

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 277/4-6.1.
Датум: 29.01.2014. 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 Иване Имеровски, мастер.

Кандидат **Ивана (Миле) Имеровски, мастер**, пријавила је докторску дисертацију под називом: «Употреба молекуларних маркера у детекцији гена отпорности *Plarg* код сунцокрета»,
из научне области Ратарство и повртарство.

Универзитет је дана 11.04.2013. године, својим актом број 61206-796/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: **«Употреба молекуларних маркера у детекцији гена отпорности *Plarg* на пламењачу код сунцокрета».**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације Иване Имеровски, мастер, образована је на седници одржаној 27.11.2013. године, одлуком Факултета број 277/2-5.3., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област

1. др Гордана Шурлан-Момировић, редовни професор, Генетика,
2. др Драгана Миладиновић, научни саветник, Биотехнологија и оплемењивање биљака,
3. др Сениша Јоцић, научни саветник, Оплемењивање биљака,
4. др Вера Ракоњац, редовни професор, Генетика,
5. др Драган Перовић, виши научни сарадник, Генетика и биотехнологија.

Наставно-научно веће факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације, на седници одржаној 29.01.2014. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 277/4-6.1.
Датум: 29.01.2014. 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 29.01.2014. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **ИВАНА ИМЕРОВСКИ, мастер** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«УПОТРЕБА МОЛЕКУЛАРНИХ МАРКЕРА У ДЕТЕКЦИЈИ ГЕНА ОТПОРНОСТИ *P_{largo}* НА ПЛАМЕЊАЧУ КОД СУНЦОКРЕТА».**

II Универзитет је дана 11.04.2013. године, својим актом број 61206-796/2-13 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 Иване Имеровски, мастера

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду од 27.11.2013. године, именована је Комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације Иване Имеровски: „Употреба молекуларних маркера у детекцији гена отпорности *Pl_{arg}* на пламењачу код сунцокрета“.

Комисија у саставу: др Гордана Шурлан Момировић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Вера Ракоњац, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Драгана Миладиновић, научни саветник Института за ратарство и повртарство, Нови Сад, др Драган Перовић, виши научни сарадник Instiuta Julius Kuehn, Federal Research Centar for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Кведлинбург, Немачка, 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 Иване Имеровски, написана је на 90 страна, у оквиру којих се налазе 11 табела и 19 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, 146 референци.

Дисертација се састоји из следећих поглавља: Увода (стр. 3-5), Циља истраживања (стр. 6), Прегледа литературе (стр. 7-26), Радне хипотезе (стр. 27), Материјала и метода (стр. 28-39), Резултата (стр. 40-57), Дискусије (стр. 58-69), Закључака (стр. 70-71), Литературе (стр. 72-87) и Прилога (стр. 88-90).

2. Приказ и анализа докторске дисертације

Кандидаткиња Ивана Имеровски је у **Уводу** истакла да је сунцокрет једна од најважнијих уљаних биљних врста, указала на то да болести сунцокрета имају негативан утицај на принос и истакла да је стварање хибрида отпорних на пламењачу један од главних циљева у оплемењивању сунцокрета.

Кандидаткиња је предочила значај дивљих сродника сунцокрета као извора гена отпорности, и указала на то да се пламењача веома ретко јавља код дивљих врста, а епидемије у дивљим популацијама никада нису забележене. У уводу дисертације су наведени *Pl* гени пореклом из дивљих врста, и наглашено да је ген *Pl_{arg}* унесен је у гајени сунцокрет из дивље врсте *H. argophyllus*.

Мастер Ивана Имеровски је истакла значај брзог уноса гена отпорности у комерцијалне хибриде, као и предност употребе кодоминантних молекуларних маркера, који омогућују разликовање не само отпорних од осетљивих генотипова, већ и хомозиготно отпорних од хетерзиготно отпорних генотипова сунцокрета. Такође, кандидаткиња је нагласила да се употребом молекуларних маркера оплемењивање постаје брже и ефикасније.

Циљ истраживања ове докторске дисертације је идентификација молекуларних маркера блиско везаних за ген *Pl_{arg}*, утврђивање везаности гена и маркера и конструкција генетичке мапе региона у којем се ген налази, затим валидација маркера и употреба молекуларних маркера у маркер асистираној селекцији (МАС). Молекуларни маркери ће значајно убрзати процес уношења гена отпорности у комерцијалне линије сунцокрета и олакшати добијање хибрида сунцокрета отпорних на проузрокивача пламењаче *P. halstedii*.

У поглављу **Преглед литературе** изнети су доступни литерарни извори из области која је предмет проучавања ове докторске дисертације.

Први део прегледа литературе посвећен је пламењачи сунцокрета, са освртом на распрострањеност болести, номенклатуру раса, расну композицију патогена, услове за развој болести као и мере превенције и сузбијање пламењаче. Представљена је генетичка основа отпорности сунцокрета на пламењачу, као и молекуларни механизми отпорности сунцокрета на ову болест.

Други део је посвећен је употреби молекуларних маркера у селекцији сунцокрета на отпорност на пламењачу. Истакнута је важност маркер асистиране селекције, као и неопходност валидације маркера пре њихове употребе у селекцији. Кандидаткиња је у оквиру овог поглавља направила упоредни преглед порекла до сада откривених *Pl* гена, положаја на генетичкој мапи и раса на коју сваки појединачан ген даје отпорност. Посебан део овог поглавља, кандидаткиња је посветила досадашњим сазнањима о гену *Pl_{arg}*, који пружа отпорност на све познате расе пламењаче. Кандидаткиња је навела који молекуларни маркери су до сада коришћени за детекцију отпорних генотипова, као и које линије су извор гена отпорности *Pl_{arg}*.

У **Радној хипотези** мастер Ивана Имеровски је пошла од чињенице да је ген отпорности *Pl_{arg}* за који се тражи блиско везани молекуларни маркер пореклом из дивљег сродника (*H. argophyllus*), те да ће регион генетичке мапе где је ген лоциран бити високо полиморфан на молекуларном нивоу и да ће тај полиморфизам успешно моћи да се детектује уз помоћ SSR (Simple Sequence Repeat) маркера. Очекује се да ће сатурацијом овог сегмента генетичке мапе сунцокрета SSR маркерима бити могуће идентификовати маркере који су у непосредној близини гена отпорности и косегрегирају са њим. С обзиром на то да ће се у истраживању користити микросателитски маркери који су по својој природи кодоминантни, очекује се да ће маркери моћи да разликују хомозиготно отпорне индивидуе од хетерозиготних, као и да ће бити стабилни у различитим укрштањима. Као резултат дисертације, очекује се да ће развијени маркер моћи да се користи за маркер асистирану селекцију.

У поглављу **Материјал и методе** кандидаткиња је дефинисала материјал који је коришћен за развој мапирајуће популације, валидацију маркера и у МАС, као и начин на који је добијена мапирајућа популација, протокол за фитопатолошку оцену и молекуларне анализе.

У подпоглављу **Биљни материјал**, кандидаткиња је описала родитељске линије RHA 419 и RHA-N-49 које су коришћене за развој мапирајуће популације. Поред линије RHA 419, у испитивање су била укључене додатне 22 линије са геном *Pl_{arg}*: RHA 443 и RHA 464, као и RH 1-20. Како би се утврдило да ли постоји веза између маркера везаних за *Pl_{arg}* и других гена са LG1, кандидаткиња је тестирала линије HA-R4 (*Pl₁₄* и *Pl₁₆*) и HA-R5 (*Pl₁₃*). За MAC је коришћено деветнаест комерцијалних линија сунцокрета (HA-26-OR, BT-VL-17, HA-26-OL-SOL, NIMI-RF-27, NIMI-RF-65, NIMI-RF-SES, NIMI-RF-168, NIMI-RF-49 и NIMI-RF-92, SU-RF-252, RHA-N-49, PC-GR-252, RHA-UK, RHA-M-72, RHA-ANN-65, RHA-ŠP, SU-RF-49, NIMI-RF-UK, NIMI-RF-72) различитих особина и намена, које је кандидаткиња изабрала из колекције Одељења за уљане културе, Института за ратарство и повртарство, Нови Сад, и у њих је уношен ген отпорности *Pl_{arg}*.

У подпоглављу **Развој мапирајуће** популације, кандидаткиња је навела да је укрштањем инбред линија RHA 419 и RHA-N-49 добијена мапирајућа популација. Од укупно 103 биљке из F₂ популације, од 83 биљке су помоћу педигре методе развијене одговарајуће F₃ и F₄ фамилије, које су потом коришћене за фитопатолошку оцену.

У подпоглављу **Фитопатолошка оцена** наведено је да су линије са геном *Pl_{arg}* (RHA 419, RHA 443 и RHA 464) и осетљиви родитељ из мапирајуће популације (RHA-N-49) тестирани са две расе пламењаче: расом 730 и смешом раса која превазилази ген *Pl₆*. Клијанци са видљивим коренским длачицама су инокулисани у суспензији зооспорангија *P. halstedii*. Након тога, биљке су гајене у клима комори 8-14 дана у мешавини песка и перлита, под контролисаним условима на температури од 18 ± 2°C. После појаве првог пара листова, посуде су прекриване провидним пластичним поклопцем како би се у периоду од 48h очувала висока релативна влажност ваздуха и тиме подстакла спорулација.

Кандидаткиња је надаље описала начин и фазе у којима су рађене **Молекуларне анализе**. Најпре су урађени прелиминарни тестови уз помоћ дванаест SSR маркера који окружују ген *Pl_{arg}*. Изабрани маркери су тестирани на родитељским линијама (RHA 419 и RHA-N-49), два F₁ узорка и четири насумично изабрана F₂ узорка. Кандидаткиња је оптимизовала реакцију умножавања ДНК SSR маркерима. На основу добијених резултата, маркери ORS543, ORS662, ORS716 и ORS675 су изабрани за анализу мапирајуће популације. За све тетсиране локусе урађен је χ^2 тест, како би се утврдило одступање од теоријски очекиваног раздвајања за кодоминантне (1:2:1) и доминантне (3:1) маркере. Генетичка мапа је конструисана за F₂ популацију из укрштања RHA 419 x RHA-N-49 уз помоћ програма Joinmap Version 4.1 са LOD вредношћу од 4.0. За превођење фреквенције рекомбинација између маркера у удаљеност на мапи коришћена је мапирајућа функција Косамби.

Након анализа на мапирајућој популацији, косегрегирајући маркери ORS662, ORS716 и ORS675 тестирани су на другим линијама са геном *Pl_{arg}* (линијама RHA 443, RHA 464 и RH 1-20), како би се потврдила веза између маркера и гена. Након валидације, маркери су коришћени за маркер асистирану селекцију, тј. за унос гена *Pl_{arg}* деветнаест комерцијалних линија сунцокрета. Пре укрштања, све линије су тестиране маркерима ORS662, ORS716 и ORS675 како би се утврдили њихови хаплотипови, и да ли се разлика у дужини фрагмената између отпорног и осетљивог генотипа може детектовати на агарози. Уз помоћ добијених

молекуларних резултата, PIC вредности за сваки прајмер је израчуната и на основу њега је процењена полиморфност. На основу профила 44 линије сунцокрета, направљена је бинарна матрица где је са "0" оцењено одсуство а са "1" присуство алелне форме сваког од маркера. Уз помоћ УПГМА методе направљен је кластер у програму STATISTICA 10. За сваку осетљиву линију у коју је уношен ген отпорности дефинисан је најпогоднији маркер за MAC. С обзиром на то да ова два маркера припадају истом локусу и дају исту оцену отпорности, избор маркера за конкретно укрштање зависио је од разлике у дужини алела отпорног и неотпорног родитеља. Ради лакшег и прецизнијег читавања, биран је онај маркер код којег је алелна разлика између отпорног и неотпорног генотипа била већа и самим тим лакше уочљива. Након укрштања осетљивих линија са изворима отпорности RHA 419 и RHA 443, добијено је 19 BC популација. Свака BC популација састојала се од 24 биљке, која је затим тестирана једним од два кодминантна маркера, ORS716 или ORS662. Све биљке из повратног укрштања оцењене су одговарајућим маркером, а отпорно потомство је коришћено за даља повратна укрштања

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

Ивана Имеровски је у подпоглављу **Фитопатолошка оцена** утврдила да се линија RHA-N-49, која је коришћена као осетљиви родитељ у мапирајућој популацији, показала као 100% осетљива и на расу 730 и на смешу раса патогена. На котиледоним листовима и првом правом пару листова уочена је спорулација и клијанци су се слабије развијали. Код линије RHA 419, која је била донор отпорности у мапирајућој популацији, као и код линија RHA 443 и RHA 464, спорулација није уочена, тј. ови генотипови су били 100% отпорни на расу 730 као и на смешу раса проузрокивача пламењаче. Када је у питању однос радвајања отпорних према осетљивим биљкама, фитопатолошки тест на F_4 фамилијама развијеним од одговарајућих F_4 биљака је показао да је било 20 хомозиготно отпорних, 39 фамилија код којих је уочено раздавајање на осетљиве и отпорне тј. биле су хетерозиготне, а 24 су биле хомозиготно осетљиве. Резултат χ^2 теста је показао да је раздвајање отпорних према неотпорним F_2 биљкама било 1:2:1 ($\chi^2 = 0.71$; $P=0.70$), што одговара доминантном моделу наслеђивања. Отпорност типа II, коју карактерише присуство атипичне спорулације ниског интензитета која не прелази у системичну инфекцију није уочена код отпорног родитеља RHA 419, као ни код линија RHA 443 и RHA 464. Код мањег броја биљака из мапирајуће популације примећено је присуство слабе спорулације која није утицала на развој котиледона. Такве биљке су поново тестирани и показале су се као отпорне. Ипак, отпорност типа II као генерални механизам одбране отпорних биљака са геном Pl_{arg} није уочена.

У подпоглављу **ПРЕЛИМИНАРНО МОЛЕКУЛАРНО ИСТРАЖИВАЊЕ**, кандидаткиња је описала оптимизовани PCR програм на којем је добијено најмање неспецифичних продуката, и који је коришћен за даље анализе. Пре генотипизације целокупне мапирајуће популације, молекуларне анализе су извршене на пробном узорку који се састојао од родитељских линија RHA 419 и RHA-N-49, два хетерозиготна узорака из F_1 и четири насумично изабрана узорка из F_2 . Дванаест маркера је изабрано са LG1 генетичке мапе сунцокрета из региона у којем се налази ген отпорности Pl_{arg} . Сви прајмери са LG1 били су полиморфни између родитељских линија RHA 419 и RHA-N-49.

Употребом прајмера ORS610 код отпорног генотипа добијен је фрагмент дужине 135 bp, док је код осетљивог умножен фрагмент дужине 150 bp. Уз помоћ маркера ORS1039 код RHA419 амплификован је фрагмент дужине 200 bp, док је код RHA-N-49 добијен продукт од 215 bp. Маркер OR1128 умножио је фрагмент од 251 bp код осетљивог генотипа и 254bp код отпорног генотипа. Употребом прајмера ORS543 код отпорне линије су добијена два фрагмента, дужине 1400 bp и 260 bp. Код осетљивог генотипа умножен је само један фрагмент дужине 265 bp. Уз помоћ маркера ORS1182 код отпорног генотипа добијена је трака од 165 bp. Код осетљивог генотипа умножен је фрагмент дужине 175 bp. Уз помоћ маркера ORS509 код отпорног генотипа амплификован је фрагмент дужине 200 bp, док је код неотпорног генотипа RHA-N-49 умножен фрагмент дужине 195 bp. ORS710 је умножио фрагмент дужине 137 bp код отпорне линије и од 142 bp код осетљиве линије. Употребом прајмера ORS053 код отпорне линије је добијен фрагмент од 450bp, а код осетљивог генотипа од 455bp. ORS371 умножио је фрагмент дужине 267 bp код RHA419, док је код линије RHA-N-49 деткован фрагмент дужине 270 bp. Уз помоћ маркера ORS662 код отпорног генотипа амплификован је фрагмент дужине 302 bp, док је код неотпорног генотипа RHA-N-49 умножен фрагмент дужине 310 bp. ORS716 је умножио фрагмент дужине 303 bp код отпорне линије, а код неотпорне линије је деткован фрагмент дужине 325bp. Са маркером ORS675 код отпорног генотипа уочено постојање нултог алела, а код осетљивог генотипа је деткован фрагмент од 250 bp.

Молекуларне анализе популације RHA 419 x RHA-N49 показале су да су маркеи ORS543, ORS662 и ORS716 имали раздвајање 1:2:1, какво се очекује за кодоминантан маркер. Са маркером ORS675 раздвајање је било 1:3, што се очекује за доминантни маркер. Са маркером ORS543 код осам узорака оцена молекуларним маркером је одступала од фитопатолошке оцене, тј. примећено је осам рекомбинација. Резултати добијени уз помоћ маркера ORS716, ORS662 и ORS675 нису одступали од резултата лабораторијског теста. С обзиром на то да рекомбинанти нису детковани, може се рећи да су ова три SSR маркера косегрегирала са геном *Pl_{arg}*. Кандидаткиња је на основу добијених резултата конструисала генетичка мапа за регион који окружује *Pl_{arg}*. ORS543 је мапиран проксимално од гена *Pl_{arg}*, на удаљености од 4,7 cM, док су ORS543, ORS662 и ORS716 мапирани у истом локусу са геном отпорности.

У подпоглављу **Валидација маркера**, три косегрегирајућа маркера ORS662, ORS675 и ORS716 су тестирана на линијама RHA 443 и RHA 464, као и на линијама RH 1-20 како би се повредило да су добијени амплификациони профили специфични за ген *Pl_{arg}*. Код свих тестираних линија уочени су профли карактеристични за линију сунцокрета која је коришћена као извор отпорности у мапирајућој популацији, RHA 419. Са маркером ORS662 умножен је фрагмент од 302bp, са маркером ORS716 фрагмент од 303bp, док је са ORS675 потврђено присуство нултог алела. Маркери су тестирани и на линијама који на LG1 имају друге *Pl* гене. Код линије HA-R4, употребом прајмера ORS662 умножен је фрагмент величине 312 bp, са ORS716 добијен је фрагмент од 325 bp, а са прајмером ORS675 фрагмент од 235 bp. Код линије HA-R5 са прајмером ORS662 уочен је фрагмент од 233bp, са ORS716 фрагмент од 325bp, док је ORS675 умножио фрагмент дужине 235 bp. Хаплотипови ових линија разликовали су се од хаплотипова линија са геном *Pl_{arg}*.

Мастер Ивана Имеровски је у подпоглављу доктората **МАС** који се односи на употребу идентификованих и валидованих косегрегирајућих *SSR* маркера у маркер асистираној селекцији, пре примене маркера за маркер асистирано повратно укрштање тетсирала све осетљиве генотипове са ORS662, ORS716 и ORS675, како би се утврдило да ли је разлика између отпорних и различитих неотпорних алела довољно велика да би могла да се детектује на агарозним геловима. Са прајмером ORS716 мајчинске линије имале су јединствен профил - код линија HA-26-OR, BT-VL-17 и HA-26-OL-SOL детектован је алел од 323 bp, док се код ресторера јављао профил од 325 bp и 305 bp. Употребом других прајмера код мајчинских линија није добијен јединствени профил. Ресторер линије су имале различите профиле који се нису могли довести у корелацију са особинама које их карактеришу као што су толерантност на хербициде или отпорност на воловод. Маркери су били високо полиморфни међу неотпорним линијама. На основу броја детектованих алела, за сваки *SSR* израчуната је PIC вредност, која је за ORS662, ORS716 и ORS675 износила 0,66, 0,63 и 0,70, у одговарајућем редоследу навођења. На основу молекуларних профила 44 коришћене линије добијених са маркерима ORS662, ORS716 и ORS675, направљен је кластер уз помоћ UPGMA методе. Унутар кластера инбред линије су биле подељене у две велике групе, означене са А и В. У групу А издвојиле су се све линије са геном Pl_{arg} , док су све линије без гена Pl_{arg} формирале кластер В. Линије су се додатно груписале унутар кластера В и формирале субкластер В1, у којем су се налазиле линије код којих је за МАС погоднији био маркер ORS716, док су се у В2 издвојиле линије код којих је за маркер асистирану селекцију био погоднији ORS662.

Приликом маркер-асистиране селекције, генотипизација узорака је рађена на агарозним геловима. Критеријум за избора прајмера за тестирање потомства из сваког укрштања био је да је разлика између профила отпорног и неоторног генотипа довољно велика како би се могла прочитати. Тако се, због веће разлике у дужини алела, ORS662 показао као погоднији за генотипизацију на агарозним геловима BC потомства где су рекурентни родитељи били линије HA-26-OR, BT-VL-17, HA-26-OL-SOL, NIMI-RF-27, NIMI-RF-65, NIMI-RF-SES, NIMI-RF-168, NIMI-RF-49 и NIMI-RF-92, док је ORS716 био погоднији у случају линија SU-RF-252, RHA-N-49, PC-GR-252, RHA-UK, RHA-M-72, RHA-ANN-65, RHA-ŠP, SU-RF-49, NIMI-RF-UK и NIMI-RF-72. Кандидаткиња је у BC популацијама утврдила да су добијени молекуларни профили тестираниг потомства одговарали профилима осетљивог родитељала или профилима који се очекују код хетерозиготних узорака, што је очекиван резултат у повратном укрштању.

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

Линије RHA 419 (Pl_{arg}), RHA 443 (Pl_{arg}) и RHA 464 (Pl_{arg}) показале су се отпорним на расу 730, која је доминантна у Србији и за коју је до сада отпорност пружао ген Pl_6 , као и на цмешу раса која превазилази ген Pl_6 . Кандидат је оценио да Pl_{arg} даје отпорност широког спектра. Кандидат је своје резултате поткрепио доступним литерарним наводима који указују на исте и/или сличне резултате. Резултати су показали да је Pl_{arg} појединачан доминантан ген. Раздвајање у потомству које је уочено пратило је модел 1:3. Ово је у сагласности другим доступним резултатима. Ипак, имајући у виду да Pl_{arg} даје отпорност према свим до сада познатим расама пламењаче, укључујући и расе отпорне на фунгицид

металаксил, не може се искључити могућност да је у питању заправо кластер веома блиско везаних гена, као што се показало у случају других *Pl* гена. Имајући у виду комплексну архитектуру других сличних локуса, потребно је спровести детаљна молекуларна истраживања како би се искључила могућност да се и у случају *Pl_{arg}* не ради о групи гена који су физички веома блиско вазани.

Приликом заражавања расом 730 и смешом раса која превазилази ген *Pl₆*, код отпорних линија RHA 419, RHA 443 и RHA 464 уочена је потпуна отпорност (отпорност типа И), без спорулације на котиледонима. Слично томе, код потомства је у већини случајева уочена или инфекција јаког интензитета или потпуна отпорност. Атипична спорулација јављала се пре као изузетак него као механизам отпорности карактеристичан за ген *Pl_{arg}*.

Свих дванаест маркера са LG1 који су коришћени у прелиминарном тесту показали су се полиморфним између отпорне линије RHA 419 и неотпорне линије RHA-N-49, указујући на то да се ген налази на LG1. Код једног маркера уочено је постојање нулног алела, што се може јавити услед уношења гена отпорности из дивљег сродника. Кандаидаткиња је закључила да је добијени редослед маркера истоветан али постоје знатна одступања у генетичкој удаљености маркера. Феномен супресована рекомбинација као последица смањења хомологије међу хромозомима је уочена и од стране других аутора, а често се јавља приликом интрогресије локуса за отпорност на болести из дивљих сродника.

Сви генотипови са геном *Pl_{arg}* имали су идентичне хаплотипове. Све линије су се показале као хомозиготно отпорне, и стога се могу користити као извори отпорности у оплемењивачком програму Института за ратарство и повртарство, Нови Сад. Приликом тестирања маркера везаних за ген *Pl_{arg}* на линијама које на LG1 имају друге *Pl* гене, хаплотипови линија HA-R4 (*Pl₁₄*, *Pl₁₆*) и HA-R5 (*Pl₁₅*) значајно су се разликовали од хаплотипова линија са геном *Pl_{arg}*. Овај резултат указује на то да се *Pl_{arg}* не налази у истом локусу са генима *Pl₁₄*, *Pl₁₅* и *Pl₁₆*, што је у скалду са опажањима других аутора.

Маркери са LG1 показали су велики полиморфизам приликом тестирања неотпорних комерцијалних линија сунцокрета. ORS662, ORS716 и ORS675 представљају динуклеотидне поновке, и добијене PIC вредности од 0,66, 0,63 и 0,70 више су од вредности 0,53 која је просечна за динуклеотидне поновке, дакле представљају високо информативне маркере.

UPGMA анализа издвојила је отпорне линије у посебан кластер A1, док су се неотпорне линије раздвојиле у две групе. Код линија из групе B1 за MAC се као погоднији показао ORS716, а код линија из групе B2 маркер ORS662. Ресторери се нису груписали у складу са особинама као што су толерантност на имидазолине или отпорност на воловод, наводећи на закључак да је детектована полиморфност последица разлика које нису биле предмет овог истраживања. Маркери ORS716 и ORS675 везани за ген *Pl_{arg}* су показали као веома ефикасни приликом оцењивања отпорности селекционог материјала на отпорност на пламењачу. Маркери су имали високу репродуцибилност у више различитих генотипова и показали су се као стабилни у различитим укрштањима и веома погодним за MAC. Маркери ће омогућити унос гена у комерцијалне линије сунцокрета, као и комбиновњем гена *Pl_{arg}* са другим *Pl* ради добијање дуготрајније отпорности.

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

Ген Pl_{arg} је појединачан доминантан ген који даје отпорност широког спектра. Приликом заражавања расом 730 и смешом раса која превазилази ген Pl_6 , код отпорних линија RHA 419, RHA 443 и RHA 464 уочена је потпуна отпорност, без спорулације на котиледонима. Код потомства је у већини случајева уочена или инфекција јаког интензитета или потпуна отпорност, док отпорност типа II није примећена.

SSR маркери ORS662, ORS675 и ORS716 косегрегирани су са геном отпорности Pl_{arg} , док је ORS543 мапиран на удаљености од 4,7 cM. Косегрегирајући маркери ORS662, ORS675 и OPC716 показали се стабилним у свим испитиваним генотиповима са геном Pl_{arg} (RHA 419, RHA 443, RHA 464 и RH 1-20).

Приликом тестирања ORS662, ORS675 и ORS716 на линијама HA-R4 (Pl_{14} , Pl_{16}) и HA-R5 (Pl_{15}) које на LG1 имају друге Pl гене, хаплотипови линија HA-R4 (Pl_{14} , Pl_{16}) и HA-R5 (Pl_{15}) значајно су се разликовали од хаплотипова линија са геном Pl_{arg} , чиме је показано да се Pl_{arg} не налази у истом локусу са генима Pl_{14} , Pl_{15} и Pl_{16} .

Маркери са LG1 показали су велики полиморфизам између неотпорних комерцијалних линија сунцокрета. PIC вредност за маркере ORS662, ORS716 и ORS675 износила је 0,66, 0,63 и 0,70, у одговарајућем редоследу навођења. UPGMA анализа издвојила је отпорне линије у посебан кластер A1, док су се неотпорне линије раздвојиле у две групе. Код линија из групе B1 за MAC се као погоднији показао ORS716, а код линија из групе B2 маркер ORS662. Ресторери се нису груписали у складу са особинама као што су толерантност на имидазолине или отпорност на воловод, наводећи на закључак да је детектована полиморфност последица разлика које нису биле предмет овог истраживања.

Молекуларни маркери су показали да су линије RHA 419, RHA 443, RHA 464 и RH 1-20 хомозиготно отпорне линије, те се као такве могу користити као донори отпорности у oplemeњивачким програмима.

Маркери ORS662, ORS675 и ORS716 ће се моћи користити за MAC и пирамидизацију гена отпорности.

У поглављу **Прилози** су наведене су рецептуре за коришћене пуфере и протокол за изолацију ДНК из листа.

3. Закључак и предлог

Докторска дисертација мастера Иване Имеровски: „Употреба молекуларних маркера у детекцији гена отпорности Pl_{arg} на пламењачу код сунцокрета“ представља оригиналан научни рад из области биотехнологије сунцокрета. Циљ истраживања ове докторске дисертације је да се употребе најсавременије молекуларне методе у циљу скраћења дуготрајне селекције током које би се унео ген отпорности Pl_{arg} на пламењачу код сунцокрета.

Одабрана тема дисертације актуелна је и значајна како за науку, тако и за праксу. У светлу појаве нових раса проузрокивача пламењаче која превазилази постојеће гене отпорности који су до сада инкорпорирани у комерцијалне линије и хибриде сунцокрета, намеће се потреба за проналажењем нових гена отпорности, и уношењем тих гена у гентипове сунцокрета. Допринос докторске дисертације Иване Имеровски је у томе што су идентификовани и валидовани молекуларни маркери блиско везани за Pl_{arg} , ген отпорност који пружа отпорност

на све до сада идентификоване расе проузрокивача пламењаче. Ови SSR маркери омогућавају не само разликовање неосетљивих од отпорних генотипова сунцокрета, већ и разликовање хомозиготно отпорних од хетерозиготно отпорних узорака. Приказани молекуларни маркери су по први пут у овој докторској дисертацији употребљени за превођење линија Института за ратарство и повртарство у отпорну форму. Иако су у дисертацији три маркера идентификована као ко-сегригајућа са геном отпорности, као најповољнији маркери за употребу у маркер асистираној селекцији су се показали кодоминантни маркери ORS662 и ORS716. 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 Иване Имеровски: „Употреба молекуларних у детекцији гена отпорности Pl_{arg} на пламењачу код сунцокрета“ 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, 02. 12. 2013. године

Чланови Комисије:

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

Др Драгана Миладиновић, научни саветник
Институт за ратарство и повртарство у Новом
Саду (Биотехнологија и оплемењивање биљака)

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

Др Вера Ракоњац, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у
Београду (Генетика)

др Драган Перовић, виши научни сарадник
Института Julius Kuehn, Federal Research Center
for Cultivated Plants, Institute for Resistance
Research and Stress Tolerance, Кведлинбург,
Немачка, (Генетика и биотехнологија)

Прилог 1.

Радови објављени 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>