

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 277/1-7.6.
Датум: 30.10.2013. 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 Александре Димитријевић.

Кандидат **Александра (Миодраг) Димитријевић, мастер**, пријавила је докторску дисертацију под називом: «УПОТРЕБА МОЛЕКУЛАРНИХ МАРКЕРА И *in vitro* МЕТОДА У ДЕТЕКЦИЈИ ОТПОРНОСТИ СУНЦОКРЕТА ПРЕМА ТРИБЕНУРОН-МЕТИЛУ». из научне области Ратарство и повртарство.

Универзитет је дана 15.03.2012. године, својим актом 02 број 06-17650/11-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «УПОТРЕБА МОЛЕКУЛАРНИХ МАРКЕРА И *in vitro* МЕТОДА У ДЕТЕКЦИЈИ ОТПОРНОСТИ СУНЦОКРЕТА ПРЕМА ТРИБЕНУРОН-МЕТИЛУ».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације Александре Димитријевић, дипл. инж., образована је на седници одржаној 24.04.2013. године, одлуком Факултета број 356/7-5.6., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област

1. др Гордана Шурлан-Момировић, редовни професор, Генетика,
2. др Славен Продановић, редовни професор, Оплећењивање биљака,
3. др Драгана Миладиновић, научни саветник, Оплећењивање биљака и биотехнологија,
4. др Томислав Живановић, редовни професор, Генетика,
5. др Сениша Јоцић, научни саветник, Оплећењивање биљака.

Наставно-научно веће Пољопривредног факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације, на седници одржаној 30.10.2013. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 277/1-7.6.
Датум: 30.10.2013. 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 30.10.2013. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **АЛЕКСАНДРА ДИМИТРИЈЕВИЋ, мастер** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«УПОТРЕБА МОЛЕКУЛАРНИХ МАРКЕРА И *in vitro* МЕТОДА У ДЕТЕКЦИЈИ ОТПОРНОСТИ СУНЦОКРЕТА ПРЕМА ТРИБЕНУРОН-МЕТИЛУ».**

II Универзитет је дана 15.03.2012. године, својим актом број 06-17650/11-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Imerovski, I., **Dimitrijević, A.**, Miladinović, D., Dedić, B., Jocić, S., Kovačević, B., Obreht, D., 2013. Identification of PCR markers linked to different Or genes in sunflower. Plant Breeding No 132. p. 115-120.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору др Гордани Шурлан-Момировић, редовном професору, 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
Александре Димитријевић, мастера**

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду од 26.06.2013. године, именована је Комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације Александре Димитријевић, мастера: „Употреба молекуларних маркера и *in vitro* метода у детекцији отпорности сунцокрета према трибенурон-метилу“.

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 Драгана Миладиновић, научни саветник Института за ратарство и повртарство, Нови Сад, др Томислав Живановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Сениша Јоцић, научни саветник Института за ратарство и повртарство, Нови Сад, прегледала је и оценила докторску дисертацију и подноси Већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација мастера Александре Димитријевић, написана је на 92 страница, у оквиру којих се налазе 5 табела, 8 графикона и 35 слика. Испред основног текста налазе се резимеи са кључним речима на српском и енглеском језику, коришћене скраћенице, као и приказ садржаја. У докторској дисертацији је цитирано, и у литератури наведено, 148 референци.

Дисертација се састоји из следећих поглавља: Увода (стр. 1-3), Циља истраживања (стр. 4), Прегледа литературе (стр. 5-20), Радне хипотезе (стр. 21), Материјала и метода (стр. 22-28), Резултата (стр. 29-59), Дискусије (стр. 60-66), Закључака (стр. 67-69), Литературе (стр. 70-84) и Прилога (стр. 85-92).

2. Приказ и анализа докторске дисертације

Кандидаткиња Александра Димитријевић је у **Уводу** истакла да је сунцокрет једна од најважнијих уљаних биљних врста са високим потенцијалом родности савремених хибрида, и исто тако је истакла негативан утицај присуства корова у пољима сунцокрета на принос, као и стварање хибрида толерантних према хербицидима.

Кандидаткиња је предочила значај хербицида који инхибишу активност ензима ацетохидроксикиселе синтазе (AHAS) у гајењу различитих пољопривредних култура, навела групе хербицида који припадају AHAS инхибиторима, а од којих је једна сулфонилуреа. Трибенурон-метил је активна материја хербицида из групе сулфонилуреа.

У уводу дисертације је наведена прва популација дивљег сунцокрета (ANN-KAN) која је толерантна према трибенурон-метилу, као и ген толерантности који је пренесен у комерцијалне хибриде сунцокрета. Кандидаткиња је навела да је толерантност према АНАS инхибиторима узрокована променом једног нуклеотида (SNP) у секвенци гена који кодира ензим АНАS, и да се ген толерантности на трибенурон-метил наслеђује доминантно.

Мастер Александра Димитријевић је нагласила значај брзог уноса гена толерантности у комерцијалне хибриде, као и предност употребе *in vitro* тестова и развијање кодоминантних молекуларних маркера, који омогућују разликовање не само толерантних од осетљивих генотипова, већ и хомозиготно толерантних и хетерозиготних генотипова сунцокрета.

Циљ истраживања ове докторске дисертације је имплементирање техника модерне биотехнологије и молекуларне биологије у циљу скраћивања дуготрајног процеса оплемењивања на толерантност према трибенурон-метилу (активна материја хербицида из групе сулфониуреа), што практично значи креирати поуздан *in vitro* тест за детекцију толерантних генотипова сунцокрета и кодоминантни молекуларни маркер погодан за коришћење у маркер асистираној селекцији и уношење гена толерантности у хибриде и линије сунцокрета повратним укрштањем.

У поглављу **Преглед литературе** изнети су доступни литерарни извори из области која је предмет проучавања ове докторске дисертације. Први део прегледа литературе је посвећен сунцокрету као важној уљаној култури са посебним нагласком на развој мапе везаности (linkage map, LG) сунцокрета и развој различитих врста молекуларних маркера за анализу генома сунцокрета. Други део је посвећен АНАS инхибиторима, сулфониуреи и трибенурон-метилу, као активној супстанци сулфониуреа.

Кандидаткиња је у оквиру овог поглавља навела до сада откривене генотипове сунцокрета који су толерантни према различитим АНАS инхибиторима, као и методе које су коришћене за добијање сунцокрета толерантног према АНАS инхибиторима. Посебан део овог поглавља, кандидаткиња је посветила представљању различитих *in vitro* тестова који су развијени за детекцију толерантних генотипова различитих биљних врста према хербицидима, као и тестовима који су развијени код сунцокрета. Осим тога, кандидаткиња је навела које су до сада промене нуклеотида у секвенци гена *ahas* довеле до развијања толерантности према АНАS инхибиторима, као и који су до сада коришћени молекуларни маркери за детекцију толерантних генотипова.

У **Радној хипотези** мастер Александра Димитријевић је пошла од чињенице да се толерантност према трибенурон-метилу наслеђује доминантно и да је условљена променом једног нуклеотида у секвенци гена који кодира АНАS ензим. За развој *in vitro* теста полази се од претпоставке да биљке апсорбују трибенурон-метил, како лисном површином, тако и кореном, те да ће клијанци сунцокрета апсорбовати хербицид кореновим системом из чврсте MS подлоге, што ће довести до застоја у развоју клијанаца сунцокрета који нису толерантни на трибенурон-метил. У овој докторској дисертацији се очекује развој теста који ће омогућити разликовање не само толерантних од осетљивог генотипа, већ и хомозиготно од хетерозиготно толерантних генотипова сунцокрета.

За идентификацију најповољнијег молекуларног маркера употребиће се SSR маркери блиско везани за ген *Ahas11-2* у циљу провере могућности њихове

употребе у маркер асистираној селекцији. За дизајнирање кодоминантног молекуларног маркера анализираће се секвенце гена сунцокрета *Ahas11-2* (мутирана секвенца) и *ahas11* (секвенца дивљег типа) биоинформатичким путем. На основу секвенци гена ће се дизајнирати прајмери који умножавају ген *Ahas11-2*, а пре свега део гена који садржи место мутације. Даљом анализом те секвенце и присуства рестрикционог места на месту SNP-а идентификоваће се рестрикциони ензим који ће сећи секвенцу на месту мутације. Такође се очекује да се у овој дисертације развије кодоминантни молекуларни маркер.

У поглављу **Материјал и методе** кандидаткиња је дефинисала одабране хибриде сунцокрета за развој *in vitro* теста. Одабрала је девет различитих хибрида: четири хомозиготно толерантна (HoF, HoT, HoP и HoM), четири хетерозиготно толерантна (HtF, HtT, HtP и HtM) према трибенурон-метилу и један осетљив хибрид (Os). Семе сунцокрета је након стерилизације наклијавано 2 дана у мраку на 25°C, те су за развој теста коришћени клијанци приближно исте величине око 1,5 cm. За тестирање кандидаткиња је користила чврсту хранљиву MS подлогу различите pH (pH 7 и pH 8) вредности. У хранљиву подлогу је додаван раствор хербицида чија је активна материја трибенурон-метил, тако да је коначна концентрација хербицида у подлози била 2,0 µl; 2,5 µl; 3,0 µl; 3,5 µl и 4,0 µl. Клијанци су постављани у MS подлогу, у Ерленмајер посуде од 250 ml. Експеримент је постављен као потпуно случајан план, а сваки третман је постављен у четири понављања. Ерленмајер посуде су постављене у коморе на 25°C и фотопериод 16h дан и 8h ноћ. У циљу одређивања најпогоднијег дана за разликовање хомозиготно толерантних од хетерозиготно толерантних генотипова, вршена је прелиминарна анализа развоја клијанаца три генотипа сунцокрета (HoF, HtF и Os) у периоду од 16 дана. Касније су све анализе развоја надземног дела и корена клијанаца на MS подлози вршене након 12 дана третмана. Анализирана је свежа маса надземног дела биљке (g) и корена (g), као и сува маса надземног дела (g) и корена (g). Добијени подаци су обрађени методом анализе варијансе, док су разлике између третмана анализиране тестом најмање значајне разлике (LSD тестом) у програму STATISTICA10.

Молекуларна анализа је обухватила употребу SSR (Simple Sequence Repeat) маркера и ДНК-специфичних маркера. Одабран биљни материјал се састојао од родитељске линије (SU-T-42gr) толерантане на трибенурон-метил, осетљиве родитељске линије (RHA-N-49), F₁ и 120 биљака F₂ потомства. Толерантност биљака F₂ генерације према трибенурон-метилу је тестирана у пољу и оцена је позната. Геномска ДНК је изолована из листова младих биљака. Вршена је молекуларна анализа са 8 SSR молекуларних маркера блиско позиционираних у односу на ген *Ahas11-2*. Кандидаткиња је оптимизовала реакцију умножавања ДНК SSR маркерима. За даљу молекуларну анализу кандидаткиња је дизајнирала 8 почетних (forward) и 8 крајњих (reverse) прајмера за секвенцу *Ahas11-2* гена у програму Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) на основу пријављене секвенце у NCBI банци гена (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> - приступни број: AY541453.1). Такође, је оптимизовала услове за умножавање ДНК дизајнираним прајмерима. Осим наведеног, кандидаткиња је на основу секвенци гена *Ahas11-2* и *ahas11* пронашла рестрикциона места која се разликују између мутиране секвенце и секвенце дивљег типа и ензиме који секу место мутације или секвенцу дивљег типа у програму NEBcutter2 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Мастер Алекса́нда Димитријевић је

оптимизовала реакцију дигестије за сва три ензима, те је захваљујући овим ензимима омогућен развој CAPS маркера. Продукти умножавања ДНК-специфичним прајмерима и рестрикције ензимима су раздвојени на 2% MetaPhor агарозном гелу (Lonza, Switzerland). Гелови су снимани системом Bio-Print (Vilber Lourmat, Francuska), док је за одређивање дужине фрагмената коришћен BIO-CAPT V.97 (Vilber Lourmat, Francuska). Односи раздвајања развијених маркера су тестирани χ^2 тестом под претпоставком да је однос раздвајања у случају кодоминације 1:2:1.

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

Александра Димитријевић је у подпоглављу *Развој in vitro тесна* утврдила да је најбољи дан за резликовање хомозиготно толерантних од хетерозигота дванаести (12) дан од дана постављања клијанаца сунцокрета на подлогу. Стога су све анализиране вредности масе мерене 12-тог дана од постављања на подлогу. Након три дана развоја биљака на чврстој MS подлози, развој корена код осетљивог генотипа је заустављен у свим третманима, а код неких биљака, које су углавном гајене на рН 8, уочена је некроза корена. За разлику од биљака осетљивих на трибенурон-метил, биљке хомозиготно толерантне и већина биљака хетерозиготних генотипова су наставила да се развијају. Уочена је и разлика у морфологији корена између хомозиготно и хетерозиготно толерантних биљака. Корен свих генотипова у контролама је био добро развијен и није уочена разлика у морфологији корена између рН 7 и 8 у контролама.

У подпоглављу *Анализа параметара свеже масе надземног дела биљке*, АНОВА је показала да је на обе рН вредности дошло до статистички значајног смањења како свеже, тако и суве масе масе надземног дела свих третираних осетљивих биљака у поређењу са контролом. Значајано смањење свеже масе надземног дела свих испитиваних хетерозиготних генотипова у односу на контролу (HtF - 1,6 g; HtT - 1,9 g; HtP - 1,9 g; HtM - 1,5 g) је забележено на третманима са 3,5 μ M (HtF - 0,7 g; HtT - 1,6 g; HtP - 1,5 g; HtM - 0,8 g) и 4,0 μ M хербицида (HtF - 0,7 g; HtT - 1,7 g; HtP - 0,6 g; HtM - 0,9 g). Третман трибенурон-метилом или није имао утицај или је имао позитиван утицај на надземну масу хомозиготних генотипова. На рН 8 је уочено значајано смањење масе надземног дела свих испитиваних хетерозиготних генотипова у односу на контролу (HtF - 0,9 g; HtT - 1,8 g; HtP - 1,8 g; HtM - 1,4 g) на третманима са 3,0 μ M (HtF - 0,6 g; HtT - 1,4 g; HtP - 0,9 g; HtM - 1,0 g), 3,5 μ M (HtF - 0,6 g; HtT - 1,2 g; HtP - 1,1 g; HtM - 0,8 g) и 4,0 μ M хербицида (HtF - 0,6 g; HtT - 1,0 g; HtP - 0,8 g; HtM - 1,1 g). Генерално, третман хербицидом није имао ефекат на надземну масу хомозиготно толерантних генотипова, осим код генотипа HoT при третману са 4,0 μ M хербицида, где је уочен негативан утицај хербицида на масу (контрола - 1,5 g; 4,0 μ M - 1,2 g).

АНОВА суве масе надземног дела биљке је показала да је дошло до статистички значајног смањења суве масе генотипова HtF, HtP и HtM, док ово смањење није било статистички значајно код генотипа HtT, при чему се маса у контроли и третманима кретала у интервалу од 0,09 g до 0,11 g. Генерално, третмани хербицидом нису утицали на суву масу хомозиготно толерантних генотипова, сем при третману са највишом испитиваном концентрацијом хербицида код генотипа HoT (контрола - 0,01 g; 4,0 μ M - 0,12 g) и HoP (контрола -

0,01 g; 4,0 μ M - 0,08 g). На рН 8, третман са 4,0 μ M хербицида је довело до значајног смањења суве масе свих хетерозиготних генотипова (HtF - 0,07 g; HtT - 0,07 g; HtP - 0,07 g; HtM - 0,07 g) у односу на контролу (HtF - 0,09 g; HtT - 0,14 g; HtP - 0,10 g; HtM - 0,10 g), док третмани хербицидом нису имали ефекат на суву масу хомозиготно толерантних генотипова.

АНОВА анализа свеже масе корена биљке на рН 7 је показала да је третман хербицидом довео до смањења свеже масе корена свих третираних хетерозиготно толерантних генотипова у односу на контролу (HtF - 0,8 g; HtT - 2,0 g; HtP - 1,3 g; HtM - 0,8 g) при третману са 3,0 μ M (HtF - 0,4 g; HtT - 0,6 g; HtP - 1,1 g; HtM - 0,6 g), 3,5 μ M (HtF - 0,2 g; HtT - 0,7 g; HtP - 0,9 g; HtM - 0,3 g) и 4,0 μ M (HtF - 0,2 g; HtT - 0,6 g; HtP - 0,4 g; HtM - 0,3 g) хербицида. Третман трибенурон-метилом није утицао на свежу масу испитиваних хомозиготно толерантних генотипова. АНОВА анализа свеже масе корена на рН 8 је показала да је третман хербицидом довео до смањења масе корена свих испитиваних хетерозиготно толерантних генотипова, осим код генотипа HtP третираним са 2,0 μ M хербицида (контрола - 0,8 g ; 2,0 μ M - 0,9 g), док третман хербицидом није утицао на свежу масу корена хомозиготно толерантних генотипова. Изузетак је генотип HoF третиран са 4,0 μ M хербицида (контрола - 1,2 g; 4,0 μ M - 0,7 g).

У подпоглављу **Анализа суве масе корена биљке**, АНОВА је на рН 7 показала нерегуларност приликом анализе утицаја третмана хербицидом на суву масу корена хетерозиготних генотипова. Код генотипа HtF је уочено значајно смањење суве масе у свим третманима, сем на 3,0 μ M (контрола - 0,05 g ; 3,0 μ M - 0,04 g), док код HtP уочено смањење у третманима са 2,0 μ M и 2,5 μ M хербицида (контрола - 0,06 g; 2,0 μ M - 0,04 g; 2,5 μ M - 0,04 g), а код HtM са 4,0 μ M хербицида (контрола - 0,04 g; 4,0 μ M - 0,03 g). Третман трибенурон-метилом или није имао утицај или је имао позитиван утицај на суву масу хомозиготних генотипова, сем код HoM у третману са 2,5 μ M хербицида, где је дошло до значајног смањења суве масе у односу на контролу (контрола - 0,05 g; 2,5 μ M - 0,03 g). На рН 8, уочено је значајно смањење суве масе корена свих тестираних хетерозиготно толерантних генотипова при употреби виших концентрација хербицида (третманини са 3,5 μ M (HtF - 0,02 g; HtT - 0,03 g; HtP - 0,02 g; HtM - 0,02 g) и 4,0 μ M хербицида (HtF - 0,03 g; HtT - 0,02 g; HtP - 0,03 g; HtM - 0,02 g)) у односу на контролу (HtF - 0,07 g; HtT - 0,05 g; HtP - 0,04 g; HtM - 0,03 g). Третмани хербицидом нису утицали на суву масу корена хомозиготно толерантних генотипова, осим на HoF у третману са 4,0 μ M хербицида где је уочено смањење суве масе (контрола - 0,07 g; 4,0 μ M - 0,05 g).

Мастер Александра Димитријевић је у подпоглављу доктората **Употреба SSR маркера за анализу гена Ahas1-2** који се односи на молекуларна испитивања SSR маркерима утврдила да је оптималан програм за умножавање свим маркерима TOUCH DOWN 3. Од 9 испитиваних маркера са LG 9, 8 је умножило фрагменте различите дужине код хомозиготно толерантне и осетљиве родитељске линије, тј. показали су се као полиморфни. Једини мономорфни маркер са LG 9 је био ORS 1220 који је умножио фрагмент дужине 255 bp код свих испитиваних генотипова. У оквиру подпоглавља **Молекуларна анализа гена Ahas1-2**, кандидаткиња је креирала PCR програм за умножавање ДНК дизајнираним прајмерима, те тестирала различите комбинације прајмера за умножавање Ahas11-2 гена у циљу проналаска најбољих комбинација. Парови прајмера ForBru-RevBru, For5-Rev4, For2-Rev3 i For2-Rev1 су умножили већи број фрагмената, поготову на нижим

температурама везивања прајмера (T_a), док су на вишим T_a умножили један фрагмент: ForBru-RevBru (331 bp), For5-Rev4 (620 bp) и For2-Rev1 (680 bp). Парови прајмера For1-Rev8 (117 bp), ForBru-Rev3 (690 bp), For5-Rev1 (328 bp) и ForBru-Rev4 (328 bp) су умножили један фрагмент на свим T_a . За дигестију продукта умножавања ДНК-специфичним прајмерима, кандидаткиња је, након анализе рестрикционих места на секвенцама гена *Ahas11-2* и *ahas11* одабрала ензиме који су омогућили разликовање ове две секвенце на основу распореда рестрикционих места. То су ензими: Kpn2I (BspEI), BseDI (BsaII) и BcnI (NciI). Кандидаткиња је извршила оптимизацију реакције дигестије рестрикционим ензимима, тако да је дигестија вршена са 3U ензима 4h на 37°C и 55°C. Маркери CAPS_{For4-Rev2} и CAPS_{For6-Rev5} су се показали као доминантни за испитивану особину толерантности сунцокрета према трибенурон-метилу, док су се CAPS_{ForBru-Rev4}, CAPS_{ForBru-Rev3}, CAPS_{For3-Rev6}, CAPS_{For7-Rev7}, CAPS_{For8-Rev7} и CAPS_{For5-Rev4} показали као кодоминантни. Ови маркери су се, уједно показали и као најповољнији маркери за употребу у маркер асистираној селекцији. Маркер CAPS_{For5-Rev4} је употребљен за анализу F₂ генерације. У оквиру F₂ генерације, анализирано је 120 биљака од којих је 29 било хомозиготно толерантно, 56 хетерозиготно толерантно и 35 осетљиво према трибенурон-метилу. Профили добијени употребом сва три маркера: CAPS_{For5-Rev4}(BcnI), CAPS_{For5-Rev4}(Kpn2I) и CAPS_{For5-Rev4}(BseDI) су били у сагласности са оценом на пољу. На основу резултата χ^2 теста израчуната је вероватноћа за ниво значајности 0.05 на основу чега је прихваћена хипотеза да је толерантност сунцокрета према трибенурон-метилу контролисана једним доминантним геном. CAPS_{For5-Rev4}(Kpn2I) је умножио фрагменте дужине 183 bp и 437 bp код толерантног родитеља, док је код осетљивог родитеља умножен један фрагмент дужине 620 bp. CAPS_{For5-Rev4}(BcnI) је умножио фрагмент дужине 259 bp код толерантне линије, док код осетљиве није. Овај маркер је умножио и фрагмент дужине 152 bp код осетљиве линије, док се овај фрагмент није јавио у профилу толерантне линије. CAPS_{For5-Rev4}(BseDI) је код толерантног генотипа умножио фрагмент дужине 465 bp, који није умножен код осетљивог генотипа, док је код осетљивог и хетерозиготно толерантног генотипа умножен фрагмент дужине 437 bp, који није умножен код толерантног родитеља.

У Поглављу *Дискусија* су размотрени резултати истраживања ове докторске дисертације и упоређени одговарајућом литературом.

Раст осетљивог генотипа је у *in vitro* условима био заустављен, што је у складу са већином доступних литерарних података. Уочена је разлика у морфологији третираних хомозиготно и хетерозиготно толерантних генотипова сунцокрета. На рН 8, хербицид је имао јачи утицај на раст корена у односу на раст надземног дела на основу не само вредности свеже, већ и суве масе. Током тестирања толерантности, трибенурон-метил се показао као добар инхибитор раста корена, самим тим што је третман трибенурон-метилом утицао на развој корена, како хетерозиготно толерантних генотипова, тако и биљака осетљивог генотипа. Код биљака осетљивог генотипа је на рН 8 уочена некроза врха корена, слично као и код осетљивих биљака сунцокрета према имазапиру. Кандидат је оценио да је од свих особина свежа маса корена најбоља особина за детекцију толерантних генотипова. Кандидат је своје резултате поткрепио доступним литерарним наводима који указују на исте и/или сличне резултате.

Од свих тестираних SSR маркера, ни један се није показао као повољан за употребу у маркер асистираној селекцији због удаљености од испитиваног гена

толерантности *Ahas11-2*. Од девет испитиваних маркера, код два су се појавили нулти алели, што се може јавити као последица уношења гена *Ahas11-2* из дивљег сродника у гајени сунцокрет услед одсуства хомологије између ове две врсте. Од десет развијених CAPS маркера, четири маркера су била доминантна, а шест кодоминантна. Доминантни маркери су се јавили услед умножавања и дела секвенци гена *ahas2* и/или *ahas3* који су хомологи са секвенцом гена *Ahas11-2*, док су прајмери коришћени за развој кодоминантних маркера омогућили изолацију секвенце гена *Ahas11-2*. Маркери CAPS_{ForBru-Rev4}, CAPS_{ForBru-Rev3}, CAPS_{For3-Rev6}, CAPS_{For7-Rev7}, CAPS_{For8-Rev7} и CAPS_{For5-Rev4} су се показали као кодоминантни маркери за детекцију толерантности сунцокрета према трибеурон-метилу. Ови маркери имају предност над доминантним маркерима, јер се њиховом употребом знатно скраћује дуг процес оплемењивања током конверзије линија и хибрида сунцокрета у толерантне форме у маркер асистираној селекцији. Сва три употребљена рестрикциона ензима (Kpn2I (BspEI), BseDI (BsaJI) i BcnI (NciI)) су се показала као погодна за детекцију SNP-а у комбинацији са било којим од употребљених комбинација прајмера. Ензими Kpn2I (BspEI), BseDI (BsaJI), BcnI (NciI) врше дигестију умножене секвенце на месту мутације или секвенцу дивљег типа, те су омогућили разликовање толерантних и осетљивог генотипа. Различити рестрикциони ензими су до сада коришћени за детекцију C-T мутације, међутим према нашим сазнањима, ензими који су коришћени са детекцију SNP-а у овом раду до сада нису коришћени за развијање CAPS маркера за детекцију гена толерантности према сулфонилуреама.

У поглављу **Закључак** кандидаткиња је у кратким тезама изнела најрелевантније чињенице до којих је дошла на основу својих проучавања.

In vitro тест је омогућио разликовање не само толерантних од осетљивог (Os) генотипа сунцокрета, већ и хомозиготно толерантних (HoF, HoT, HoP, HoM) од хетерозиготно толерантних генотипова (HtF, HtT, HtP, HtM) на трибенурон-метил. Развој биљака осетљивог генотипа сунцокрета (Os) је заустављен у свим третманима трибенурон-метилом три дана након постављања клијанаца сунцокрета на MS подлогу. Свежа маса (g) се показала корисна за разликовање хомозиготно од хетерозиготно толерантних генотипова, за разлику од суве масе (g). Разликовање осетљивог генотипа сунцокрета од толерантних је омогућено петог дана третмана, док је разликовање хомозиготно толерантних генотипова од хетерозиготних омогућено дванаестог дана третмана трибенурон-метилом.

Узимајући у обзир особину свеже масе корена, оптимална комбинација концентрације хербицида и рН је 3,0 μ M рН 7, јер је на овом третману омогућено разликовање хомозиготно толерантних од хетерозиготних генотипова сунцокрета (контрола: HoF - 1,1 g; HoT - 1,1 g; HoP - 0,9 g; HoM - 0,9 g; 3,0 μ M : HoF - 1,0 g; HoT - 1,1 g; HoP - 1,1 g; HoM - 0,8 g; контрола: HtF - 0,8 g; HtT - 2,0 g; HtP - 1,3 g; HtM - 0,8 g; 3,0 μ M : HtF - 0,4 g; HtT - 0,6 g; HtP - 1,1 g; HtM - 0,6 g). Међутим, уколико се посматра и особина свеже масе надземног дела онда се као најбољи третман показао 3,5 μ M хербицида на рН 7 (контрола: HoF - 1,2 g; HoT - 1,5 g; HoP - 1,3 g; HoM - 1,4 g; 3,5 μ M : HoF - 1,3 g; HoT - 1,7 g; HoP - 1,2 g; HoM - 0,5 g; контрола: HtF - 1,6 g; HtT - 1,9 g; HtP - 1,3 g; HtM - 1,9 g; 3,5 μ M : HtF - 0,7 g; HtT - 1,6 g; HtP - 0,9 g; HtM - 1,5 g).

Употребом виших концентрација хербицида на рН 7 уочен је добар развој биљака хомозиготно толерантних генотипова, док су биљке хетерозиготних

генотипова биле слабије развијене без обзира на утицај осталих гена генома сунцокрета („genetic background“).

На рН 8 дошло је до смањења свеже масе појединих генотипова при третману са 4,0 μM хербицида, што указује на јаче дејство хербицида у условима више рН (маса корена генотипа HoF: контрола - 1,2 g; 4,0 μM - 0,7 g; маса надземног дела генотипа HoT: контрола - 1,5 g; 4,0 μM - 1,2 g).

SSR маркери се нису показали као повољни за детекцију толерантности сунцокрета према трибенурон-метилу због њихове удаљености од гена *Ahas11-2* и мале разлике у дужини умножених фрагмената између толерантног и осетљивог родитеља сунцокрета.

У зависности од места везивања дизајнираних ДНК-специфичних прајмера (For1-For8, ForBru, Rev1-Rev8, RevBru) омогућен је развој доминантних или кодоминантних маркера. Сва три рестикциона ензима (Kpn2I (BspEI), BseDI (BsaJI) и BcnI (NciI)) су омогућила развој кодоминантних маркера због разлике у позицији рестикционих места између гена *Ahas11-2* и *ahas11*, а уједно су и први пут коришћени за детекцију мутације С-Т. Као најповољнији маркери за употребу у маркер асистираној селекцији су се показали кодоминантни маркери: CAPS_{ForBru-Rev4}, CAPS_{ForBru-Rev3}, CAPS_{For3-Rev6}, CAPS_{For7-Rev7}, CAPS_{For8-Rev7} и CAPS_{For5-Rev4}. CAPS маркери дизајнирани у овој докторској дисертацији припадају групи функционалних маркера, те не постоји физичка удаљеност између гена и маркера. Резултати анализе толерантности биљака сунцокрета F₂ генерације према трибенурон-метилу добијени маркером CAPS_{For5-Rev4} су потврдили резултате χ^2 теста. Односно, потврдили су хипотезу да је толерантност сунцокрета према трибенурон-метилу контролисана једним доминантним геном.

У поглављу **Прилози** су наведени протоколи коришћени за стерилизацију семена сунцокрета, изолацију ДНК из листа, коришћени реагенси у овим протоколима, PCR програми за умножавање ДНК SSR маркерима и секвенце коришћених SSR маркера.

3. Закључак и предлог

Докторска дисертација мастера Александре Димитријевић: „Употреба молекуларних маркера и *in vitro* метода у детекцији отпорности сунцокрета према трибенурон-метилу“ представља оригиналан научни рад из области биотехнологије сунцокрета. Циљ истраживања ове докторске дисертације је да се употребе најсавременије методе биотехнологије у циљу скраћења дуготрајне селекције током које би се унео ген толерантности према трибенурон-метилу код сунцокрета. Један од доприноса ове докторске дисертације да је Александра Димитријевић прва у свету развила *in vitro* тест за детекцију толерантности сунцокрета према трибенурон-метилу, тако да је успешно детектовала толерантне генотипове сунцокрета према трибенурон-метилу без обзира на утицај осталих гена у геному сунцокрета (genetic background). *In vitro* тест је омогућио разликовање не само толерантних од осетљивог (Os) генотипа сунцокрета, већ и разликовање хомозиготно толерантних (HoF, HoT, HoP, HoM) од хетерозиготно толерантних генотипова (HtF, HtT, HtP, HtM). Дизајнирани CAPS молекуларни маркери у овој докторској дисертацији су први пут употребљени за детекцију толерантности сунцокрета према трибенурон-метилу. Као најповољнији маркери за употребу у маркер асистираној селекцији су се показали кодоминантни

маркери: CAPS_{ForBru-Rev4}, CAPS_{ForBru-Rev3}, CAPS_{For3-Rev6}, CAPS_{For7-Rev7}, CAPS_{For8-Rev7} и CAPS_{For5-Rev4}. CAPS маркери дизајнирани у овој докторској дисертацији припадају групи функционалних маркера, те не постоји физичка удаљеност између гена и маркера. Резултати анализе толерантности биљака сунцокрета F₂ генерације према трибенурон-метилу добијени маркером CAPS_{For5-Rev4} су потврдили хипотезу да је толерантност сунцокрета према трибенурон-метилу контролисана једним доминантним геном.

Сви развијени кодоминантни маркери ће се даље користити у маркер асистираној селекцији у циљу скраћивања дугог процеса повратних укрштања током конверзије различитих линија и хибрида сунцокрета у отпорну форму, те значајно убрзати програме оплемењивања сунцокрета. Истраживања у овој дисертацији су извршена у потпуности према пријави кандидата.

Узимајући у обзир све наведено Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију мастера Александре Димитријевић: „Употреба молекуларних маркера и *in vitro* метода у детекцији отпорности сунцокрета према трибенурон-метилу“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета у Београду да ову оцену усвоји, чиме би се пружила могућност кандидату да приступи јавној одбрани ове докторске дисертације.

У Београду, 17. 06. 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 Драгана Миладиновић, научни саветник Институт за ратарство и повртарство у Новом Саду (Биотехнологија и оплемењивање биљака)

Др Томислав Живановић, редовни професор Пољопривредни факултет Универзитета у Београду (Генетика)

Др Синиша Јоцић, научни саветник Институт за ратарство и повртарство у Новом Саду (Оплемењивање биљака)

Прилог 1.

Радови објављени у часописима који су на SCI листи

1. Imerovski, I., **Dimitrijević, A.**, Miladinović, D., Dedić, B., Jocić, S., Kovačević, B., Obreht, D., 2013. Identification of PCR markers linked to different Or genes in sunflower. Plant Breeding No 132. p. 115-120.
2. **Dimitrijević, A.**, Pejović, I., Imerovski, I., Dedić, B., Pajević, S., Miladinović, D., 2013. DNA isolation from dry samples of broomrape – The effect of isolation method and sample storage on DNA yield and quality. Romanian Agricultural Research. No. 30, DII 2067-5720 RAR 2012-198. <http://www.incda-fundulea.ro/rar/nr30/rar30.26.pdf>