научни саветик, Институт за мултидисциплинарна истраживања (физиологија исхране биљака)
- 
2. др Алксандар Ђорђевић, редовни професор, Пољопривредни факултет (педологија)
- 
3. др Владица Цветковић, редовни професор, Рударско-Геолошки факултет (геологија)
- 
4. др Јасна Савић, доцент, Пољопривредни факултет (ратарство)
- 
5. др Јелена Самарџић, научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (молекуларна биологија биљака)

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата **Љиљану Костић Крављанац**

Име и презиме ментора: **Мирослав Николић**

Звање: научни саветник

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Pavlovic J., Samardzic J., Masimović V., Timotijevic G., Stevic N., Laursen K.H., Hansen T.H., Husted S., Schjoerring J.K., Liang Y., **Nikolic M.** 2013. Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytologist* 198: 1096-1107. (IF **6.736**)
2. **Nikolic M.**, Cesco S., Monte R., Tomasi N., Gottardi S., Zamboni A., Pinton R., Varanini Z. 2012. Nitrate transport in cucumber leaves is an inducible process involving an increase in plasma membrane H⁺-ATPase activity and abundance. *BMC Plant Biology* 12: 66. (IF **4.354**)
3. Nikolic N., **Nikolic M.** 2012. Gradient analysis reveals a copper paradox on floodplain soils under long-term pollution by mining waste. *Science of the Total Environment* 425: 146-154. (IF **3.258**)
4. Dragisic Maksimovic J., Mojovic M., Maksimovic V., Römhelt V., **Nikolic M.** 2012. Silicon ameliorates manganese toxicity in cucumber by decreasing hydroxyl radical accumulation in the leaf apoplast. *Journal of Experimental Botany* 63: 2411-2420. (IF **5.242**)
5. **Nikolic M.**, Nikolic N., Liang Y., Kirkby E.A., Römhelt V. 2007. Germanium-68 as an adequate tracer for silicon transport in plants. Characterization of silicon uptake in different crop species. *Plant Physiology* 143: 495-503. (IF **6.367**)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски назив магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, квалификују за ментора односне дисертације.

Г) У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

Датум 21.02.2014.

М.П.

M. Nikolic