

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 356/7-7.2.
Датум: 24.04.2013. године

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на извештај о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. став 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду (“Гласник Универзитета” број 131/06), дате сагласност на извештај о урађеној докторској дисертацији кандидата НАТАЛИЈЕ КРАВИЋ.

Кандидат **НАТАЛИЈА (Бранислав) КРАВИЋ**, дипл.биолог, пријавила је докторску дисертацију под називом: «Анализа генетичке варијабилности кукуруза (*Zea mays* L.) на толерантност према суши»,

из научне области Ратарство и повртарство.

Универзитет је дана 16.04.2009. године, својим актом 01 број 612-17/30/09 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАБИЛНОСТИ КУКУРУЗА НА ТОЛЕРАНТНОСТ ПРЕМА СУШИ».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације НАТАЛИЈЕ КРАВИЋ, образована је на седници одржаној 27.02.2013. године, одлуком Факултета број 356/5-5.3. у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област

1. др Гордана Шурлан-Момировић, редовни професор, Генетика,
2. др Славен Продановић, редовни професор, Оплењивање биљака,
3. др Виолета Анђелковић, научни саветник, Биотехничке науке-пољопривреда,
4. др Мирјана Вулетић, научни саветник, Физиологија биљака,
5. др Лада Живковић, доцент, Генетика.

Наставно-научно веће факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана 24.04.2013. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 356/7-7.2.
Датум: 24.04.2013. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 123. Закона о високом образовању и члана 24. Правилника о последипломским студијама и докторату наука, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 24.04.2013. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **НАТАЛИЈА КРАВИЋ**, дипл. биолог и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАБИЛНОСТИ КУКУРУЗА НА ТОЛЕРАНТНОСТ ПРЕМА СУШИ»**.

II Универзитет је дана 16.04.2009. године, својим актом 01 број 612-17/30/09 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:
Natalija Kravic, Ksenija Marković, Violeta Andelković, Vesna Hadži-Tašković Šukalović; Vojka, Babić; Mirjana, Vuletić, (2013): Growth, proline accumulation and peroxidase actyvity in maize seedlings under osmotic stress, Acta Physiol Plant, 35:233-239.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору проф. др Гордани Шурлан-Момировић,
Институту за ратарство и повртарство, Студентској служби и архиви.

**НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

**Предмет: Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације
Наталије Кравић, дипл. биол.**

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду од 27. 02. 2013 године, именована је Комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације дипл. биол. Наталије Кравић, истраживача сарадника у Институту за кукуруз “Земун Поље” под насловом: **“Анализа генетичке варијабилности кукуруза на толерантност према суши”**.

Комисија у саставу: др Гордана Шурлан Момировић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Славен Продановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Виолета Анђелковић, виши научни сарадник Института за кукуруз “Земун Поље”, др Мирјана Вулетић, научни саветник Института за кукуруз “Земун Поље” и др Лада Живковић, доцент Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, прегледала је и оценила докторску дисертацију и подноси Већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација дипл. биол. Наталије Кравић, написана је на 170 страница, у оквиру којих се налазе 34 табеле, 20 графикона и 13 слика. Испред основног текста налазе се резимеи са кључним речима на српском и енглеском језику, као и приказ садржаја. У докторској дисертацији је цитирано, и у литератури наведено, 266 референци.

Дисертација се састоји из следећих поглавља: 1. Увода (стр. 1 - 2), 2. Циљева истраживања (стр. 3), 3. Прегледа литературе (стр. 4 - 22), 4. Радне хипотезе (стр. 23), 5. Материјала и метода (стр. 24 - 41), 6. Резултата (стр. 42 - 111), 7. Дискусије (стр. 112 - 137), 8. Закључака (стр. 138 - 140) и 9. Литературе (стр. 141 - 170).

2. Приказ и анализа докторске дисертације

Предмет истраживања докторске дисертације је проучавање конститутивних и адаптивних особина које доприносе толерантности кукуруза на сушу, интегрисаном применом метода класичне селекције, морфолошких и физиолошко-биохемијских метода, као и метода молекуларне генетике.

С обзиром на предвиђања глобалних климатских промена за 21. век, у правцу повећања температуре ваздуха, веће евапотранспирације и учесталије појаве суше, у поглављу **Увод** је истакнута неопходност да се део оплемењивачких програма кукуруза усмери у правцу повећања толерантности према овом стресном фактору, и указано да је за успешну селекцију на повећану толерантност кукуруза према стресу суше, неопходно пронаћи генотипове са

високим степеном експресије тражене особине, уз истовремену што већу адаптираност на локалне услове гајења.

У поглављу **Циљеви истраживања**, примењени концепт *prebreeding*-а, укључивао је тестирање целокупног генофонда банке гена Института за кукуруз „Земун Поље” у условима контролисане суше, као и у условима умереног водног дефицита, груписањем генотипова по ФАО групама зрења. У циљу идентификације и одабира генотипова, чиме би се омогућило формирање језгровне (*core*) колекције кукуруза за толерантност према суши, поред добрих *per se* перформанси у пољским условима, била је неопходна информација о припадности генотипова одговарајућим хетеротичним групама, на основу укрштања са одабраним тестерима пореклом из различитих хетеротичних група, као и информација о општој комбинационој способности. У циљу анализе морфолошко-физиолошке и биохемијске основе толерантности на сушу, извршено је испитивање реакције одабраних генотипова кукуруза у раној фази развића на симулирани стрес суше у лабораторијским условима, док је за одређивање дивергентности генотипова унутар формиране језгровне колекције, урађена детаљнија карактеризација применом *SSR (Simple Sequence Repeat)* молекуларних маркера.

У поглављу **Преглед литературе** се наводи да варијабилност генотипова кукуруза далеко превазилази варијабилност свих осталих житарица, и истиче да, иако је значај банке гена, као главног облика *ex situ* начина конзервације биљних генетичких ресурса огроман, савремени оплемењивачки програми користе тек 5% доступне варијабилности. Из разлога што је идентификација супериорних генотипова у погледу пожељних агрономских особина, веома захтевна и скупа, потврђено је да концепт *prebreeding*-а представља најбољу везу између генетичке варијабилности која се чува у банкама гена и оплемењивачких програма. Његов значај се огледа у стварању нових популација за потребе оплемењивања, тј. у широј употреби гермиплазме са циљем добијања хибрида кукуруза што бољих перформанси, и формирања мањих језгровних колекција за одређене особине од значаја за програме оплемењивања кукуруза.

У делу који се односи на „Стрес суше“, наводи се да степен штетног ефекта суше зависи од интензитета и дужине трајања, биљне врсте и стадијума развића биљке, као и да висок степен варирања у времену појаве, интензитету и трајању водног дефицита у комбинацији са високим температурама ваздуха, отежава прецизно дефинисање особина биљке одговорних за њено успешно преживљавање у таквим условима. Такође се наводи да осмотски стрес изазван сушом, може пореметити редокс хомеостазу и довести до оксидативног стреса, који се огледа у повећаном стварању реактивних облика кисеоника (*ROS*), чији се негативан ефекат огледа у оксидацији фотосинтетичких пигмената, мембранских липида, протеина и нуклеинских киселина. У делу који се односи на „Механизме толерантности према суши“, истакнута је улога ензимских система заштите биљке у регулисању нивоа *ROS*-а у ћелијама. Својим учешћем у процесима раста и развића биљке, у одговорима на утицај стреса, у регулсању метаболизма хормона и ћелијског зида, као и укључивањем у антиоксидативну одбрану, ензими гвајакол пероксидазе (*POD*, класа *III*, *EC 1.11.1.7*) се могу сматрати dobrим биомаркерима и показатељима присуства биотичког и абиотичког стреса. Као адаптивни одговор биљке на утицај дехидратације и високог осмотског притиска, посебно је истакнут значај синтезе и акумулације компатибилних растворљивих једињења у корену и

листу, првенствено пролина, као кључног осмотикума, који доприноси осмотском прилагођавању регулишући осмотски потенцијал у цитоплазми и омогућавајући тиме биљци задржавање воде и спречавање дехидратације. Указано је да повећана акумулација пролина доприноси осморегулацији, стабилизацији макромолекула, детоксикацији штетних радикала, регулисању ћелијског редокс статуса и служи као извор угљеника и азота након престанка изложености биљке водном дефициту.

У делу који се односи на „Стрес суше код кукуруза и механизме толерантности“, указано је да је кукуруз најосетљивији на стрес суше у фази цветања, када се одвијају издуживање свиле, полинација, пораст поленове цеви и почетак формирања зрна. Наводи се да водни дефицит успорава појаву свиле, а самим тим и пораст клипа, много више него што утиче на пораст метлице и само метличење, резултирајући у повећању броја дана између метличења и свилања (*ASI - anthesis silking interval*), што за последицу има слабу озрњеност врха клипа. Такође се наводи, да појава суше у раној фази формирања зрна, нарочито током прве две недеље после полинације, има много већи негативан ефекат на коначни принос него у фази наливања зрна, у којој утиче на смањење приноса првенствено преко смањења величине зрна. Под утицајем стреса суше у току фазе наливања зрна, долази до смањења интензитета фотосинтезе и протока асимилата, чиме се спречава развој зрна услед смањене активности кључних ензима у метаболизму угљеника. Како принос, у условима стреса суше током цветања, показује високу зависност од броја зрна / биљци, јаловости и *ASI*-а код кукуруза, наводи се да се у истраживањима препоручује коришћење секундарних особина, као показатеља толерантности према суши. Истакнуто је, да су, на основу коефицијента херитабилности и корелације са приносом у условима стреса суше, препоручене следеће секундарне особине, значајне за побољшање приноса зрна кукуруза у условима стреса: *ASI*, *stay green*, јаловост биљке, озрњеност клипа и наливеност зрна.

Иако негативно делује на све нивое организације и развоја биљке, наводи се да је штетан ефекат водног дефицита у земљишту најоочљивији у фази клијанаца. Истраживања у вези са испитивањем утицаја стреса водног дефицита на биљку углавном се заснивају на гајењу у строго контролисаним лабораторијским условима. С обзиром на утврђену чињеницу да се испољене особине клијанаца, при њиховом тестирању у различитим условима спољашње средине, одликују умереним до високим нивоом херитабилности, истичу се бројне предности спровођења методе *screening*-а генотипова у раној фази развића - фази клијанца на утицај водног дефицита, а односе се на минимални утрошак материјалних средстава, мању захтевност и већу лакоћу у руковању, омогућавање испитивања гермплазме великог обима, и што је најважније, на омогућавање раног утврђивања присуства / одсуства толерантности на примењени стрес.

У делу који се односи на „Молекуларно-генетичке приступе у испитивању толерантности на сушу“, наводи се да су молекуларни маркери у широкој употреби у истраживањима на биљкама, са циљем одређивања степена генетичког диверзитета између различитих и сродних врста, унутар популација итд, као и ефикасног управљања генетичким ресурсима. Такође се наводи да су развој молекуларне генетике и примена великог броја техника молекуларних маркера, омогућили не само боље разумевање физиолошких параметара који контролишу одговор биљке на абиотички стрес суше и оних укључених у структурно развиће

биљке, већ су обезбедили и додатне информације о односу толерантности извора и локалне популације и њиховој генетичкој разноврсности, интрогресију делова генома повезаних са толерантношћу према суши у локалну популацију, повећање вероватноће очуваности особина значајних за толерантност према суши уз задржавање адаптираности тог материјала, и тиме створили нове могућности за постизање већег степена испољавања толерантности на сушу код кукуруза. Истакнуто је да је процена генетичког диверзитета директно на нивоу ДНК секвенце, применом техника молекуларних маркера, кључни корак у разумевању односа између и унутар генотипова домаћих популација, интродукованих популација и инбред линија кукуруза, њихове генетичке структуре, као и за успостављање приоритета за њихово очување и коришћење као родитељских компоненти и извора пожељних особина, у процесу стварања комерцијалних хибрида побољшаних перформанси у неповољним условима спољашње средине.

У поглављу „**Радна хипотеза**“ се пошло од претпоставке, да је унутар колекције кукуруза банке гена Института за кукуруз „Земун Поље“, са преко 5800 генотипова велике генетичке варијабилности, могуће стварање језгровне колекције од генотипова са повећаном толерантношћу на стрес суше.

У поглављу **Материјал и методе** је дат приказ коришћеног материјала за истраживање, начина постављања и извођења пољских и лабораторијских огледа, као и статистичких метода у обради података.

У циљу идентификације и одабирања генотипова са повећаном толерантношћу према суши, целокупни генофонд банке гена Института за кукуруз „Земун Поље“ (2217 домаћих популација и 5389 интродукованих популација, синтетика, композита и инбред линија) подвргнут је условима контролисане суше у Египту, као и условима умереног водног дефицита у Земун Пољу и Скопљу.

Двогодишње тестирање свих генотипова је извршено на локалитету пољопривредне станице Сидс (долина реке Нил, 150км јужно од Каира), за који је карактеристично одсуство падавина у току вегетационог периода, у комбинацији са високим температурама ваздуха, чиме је омогућена потпуна контрола водног режима наводњавањем. Тестирање је било засновано на груписању генотипова по дужини вегетационог периода (по групама зрења), на основу познатих података о броју дана између ницања и свилања за сваки генотип, које је било неопходно, како би сви били изложени стресу суше у приближно истој фази вегетационог периода. Тако груписан материјал се сејао у одвојеним парцелама, а наводњавање је вршено до појаве прве метлице у свакој групи, тј. до две недеље пред цветање најранијег генотипа у оквиру сваке групе. Три недеље пре бербе, сви генотипови су били оцењени визуелним праћењем препоручених секундарних особина релевантних за стрес суше, који су укључивали број дана између метличења и свилања (*ASI - anthesis silking interval*), *stay green* (мерен на скали 1 - 5, где је 5 била оцена за најбољи *stay green*, тј. 90-100% листова зелене боје), као и укупан изглед генотипа (мереног на скали 1 - 8, где је 8 била оцена за најбољи укупан изглед генотипова у реду, који је обухватао број биљака, број јалових биљака, број клипова, број кочанки без зрна, озрњеност клипа и наливеност зрна). На основу резултата овог дела експеримента, издвојен је 571 генотип кукуруза, као потенцијални извор толерантности на сушу. Одабрани генотипови (571) су наредне године тестирани на три локације: у условима екстремне суше (исти локалитет и водни режим у Египту), као и у условима умереног климата (Земун

Поље и Скопље), у циљу коначног одабира генотипова толерантних на сушу и адаптираних на локалне услове, при чему је поновљена иста експериментална процедура из претходне године. Оцена генотипова је вршена у берби, а као показатељи толерантности, запажане су следеће секундарне особине релевантне за стрес суше: *ASI*, особина *stay green*-а, јаловост биљке, озрњеност клипа и наливленост зрна.

На основу визуелног праћења секундарних особина релевантних за стрес суше (на сва три локалитета), као и на основу мерљивих параметара које чине компоненте приноса (тежина клипа, тежина окласка и тежина зрна), у условима умереног водног дефицита (Земун Поље и Скопље), одабран је 51 генотип као најтолерантнији на стрес суше, истовремено адаптиран на локалне услове. Истовремено са тестирањем припадности одабраног 51 генотипа одређеним хетеротичним групама, на основу укрштања са три различита елитна инбред тестера пореклом из 3 хетеротичне групе - *BSSS*, *Lancaster* и независне), извршено је и двогодишње испитивање опште комбинационе способности укрштања генотипова кукуруза са одабраним инбред тестерима. На основу добијених резултата, финално је одабран 41 генотип - 13 домаћих популација, 13 интродукованих популација и 15 интродукованих инбред линија кукуруза и тиме формирана *core* колекција кукуруза за толерантност према суши.

Испитивање физиолошке и биохемијске основе толерантности на сушу, имало је за циљ да утврди, да ли варијабилност између генотипова, испољена у пољу, постоји и под утицајем симулираног осмотског стреса у лабораторијским условима.

Генотипови су наклијавани три дана на влажном филтер папиру, у мраку на температури од 25°C (*ISTA*, 2007). По наклијавању, клијанци приближно једнаких дужина корена, су пребачени на 25% модификовани *Knor*-ов хранљиви раствор, *pH* 5,6 (Хаџи-Ташковић Шукаловић и Вулетић, 1998). Биљке су гајене на хранљивом раствору 7 дана, у строго контролисаним условима фитотронске коморе (фотопериод 12h, температура $22 / 18^{\circ}\text{C}$, интензитет светлости 40Wm^{-2} , релативна влажност ваздуха 70%). Последњих 48h гајења, половина биљака (третман) је гајена на раствору који је садржао 40g l^{-1} осмотикума (*PEG* 10 000, *Sigma*), упоредо са контролним биљкама које су расле на хранљивом раствору без додавања *PEG*-а, уз непрекидно продувавање ваздухом.

Анализа 48h утицаја осмотског стреса примењеног на 7 дана старе клијанце кукуруза, у фази пре почетка раста секундарних коренова, је укључивала праћење параметара раста корена и надземног дела (дужине, свеже и суве масе), садржаја пролина у корену и листу колориметријском методом (*Bates* и сар., 1973), садржаја укупних растворљивих протеина (*Lowry* и сар., 1951), као и активности растворљивих гвајакोल пероксидаза (*POD*; класа III; *EC* 1.11.1.7; Хаџи-Ташковић Шукаловић и сар., 2005) у корену. Мерење свих параметара је рађено у четири понављања.

Раздвајање протеина је рађено применом методе изоелектричног фокусирања, на 7,5% полиакриламидном гелу (*PAG*), *pH* 2-9, уз константно хлађење на 5°C . Предфокусирање у трајању од 120Vh (30 минута), ради равномерне дистрибуције амфолита (*Servalyte pH* 2-9, *Serva*) у гелу, је извођено на 2000V, 50mA и 10W. Фокусирање узорака финалне концентрације од $7\mu\text{g}$ протеина је извођено на 2000V, 50mA и 15W, у трајању од 2400Vh (120 минута). По завршетку електрофорезе, гел је испран дестилованом водом, а затим инкубиран у

субстрату (100mM K-фосфатни пуфер, pH 6,5, 10% метанолни раствор α -нафтола и 0,03% водоник пероксид), на собној температури у трајању од 10 минута, до појаве плавих трака на местима која одговарају пероксидазним изоформама.

За одређивање генетичке варијабилности генотипова *core* колекције кукуруза за толерантност према суши, извршена је молекуларна карактеризација применом SSR молекуларних маркера на групним узорцима. Изолација ДНК је рађена на леду по измењеној методи Saghai и Maroof (1984), док је SSR-PCR анализа, рађена по протоколу Taramino и Tangey (1996), коришћењем комерцијалних арбитарних прајмера (LKB). Продукти PCR реакције су раздвојени на 8% полиакриламидном гелу (PAGE), у 1 x TBE пуферу, а као маркер је коришћен 100 bp DNK ladder (Fermentas). Електрофореза се одвијала при константној струји од 40mA, у трајању од 100 минута, након које је гел бојен са 1 - 2 μ l EtBr и сликан дигиталним фотоапаратом.

За све посматране морфолошке и физиолошко-биохемијске параметре је урађена једнофакторска анализа варијансе (ANOVA) по комплетно рандомизираним блок дизајну у MSTAT-C статистичком програму. Утицај осмотског стреса је приказан као промена просечних вредности посматраног параметра за третман у односу на контролу (%). Фенотипске корелације између посматраних морфолошких и физиолошко-биохемијских параметара, као и између посматраних параметара и приноса зрна / биљци у пољу, су израчунате применом Pearson-овог коефицијента корелације. На основу посматраних параметара, извршено је груписање генотипова кукуруза, применом факторске анализе главних компонената (PCA), у SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version програму.

Присуство / одсуство трака у SSR анализи је претворено у бинарне податке (0 и 1), који су коришћени као основна матрица за израчунавање генетичке сличности између испитиваних генотипова кукуруза, по методи Jaccard-a, (1908).

На основу матрица генетичких сличности испитиваних генотипова кукуруза, урађена је кластер анализа, применом UPGMA методе у SAHN програму (Sneath и Sokal, 1973), помоћу NTSYS-pc2.1 софтвера (Rohlf, 2000). За сваки дендрограм је израчунат ко-фенетички коефицијент корелације између матрица генетичких сличности по Jaccard-у, а његова значајност је тестирана Mantel-овим тестом, (1967).

На основу матрица генетичких сличности, урађена је кореспонденциона анализа у SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version програму, ради потпунијег сагледавања генетичке сличности испитиваних генотипова кукуруза *core*-а за толерантност на сушу.

У поглављу **Резултати истраживања** су на прегледан начин, кроз табеле, слике и графиконе, приказани резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације.

Контролисањем најважнијих фактора спољашње средине, са циљем експресије генетичких варијација при одређеном стресу, истовремено се врши и идентификација генетичке повезаности толерантности према суши и тзв. секундарних особина од значаја за оплемењивање. На основу визуелног праћења секундарних особина релевантних за стрес суше, у условима контролисане суше, и у условима умереног водног дефицита, као и на основу тестирања опште комбинационе способности генотипова са одабраним инбред тестерима, финално је одабран 41 генотип, као најтолерантнији на сушу и добре комбинационе

способности – 13 домаћих популација, 13 интродукованих популација и 15 интродукованих инбред линија кукуруза. Код свих генотипова, присуство толерантности на сушу је резултирало малим бројем дана између метличења и свилања (*ASI*), у интервалу од 1,31 дана (у условима израженог водног дефицита, Египат), до 2,69 дана (у условима умереног водног дефицита, Скопље). Код свих генотипова, побољшана толерантност на стрес суше у фази цветања, праћена је и редукцијом јаловости биљке, са истим трендом испољавања као измерени *ASI*, крећући се у интервалу од свега 4,41% код интродукованих популација у Египту, до 13,16% код домаћих популација у Земун Пољу. Озрњеност клипа је имала обрнути тренд испољавања у односу на измерени *ASI* и јаловост биљке, и кретала се у интервалу од 78,67% код интродукованих инбред линија у Египту, до 93,08% код интродукованих популација кукуруза у Скопљу. Код свих генотипова, висок проценат озрњености клипа је праћен добром наливеношћу зрна, са просечним вредностима у интервалу од 81,00% код интродукованих инбред линија у Скопљу, до 95,38% код интродукованих популација кукуруза у Египту. Просечна вредност *stay green*-а се кретала у интервалу 1,19 до 2,8., при чему су сви испитивани генотипови показали исти тренд испољавања ове особине: најизраженији је био у Египту, где је и стрес суше био најизраженији, док је најслабије био изражен у Земун Пољу. Остварени просечан принос зрна / биљци код свих генотипова кукуруза је био већи у Земун Пољу у односу на Скопље, а кретао се у интервалу од 60,31г / биљци код интродукованих инбред линија у Скопљу, до 105,28г / биљци код интродукованих популација у Земун Пољу.

Анализа морфо-физиолошке и биохемијске основе толерантности на сушу генотипова *core* колекције кукуруза, рађена је испитивањем утицаја осмотског стреса изазваног дејством 4% *PEG*-а (полиетилен гликол), на клијанце у фази 3-4 листа. Под утицајем *PEG*-а, код свих генотипова је дошло до просечног смањења дужине корена (у интервалу од 11,4% до 28,2%) и надземног дела (у интервалу од 12,0% до 20,0%), као и раста бочних коренова. Код свих генотипова је дошло до просечног смањења свежје масе корена (у интервалу од 16,0% до 33,2%) и надземног дела (у интервалу од 17,0% до 31,1%). Ефекат осмотског стреса на садржај суве масе корена и листа код домаћих и интродукованих популација кукуруза, је био мали, крећући се у интервалу од 0,5% до 4,3% повећања у корену, односно од 0,6% до 0,8% повећања у листу, док је код интродукованих инбред линија био много израженији, са просечним повећањем суве масе корена од 22,2% и листа од 11,4%. Ефекат осмотског стреса на садржај пролина код свих генотипова је био много израженији у корену, доводећи до просечног повећања његове акумулације у интервалу од 35,5% до 59,2%, док се повећање нивоа садржаја пролина у листу кретало у интервалу од 11,4% до 29,1%. Постојање адаптивног одговора код испитиваних генотипова, резултирао је повећаним односом корен - надземни део за све посматране морфо-физиолошке параметре, при чему је највећи однос био за дужину (2,1) и садржај пролина (1,7). Код већине домаћих популација, примењени осмотски стрес је изазвао смањење садржаја укупних растворљивих протеина, у интервалу од 0,66% до 25,31%. Код осталих испитиваних генотипова дошло је како до смањења (у интервалу од 6,2% до 23,3% код интродукованих популација, односно у интервалу од 0,5% до 28,2% код интродукованих инбред линија), тако и повећања садржаја укупних растворљивих протеина (у интервалу од 1,0% до 15,6% код интродукованих популација, односно у интервалу од 3,3% до 67,7% код интродукованих инбред

линија). Под дејством *PEG*-а, дошло је како до смањења (у интервалу од 0,1% до 22,1%, односно од 4,6% до 35,8%), тако и до повећања (у интервалу од 0,9% до 39,75%, односно од 1,09% до 61,65%) активности *POD* на грам свеже масе и специфичне пероксидазне активности у корену клијанаца. Изоензимски *POD* профили су открили извесне генотипске разлике. Код већине генотипова, под утицајем осмотског стреса, дошло је до повећања интензитета трака. Најизраженија, поготово код интродукованих инбред линија кукуруза, била је анјонска изоформа на $pI \sim 5,9$.

Утврђен је висок степен повезаности између параметара раста у корену и листу клијанаца, као и између параметара раста и физиолошко-биохемијских параметара. Корелације су биле статистички високо значајне и негативне између промене садржаја пролина и промене дужине, односно свеже масе, као и статистички високо значајне и позитивне између промене садржаја пролина и промене суве масе. Код интродукованих инбред линија кукуруза, утврђена је статистички значајна негативна корелација између промене садржаја пролина и специфичне *POD* активности ($r = -0,610^*$), као и значајна позитивна корелација између промене специфичне *POD* активности и промене свеже масе ($r = 0,572^*$). Истовременим разматрањем свих испитиваних морфолошких и физиолошко-биохемијских параметара у корену и листу, на присуство и одсуство осмотикума у хранљивом раствору, утврђено је постојање изражене варијабилност међу генотиповима, као и веома сличан начин груписања генотипова у контроли и у третману. Ови резултати указују да су испољене особине клијанаца, при тестирању у различитим условима спољашње средине, генетички детерминисане.

Анализом повезаности одговора кукуруза у раној фази развића у контролисаним лабораторијским условима, са његовим агрономским перформансама у условима стреса суше у пољу, код свих популација, утврђена је статистички значајна позитивна корелација између промене свеже масе корена под дејством 4% *PEG*-а и приноса зрна / биљци ($r = 0,599^*$, домаће и интродуковане популације, Земун Поље, односно $r = 0,573^*$, интродуковане популације, Скопље). Код интродукованих инбред линија је утврђена значајна позитивна корелација између садржаја пролина у корену клијанаца у условима осмотског стреса и приноса зрна / биљци ($r = 0,519^*$, Скопље), као и високо значајна негативна корелација између промене дужине корена клијанаца и приноса зрна / биљци ($r = -0,658^{**}$, Земун Поље).

SSR молекуларном карактеризацијом генотипова *core* колекције кукуруза за толерантност према суши, добијено је 69 полиморфних трака, са просечно 3,8 алела по прајмеру код интродукованих инбред линија, 85 полиморфних трака, са просечно 5,3 алела по прајмеру код интродукованих популација, док је код домаћих популација добијено 155 полиморфних трака, са просечно 8,6 алела по прајмеру. Утврђен је висок степен генетичког диверзитета између генотипова унутар сваке испитиване групе (домаћих популација, интродукованих популација и интродукованих инбред линија кукуруза), при чему је просечна вредност генетичке сличности код домаћих популација износила 0,31, код интродукованих популација је износила 0,54, док је код интродукованих инбред линија, износила 0,37. Најбољи степен поклапања сличности генотипова са њиховим груписањем у кластере је утврђен код домаћих популација ($r = 0,84$), код инбред линија је износио $r = 0,81$, док је код интродукованих популација, иако добар, био најнижи ($r = 0,76$). На основу кореспонденцијалне и кластер анализе *UPGMA* методом

груписања, утврђен је висок степен генетичке варијабилности између генотипова унутар сваке испитиване групе.

У поглављу *Дискусија*, размотрени су резултати ове докторске дисертације и упоређени са резултатима других аутора који су радили на истој или сличној проблематици. Побољшање толерантности кукуруза према стресу суше, као саставног дела многих оплемењивачких програма, захтева поседовање одговарајуће гермплазме, одабир локалитета на којима ће ниво стреса суше бити прецизно контролисан, као и праћење особина релевантних за стрес суше. Интензивније коришћење генетичке варијабилности која се чува и одржава у банци гена Института за кукуруз “Земун Поље”, идентификацијом пожељних особина из неадаптиране и адаптиране гермплазме, изложене утицају одређеног селекционог притиска, омогућено је активностима у оквиру *prebreeding*-а. Резултат његовог успешног спровођења огледа се у стварању језгровне колекције за толерантност према суши, што је и био циљ ове докторске дисертације. Поред добрих *per se* перформанси у пољским условима, на основу праћења секундарних особина од значаја за оплемењивање, за одабир генотипова најтолерантнијих према стресу суше, била је неопходна информација о припадности генотипова одговарајућим хетеротичним групама, на основу укрштања са коришћеним тестерима, као и информација о општој комбинационој способности са коришћеним тестерима. Информација о општој комбинационој способности гермплазме кукуруза омогућава идентификацију природе деловања гена укључених у експресију квантитативних особина (као што је толерантност према суши, принос и компоненте приноса), евалуацију генетичке разноврсности, груписање генотипова у одговарајуће хетеротичне групе (као одлучујућег фактора за ширу употребу гермплазме), адекватан избор родитељских компоненти, процену хетерозиса за принос и компоненте приноса, у циљу стварања хибрида што бољих перформанси. Код свих генотипова кукуруза, повећана толерантност према стресу суше у фази цветања, праћена је малим ASI-јем, ниском јаловошћу биљке, високом озрњеношћу клипа и добром наливношћу зрна, док се *stay green* највише испољио у условима изразитог водног дефицита, што је у потпуној сагласности са истраживањима других аутора.

SSR молекуларна карактеризација је утврдила висок степен генетичког диверзитета, чија процена представља кључни корак у разумевању односа између и унутар генотипова домаћих популација, интродукованих популација и интродукованих инбред линија. Тиме је олакшано успостављање приоритета за њихово коришћење као извора пожељних особина (толерантност према суши) и родитељских компоненти, у процесу стварања комерцијалних хибрида побољшаних перформанси у неповољним условима спољашње средине.

На основу резултата примењене кореспонденцијалне и кластер анализе *UPGMA* методом груписања, потврђено је груписање генотипова у одговарајуће хетеротичне групе на основу тестирања њихове комбинационе способности са коришћеним инбред тестерима. Како хетеротичне групе представљају одлучујући фактор за ширу употребу гермплазме у циљу добијања хибрида што бољих перформанси, употреба SSR молекуларних маркера додатно је помогла у њиховом дефинисању, у сагледавању односа између генотипова на нивоу ДНК секвенце, као и у сврставању генотипова у већ постојеће, али и нове хетеротичне групе, са циљем њиховог што ефикаснијег коришћења у савременим програмима оплемењивања кукуруза.

Метод *screening*-а генотипова у раној фази развића - фази клијанца на утицај водног дефицита у лабораторијским условима, изазивањем осмотског стреса (применом осмотикума полиетилен гликола - *PEG*), омогућила је рано утврђивање присуства толерантности на примењени стрес, као и постојање варијабилности међу генотиповима. Доводећи до редукције осмотског потенцијала, штетан ефекат *PEG*-а на клијанце се испољио у спречавању усвајања воде кореновим системом, што резултује смањеном способношћу издуживања примарног корена, као и редукцијом метаболичке активности. Редукција ћелијског тургора, насталог услед дејства водног дефицита, посебно неповољно делује на физиолошки процес ћелијског раста. Синтеза и акумулација једињења која доприносе снижавању осмотског притиска, као што је пролин, представља механизам осмотског прилагођавања, адаптивног одговора биљке у превазилажењу осмотског стреса насталог услед дејства водног дефицита и израженог осмотског притиска. Пролин учествује у регулацији митохондријалне активности и представља окидач специфичне генске експресије, која може бити од изузетне важности за опоравак биљке од стреса. Резултати ових истраживања су сагласни са чињеницом да је степен осмотског стреса у директној корелацији са нивоом акумулираног пролина, да се са повећањем интензитета стреса повећава и ниво садржаја пролина, као и да концентрација пролина може послужити као добар показатељ нивоа стреса. Како коренов систем има кључну улогу у превазилажењу штетног утицаја водног дефицита, његова смањена способност усвајања воде и хранљивих материја, што је директна последица дејства *PEG*-а, резултирала је смањењем интензитета деобе и издуживања ћелија корена и надземног дела, као и смањеном синтезом градивних материја. Иако резултати ових испитивања, добијени у раној фази развића биљке, не указују директно на учешће пролина у толерантности према суши, може се претпоставити да ће повећање садржаја пролина позитивно стимулисати адаптивни механизам биљке за превазилажење и опоравак од стреса водног дефицита у каснијим фазама развића. Како је раст углавном процес који захтева утрошак енергије, може се претпоставити да акумулација пролина у условима осмотског стреса, доприноси уштеди енергије инхибирајући раст корена и представља за биљку извор енергије и аминокиселина група по престанку стреса.

Због своје улоге у “гушењу” штетних радикала (*scavenging*), у одржавању редокс статуса и метаболизма фенола, испитана је могућа корелација пролина са пероксидазном активношћу у условима осмотског стреса. Утврђено је да генотипови са мање израженом редукцијом раста у условима стреса, испољавају повећану POD активност и нижу стопу акумулације пролина. Резултати који се тичу односа пролина и POD активности, могу се објаснити водоник пероксид индукованом акумулацијом пролина. Пероксидазе класе III, локализоване у апопласту, вакуолама и митохондријама, су укључене у регулацију концентрације водоник пероксида. Могло би се очекивати да ниже активности растворљивих пероксидаза у условима стреса, за последицу могу имати повећање садржаја водоник пероксида у цитосолу, које би могло бити укључено у процесе сигналне трансдукције, доводећи до акумулације пролина активирањем његове биосинтезе. Поред активације биосинтезе пролина, инхибиција деградације пролина, услед инхибиторног дејства водоник пероксида на ензим дехидрогеназу пролина у митохондријама, не може бити искључена.

На основу испитивања повезаности одговора кукуруза у раној фази развића у контролисаним лабораторијским условима, са његовим агрономским перформансама у условима стреса суше у пољу, могло би се претпоставити да би генотипови са слабије развијеним кореновим системом у фази клијанца, као последица штетног дејства осмотикума, могли давати већи принос. То је у потпуној сагласности са резултатима испитивања односа раног пораста корена клијанца кукуруза и ефекта суше на принос, у којима је утврђено да је већи принос у условима суше у корелацији са редукованом биомасом корена.

У поглављу **Закључци** су сумирани резултати спроведених истраживања. Идентификован је и одабран 41 генотип кукуруза, као најтолерантнији на стрес суше, истовремено адаптиран на локалне услове и добре комбинационе способности - 13 домаћих популација, 13 интродукованих популација и 15 интродукованих инбред линија, чиме је формирана *core* колекција за толерантност према суши. Од изузетног значаја је било издвајање 6 генотипова, који су се добро комбиновали са сва три коришћена тестера, чинећи потенцијално нов и сасвим различит извор пожељне гермплазме. Испитивана морфолошко-физиолошка и биохемијска основа толерантности на сушу у раној фази развића кукуруза у условима симулираног осмотског стреса, потврдила је постојање варијабилности између генотипова, испољене у условима стреса суше у пољу. *SSR* молекуларна карактеризација је утврдила висок степен генетичког диверзитета између генотипова унутар сваке испитиване групе, и потврдила груписање генотипова *core* колекције кукуруза на толерантност према суши у одговарајуће хетеротичне групе, на основу њихове комбинационе способности са коришћеним тестерима.

У поглављу **Литература**, наведен је списак од 266 референци које су у докторској дисертацији коришћене као основ за примењене методе истраживања и за поређење резултата са другим истраживањима. Референце су сложене по абecedном реду и написане правилно, у складу са прихваћеним стандардима за навођење.

3. Закључак и предлог

У докторској дисертацији Наталије Кравић, циљ је био формирање *core* колекције кукуруза за толерантност према стресу суше, на основу идентификације и одабира супериорних генотипова из банке гена Института за кукуруз „Земун Поље”, као и њихова детаљнија карактеризација физиолошко-биохемијским методама и методама молекуларне генетике. Одабрани генотипови, који у себи садрже повећану толерантност према суши, биће коришћени као полазна основа за примену метода класичне селекције, за проширивање генетичке основе елитног материјала, поправку постојећих и добијање нових инбред линија и хибрида толерантних према суши, са циљем остваривања већег и стабилнијег приноса у таквим условима.

У светлу све присутнијих промена климе и тренда глобалног отопљавања, побољшана способност кукуруза да издржи периоде суше је есенцијална, због чега је и тема ове докторске дисертације веома интересантна и изузетно актуелна.

Докторска дисертација Наталије Кравић је научно потврђена објављивањем рада у часопису *Acta Physiologiae Plantarum*, који се налази на SCI

листи, под насловом „**Growth, proline accumulation and peroxidase activity in maize seedlings under osmotic stress**”.

Истраживања у докторској дисертацији обављена су у потпуности према програму предвиђеном у пријави. Посебно треба истаћи да резултати које је кандидаткиња добила у својим истраживањима, представљају оригинална решења и драгоцено искуство за даљи оплемењивачки рад на кукурузу.

Узимајући у обзир све наведено, комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Наталије Кравић, дипл. биолога, под насловом: **“Анализа генетичке варијабилности кукуруза на толерантност према суши”**, и предлаже Научно-наставном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да ову оцену усвоји, чиме би се пружила могућност кандидату да приступи јавној одбрани ове докторске дисертације.

У Београду,
27.02.2013. године

Чланови Комисије:

Др Гордана Шурлан Момировић, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
(Генетика)

Др Славен Продановић, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
(Оплемењивање биљака)

Др Виолета Анђелковић, виши научни сарадник
Институт за кукуруз “Земун Поље”
(Биотехничке науке - пољопривреда)

Др Мирјана Вулетић, научни саветник
Институт за кукуруз “Земун Поље”
(Физиологија биљака)

Др Лада Живковић, доцент
Фармацеутски факултет Универзитета у Београду
(Генетика)

Прилог:

Рад објављен у часопису који је на SCI листи:

Natalija Kravic, Ksenija Marković, Violeta Anđelković, Vesna Hadži-Tašković Šukalović; Vojka, Babić; Mirjana, Vuletić, (2013): Growth, proline accumulation and peroxidase actyvity in maize seedlings under osmotic stress, Acta Physiol Plant, 35:233-239