

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 277/4-6.2.
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 Немање Кузмановића, дипл. инж.

Кандидат **Немања (Слободан) Кузмановић**, дипл. инж., пријавио је докторску дисертацију под називом: «Идентификација, карактеризација и генетички диверзитет сојева *Agrobacterium* spp., проузроковача бактериозног рака винове лозе»,

из научне области Фитомедицина.

Универзитет је дана 15. марта 2012. године, својим актом број 06-17650/4-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: **«Идентификација, карактеризација и генетички диверзитет сојева *Agrobacterium* spp., проузроковача бактериозног рака винове лозе».**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације Немање Кузмановића, дипл. инж., образована је на седници одржаној 30.10.2013. године, одлуком Факултета број 277/1-6.3., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област

1. др Алекса Обрадовић, редовни професор, Фитопатологија,
2. др Јелица Балаж, редовни професор, Фитопатологија,
3. др Вељко Гавриловић, виши научни сарадник, Фитопатологија,
4. др Небојша Марковић, редовни професор, Опште виноградарство,
5. др Милан Ивановић, доцент, Фитопатологија.

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: 277/4-6.2.
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

ОДЛУКУ

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднео **НЕМАЊА КУЗМАНОВИЋ**, дипл. инж. и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«ИДЕНТИФИКАЦИЈА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ГЕНЕТИЧКИ ДИВЕРЗИТЕТ СОЈЕВА *Agrobacterium* spp., ПРОУЗРОКОВАЧА БАКТЕРИОЗНОГ РАКА ВИНОВЕ ЛОЗЕ»**.

II Универзитет је дана 15.03.2012. године, својим актом број 06-17650/4-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Kuzmanović, N., Gašić, K., Ivanović, M., Prokić, A., Obradović, A. (2012): Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia. Archives of Biological Science 64, 1487-1497.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Милица Петровић)

Одлуку доставити: кандидату, ментору др Алекси Обрадовићу, редовном професору, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**
Датум: 22.11.2013.

Предмет: Оцена урађене докторске дисертације Немање Кузмановића, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета - Универзитета у Београду бр. 277/1-6.3. од 30.10.2013. именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације Немање Кузмановића, дипл. инж., под насловом: „Идентификација, карактеризација и генетички диверзитет сојева *Agrobacterium* spp., проузроковача бактериозног рака винове лозе“. Комисија у саставу др Алекса Обрадовић, ред. проф., др Јелица Балаж, ред. проф. Пољопривредног факултета - Универзитета у Новом Саду, др Вељко Гавриловић, виши научни сарадник Института за заштиту биља и животну средину у Београду, др Небојша Марковић, ред. проф. и др Милан Ивановић, доцент, на основу прегледа докторске дисертације, подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Немање Кузмановића, дипл. инж., написана је на 157 страна текста, и садржи 18 табела и 25 слика. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи 8 основних поглавља: Увод (стр. 1-6), Преглед литературе (7-42), Радна хипотеза (43), Материјал и методе (44-72), Резултати (73-107), Дискусија (108-121), Закључак (122) и Литература (123-157). Поглавља Увод, Преглед литературе, Материјал и методе и Резултати садрже више потпоглавља. На крају текста дисертације налазе се Биографија кандидата и изјаве о ауторству.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводу је представљен значај и распрострањеност гајења винове лозе у Србији. Истакнуто је да ова грана пољопривреде има дугу традицију у нашој земљи и да се последњих година улажу напори у обнављању виноградарске производње. Такође, указано је на значај бактериозног рака, који се сматра једним од најраспрострањенијих бактериоза винове лозе. Проузроковач овог обољења је врста *Agrobacterium vitis*, мада су у ређим случајевима из оболелих биљака винове лозе изоловани туморогени сојеви *Agrobacterium tumefaciens*/биовар 1, *Agrobacterium rhizogenes*/биовар 2, као и новоописана врста *Rhizobium nepotum*. У оквиру овог поглавља приказан је историјат проучавања бактериозног рака винове лозе. Наглашено је да први подаци о овом обољењу потичу још из средине 19. века. У уводу је представљена и географска раширеност и економски значај овог обољења. Изнети су подаци о спектру домаћина и специјализацији врста из рода *Agrobacterium*. Посебно је описан инфекциони процес, а детаљно су обрађени епидемиологија и симптоматологија обољења. Обзиром на могућност латентног присуства патогена у проводном ткиву винове лозе, указано је да *A. vitis* може бити раширен на велике удаљености путем наизглед здравог садног материјала.

Преглед литературе. Ово поглавље састоји се из 4 потпоглавља, где су представљени до сада објављени литературни подаци везани за предмет проучавања докторске дисертације.

У првом потпоглављу указано је на спорне елементе и отворена питања у вези таксономије овог рода, која је још увек у процесу ревизије. Наведени су различити приступи који су коришћени у класификацији представника рода *Agrobacterium*, а такође су представљени актуелни подаци и предлози ревизије таксономије. Напоменуто је да се *A. vitis* може издвојити као аутентична врста рода *Agrobacterium* и да њена тексономска позиција није предмет спорења.

У другом потпоглављу представљене су методе којима се може извршити идентификација и детекција патогена, а обрађени су и литературни подаци везани за изолацију патогена. Указано је да се патогеност сојева *Agrobacterium* spp. може одредити применом теста патогености и PCR анализом. Посебно су наглашени недостаци и проблеми везани за ове методолошке приступе. Такође, представљене су доступне методе диференцијације патогена до нивоа врсте, које се уопштено могу сврстати у класичне бактериолошке, серолошке, молекуларне и аутоматизоване. У овом поглављу, наведене су и методе детекције *Agrobacterium* spp. у биљном ткиву и земљишту, које се углавном заснивају на примени молекуларних метода.

У трећем потпоглављу указано је на високу стопу диверзитета међу сојевима *Agrobacterium* spp., која је забележена у литератури. Обрађена је структура популација фитопатогених *Agrobacterium* spp., у зависности од биљке домаћина и географског порекла. Описана је комплексна организација генетичког материјала *Agrobacterium* spp., који поред хромозома могу поседовати један или више плаزمиди. Представљени су туморогени (Ти), односно ризогени (Ри) плазмиди, са посебним освртом на опин тип, Т-ДНК и *vir* регион. У овом потпоглављу, такође су наведени литературни подаци везани за генетички диверзитет *Agrobacterium* spp., код сојева пореклом из винове лозе, код оних пореклом из воћака, украсних и шумских врста, као и код сојева пореклом из земљишних екосистема. Посебно је наглашено да је *A. vitis* једина врста рода *Agrobacterium* која је систематски проучавана са аспекта Т-ДНК, Ти плазмиди и хромозомске ДНК.

У четвртом потпоглављу приказани су литературни подаци домаћих аутора о проучавању фитопатогених *Agrobacterium* spp. Први подаци датирају из педесетих година прошлог века. Наводи се да је бактериозни рак винове лозе први пут у Србији уочен 1962. године, док је бактерија проузроковач, на основу тада доступних метода, идентификована као *A. tumefaciens*.

Радна хипотеза. Основна претпоставка у овој докторској дисертацији била је да обољење бактериозног рака винове лозе у нашој земљи проузрокују фитопатогене врсте рода *Agrobacterium*. Циљ истраживања био је да се изврши изолација, идентификација и карактеризација проузроковача овог обољења, применом класичних бактериолошких и молекуларних метода. Обзиром да су предмет анализе били и разноврсни референтни сојеви пореклом из међународних колекција, извршиће се процена поузданости коришћених метода детекције и идентификације патогена. Како би се проверила постављена хипотеза да међу сојевима распрострањеним у Србији постоје генетичке разлике, проучен је хромозомски и плазмидни део њиховог генома. Један од циљева истраживања био је да се сојеви изоловани у овом раду упореде са сојевима пореклом из међународних колекција. Испуњењем свих постављених циљева употпуниће се знање о бактериозном раку винове лозе у нашој земљи, што је предуслов за успешну контролу обољења.

Материјал и методе рада. Методе примењене у докторској дисертацији представљене су у 8 потпоглавља. Истраживања су спроведена у пољу и лабораторији.

Обилазак терена изведен је у периоду 2010-2011. године, а прегледани су виногради распоређени у свим виноградарским рејонима на територији наше земље, изузев косовско-метохијског. Биљни материјал узоркован је искључиво на локалитетима где су уочени карактеристични симптоми бактериозног рака. Наведено је да су анализирана укупно 62 узорка винове лозе, прикупљена у 22 различита локалитета.

Поступак изолације бактерија и табеларни приказ свих сојева коришћених у раду представљени су у другом потпоглављу. Посебно је наглашено да су поред сојева изолованих у нашој земљи, у појединим експериментима коришћени и различити сојеви *A. vitis* пореклом из међународних колекција, као и референтни и/или типски сојеви *Agrobacterium* sp. и *Rhizobium* sp.

Сојеви су анализирани PCR методом, коришћењем више различитих прајмера, специфичних за хромозомску ДНК и секвенце присутне на Ти или Ри плазмиду. Такође, код једног репрезентативног соја умножен је фрагмент 16S рРНК гена, и извршено његово секвенцирање и анализа добијене секвенце.

У посебном потпоглављу описане су методе проучавања патогености сојева изолованих у нашој земљи. Патогеност сојева тестирана је на биљкама винове лозе, сунцокрета и парадајза. У циљу испуњења Кохових постулата, из једне инокулисане биљке винове лозе извршена је реизолација и поновна идентификација бактерија.

Морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке одлике сојева изолованих из винове лозе у Србији, проучене су коришћењем стандардних и диференцијалних бактериолошких тестова. Одређена је реакција по Граму и активност оксидазе, а од одгајивачких одлика проучен је развој бактерија при 35°C и подлози са 2% NaCl. Даље, проучено је стварање 3-кетолактозе, формирање просветљених зона на КДА-СаСО₃ подлози, покретљивост бактерија при рН 7,0, развој и пигментација у подлози са фери-амонијум-цитратом, коришћење цитрата и производња киселине из сахарозе, мелезитозе и еритритола, и базе из тартарата.

У овом раду извршена је карактеризација Ти плаزمида према опин типу, обзиром да су сојеви *A. vitis* подељени у три главне групе: октопин/кукумопин (О/С), нопалин (N) и витопин (V) тип. Примењена је PCR метода, а коришћени су прајмери специфични за сваки од опин типова Ти плазмида детектованих код *A. vitis*.

Методе проучавања генетичког диверзитета сојева описане су у посебном потпоглављу. Коришћени су RAPD и rep-PCR, којима се врши анализа комплетног генома, односно секвенци распоређених унутар геномске ДНК. Такође, анализиран је и диверзитет одређених фрагмената присутних на хромозомској ДНК, као што су конститутивни гени (*dnaK*, *gyrB*, *recA*) и 16S-23S рРНК ITS регион. Ови фрагменти умножени су коришћењем специфичних прајмера и анализирани RFLP методом и секвенцирањем.

У циљу додатне карактеризације и диференцијације сојева, примењен је тест инхибиције са антагонистичким сојем *A. vitis* КФБ 0207 (F2/5). Антагонистички ефекат соја F2/5 тестиран је према 10 репрезентативних сојева пореклом из Србије, одабраних на основу генетичке анализе.

Резултати. Резултати истраживања представљени су у оквиру 7 потпоглавља. Приказани су јасно, уз сажета тумачења, прегледне табеле и слике које илуструју делове спроведених истраживања.

У првом потпоглављу изнети су подаци о распрострањености бактериозног рака винове лозе у нашој земљи. Указано је да су захваћени виногради били претежно стари

2-4 године и да је садни материјал углавном пореклом из увоза. Такође, дат је детаљан опис симптома уочених током обиласка различитих воноградских рејона.

Из ткива тумора изоловано је више типова бактеријских колонија. За даљи рад одабране су колоније које су фенотипски одговарале изгледу контролних сојева *Agrobacterium* spp.

Применом PCR методе, међу изолованим сојевима идентификован је патогени *A. vitis*, а за даљи рад издвојено је укупно 36 репрезентативних сојева. Парцијална нуклеотидна секвенца 16S рНК гена једног репрезентативног соја испољила је висок степен сличности са секвенцама референтних сојева *A. vitis*. Посебно је наглашено да је од укупно 62 анализарана узорка, 52 било позитивно на присуство патогена. Обзиром да су у PCR анализи коришћени и референтни сојеви *A. vitis* пореклом из међународних колекција, посебно су представљени резултати проучавања специфичности прајмера коришћених у идентификацији патогена.

У тесту патогености, од укупно 36 проучаваних сојева, 34 су изазвала развој типичних тумора на инокулисаним биљкама винове лозе. У случају биљака сунцокрета и парадајза, забележене су значајне варијације у интензитету симптома, како унутар појединачног огледа, тако и међу различитим понављањима. Реизолацијом из инокулисане биљке винове лозе и поновном идентификацијом патогена испуњени су Кохови постулати.

У посебном потпоглављу представљени су резултати изведених стандардних и диференцијалних бактериолошких тестова. Указано је да су проучавани сојеви *A. vitis* пореклом из Србије испољили морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке одлике особене врсти *A. vitis*. Једина одступања забележена су у тесту стварања киселине из еритритола као извора угљеника, где је сој КФБ 243 био позитиван, што је према подацима из литературе једино одлика врсте *A. rhizogenes*/биовар 2.

PCR анализом Ти плаزمида, 35 сојева класификовано је као О/С тип, један као V тип, док N тип није утврђен. Такође, указано је да су О/С Ти плазмиди додатно диференцирани на О/С-1 и О/С-2 групу.

RAPD и гер-PCR профили указивали су на постојање генетичког диверзитета међу проучаваним сојевима. Филогенетском анализом диференцирано је укупно 13 генетичких група. Сојеви пореклом из Србије били су распоређени унутар 7 генетичких група и углавном груписани заједно са сојевима пореклом из међународних колекција. Груписање сојева на основу RAPD и гер-PCR методе углавном није одговарало географском пореклу проучаваних сојева, али је са друге стране, уочена корелација између генетичких група и опин типа Ти плазмида.

Код укупно 22 репрезентативна соја *A. vitis* извршено је умножавање и секвенциона анализа конститутивних гена *dnaK*, *gyrB* и *recA*. Нуклеотидни полиморфизам унутар проучаване популације био је највећи за *recA* локус, затим је следио *dnaK* локус, док је најмањи степен диверзитета био у случају *gyrB* гена. На филогенетском стаблу заснованом на комбинованој секвенци *dnaK*, *gyrB* и *recA* гена, проучавани сојеви *A. vitis* формирали су монофилетичку групу, јасно различиту од осталих *Agrobacterium* /*Rhizobium* врста. Диференциране су четири генетичке групе при чему није уочена корелација између географског порекла сојева и генетичких група. Потпуна корелација није уочена ни између генетичких група и опин типа пТи, иако су поједине генетичке групе биле састављене од сојева који су поседовали одређен тип Ти плазмида.

Сојеви изоловани у нашој земљи и поједини референтни сојеви *A. vitis*, коришћени су у проучавању диверзитета 16S-23S рНК ITS региона, применом RFLP методе и секвенцирањем. На овај начин, такође су установљене генетичке разлике међу проучаваним сојевима. На филогенетском стаблу конструисаном на основу анализе нуклеотидних секвенци ITS региона, сојеви *A. vitis* формирали су пет филогенетских

група. Слично као и у случају анализе конститутивних гена, није уочена корелација између генетичких група и географског порекла сојева. Такође, корелација није уочена ни између генетичких група и опин типа pTi, мада је код појединих група забележена повезаност између хромозомске и плазмидне ДНК.

У потпоглављу „Осетљивост према антагонистичком соју КФБ 0207 (F2/5)“ представљени су резултати теста инхибиције са антагонистичким сојем *A. vitis* F2/5. У спроведеним огледима утврђене су разлике у инхибиторном утицају антагонистичког соја према проучаваним сојевима *A. vitis* пореклом из Србије. Код појединих сојева дошло је до инхибиције, код неколико сојева инхибиција је била делимична, док су неки били потпуно неосетљиви.

Дискусија. Добијени резултати дискутовани су уз сажета тумачења повезана са ранијим истраживањима спроведеним у нашој земљи и свету.

У овом поглављу указано је на деструктивност и изузетан фитопатолошки значај бактериозног рака винове лозе. Од тренутка кад је први пут утврђен, бактериозни рак био је углавном спорадично присутан у нашој земљи. Стога се ово обољење и бактерија проузроковач нису код нас интензивније проучавали дужи низ година. Међутим, последњих неколико година, у већини виноградарских рејона примећена је изражена појава бактериозног рака, уз високу стопу заражених биљака и штетност. Прикупљени подаци указивали су да је болест раширена путем зараженог садног материјала, који је углавном водио порекло из увоза.

У овој докторској дисертацији, у циљу потврде претпоставке да бактериозни рак винове лозе у Србији проузрокују фитопатогене врсте рода *Agrobacterium*, приступило се прикупљању узорака, изолацији и идентификацији проузроковача. Кључно је било обезбедити витално ткиво тумора, из кога би се успешно могао изоловати патоген, а као најпогодније време за узорковање показао се период од септембра до децембра. Обзиром да је коришћена неселективна YMA подлога, посебна пажња посвећена је правилној дезинфекцији биљног материјала.

Диференцијација патогених од непатогених сојева и идентификација до нивоа врсте/биовара извршена је применом како молекуларних метода, тако и класичних бактериолошких тестова. Утврђено је да бактериозни рак винове лозе у Србији проузрокују искључиво туморогени сојеви *A. vitis*. Обзиром да су у свету из оболелих биљака винове лозе изоловани туморогени сојеви који су припадали другим *Agrobacterium* spp., није искључено њихово присуство у нашој земљи. Од укупно 62 симптоматична узорка винове лозе анализирана у овом раду, код њих 52 је утврђено присуство патогена. Неуспешност изолације из 10 узорака може се објаснити чињеницом да у туморима који се нормално развијају не морају бити присутне виталне ћелије патогена, имајући у виду генетички карактер инфекције.

Молекуларне методе, пре свега PCR, омогућавају брзу детекцију Ti и/или Ri плаزمида, односно диференцијацију сојева до нивоа врсте/биовара. Будући да су у литератури утврђени извесни недостаци по питању специфичности, у овом раду је приликом извођења PCR методе комбиновано више прајмера у циљу повећања поузданости детекције. Специфичност прајмера примењених у молекуларној идентификацији сојева изолованих у нашој земљи, затим је проучена коришћењем 36 референтних сојева *A. vitis* пореклом из других европских земаља, Северне Америке, Африке и Аустралије.

У циљу поткрепљења резултата добијених PCR анализом сојева, извршено је секвенцирање и анализа 16S рПНК гена одабраног соја пореклом из наше земље. Парцијална нуклеотидна секвенца 16S рПНК гена једног репрезентативног соја испољила је висок степен нуклеотидне сличности (99-100%) са секвенцама других

сојева врсте *A. vitis* доступним у банци гена, док је на дендрограму конструисаном на основу филогенетске анализе овај сој био груписан заједно са референтним сојевима *A. vitis*.

Таксономска припадност проучаваних сојева даље је потврђена применом класичних бактериолошких метода, односно биохемијско-физиолошких тестова. Такође, проучене су морфолошке и одгајивачке особине сојева. Ове методе су поуздане, једноставне и јефтине, те и даље заузимају значајно место у процесу идентификације бактерија. Међутим, могу бити временски врло захтевне и стога у данашње време све више бивају замењене молекуларним методама. Сви проучавани сојеви испојили су морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке одлике карактеристичне за врсту *A. vitis*. Једини изузетак био је сој КФБ 243, који је и при понављању теста стварања киселине из еритритола као извора угљеника испојио одлике својствене врсти *A. rhizogenes*/биовар 2.

Применом PCR методе извршена је детекција Ти плаزمиди, односно детерминисане су извесне генетске предиспозиције за патогенезу. Стога је у циљу потврде резултата добијених PCR анализом, изведен тест патогености. Мада може бити временски веома захтеван, овај тест је једини поуздан начин да се утврде патогене одлике сојева. Обзиром да патогеност сојева није увек могуће тестирати на биљци из које је сој изолован, избор тест биљака може бити критичан фактор у извођењу огледа. У овом истраживању, тест патогености изведен је на виновој лози, сунцокрету и парадајзу. Узевши у обзир добијене резултате, може се закључити да је винова лоза, као природни домаћин, најпоузданија биљка за тест патогености. Коришћење сунцокрета и парадајза као тест биљака, и поред бржег развоја симптома, не може се препоручити као поуздан тест. У циљу потврде етиологије обољења, из биљке инокулисане једним репрезентативним сојем, извршена је реизолација бактерија и њихова поновна идентификација коришћењем PCR методе, чиме су испуњени Кохови постулати.

Карактеризација Ти плазмиди подразумевала је одређивање опин типа код 36 проучаваних сојева изолованих у овом раду. Иако има ограничен значај, овај приступ се традиционално користи при класификацији сојева, односно њихових Ти и Ри плазмиди. Од укупно 36 проучаваних сојева, Ти плазмид 35 сојева класификован је као О/С тип, један као V тип, док N тип Ти плазмиди није утврђен. Слични резултати добијени су и у студијама спроведеним у околним земљама.

Будући да су изузетно распрострањене, способне да насељавају различите животне средине и паразитирају широк круг гајених и шумских биљака, *Agrobacterium* spp. поседују веома високу стопу генетичког диверзитета. Анализа генетичког диверзитета може допринети разумевању таксономије, структуре и динамике популације фитопатогених бактерија и обезбедити оквир за развој осетљивих, специфичних и брзих метода за детекцију патогена и дијагнозу болести, што је предуслов за контролу обољења. У оквиру овог истраживања коришћене су методе којима се врши анализа комплетног генома (RAPD, гер-PCR), а анализиран је и диверзитет појединачних фрагмената присутних на хромозомској ДНК (16S-23S рРНК ITS регион, конститутивни гени) применом RFLP методе и секвенцирањем.

Спроведеном анализом установљен је висок степен генетичког диверзитета међу проучаваним сојевима *A. vitis*. Сојеви пореклом из Србије били су углавном груписани заједно са сојевима пореклом из међународних колекција, мада су издвојене и групе састављене искључиво од сојева пореклом из Србије. Генотипска сродност сојева пореклом из наше земље са проучаваним сојевима из иностранства указивала је на њихово заједничко порекло. Поред тога, утврђено је постојање клоналних група унутар проучаване популације, а постојале су и снажне индиције о присуству клоналних

комплекса унутар врсте *A. vitis*. Такође, установљено је постојање повезаности између хромозомалне и плазмидне ДНК код појединих генетичких група.

Према 10 репрезентативних сојева пореклом из Србије, тестиран је антагонистички ефекат соја КФБ 0207 (F2/5). Међу проучаваним сојевима установљене су разлике у реакцији на утицај антагонистичког соја, од инхибиције до потпуне неосетљивости. Међутим, није познато да ли су ове разлике међу сојевима последица активности гена присутних на хромозомској или плазмидној ДНК, или обоје. Неосетљивост појединих сојева *A. vitis* на инхибиторни ефекат коришћеног антагонистичког соја већ је забележена у литератури.

Закључак. Закључак је правилно изведен и у потпуности произилази из добијених резултата.

Чокоти винове лозе са типичним симптомима бактериозног рака уочени су у готово свим виноградарским рејонима у нашој земљи. Узимајући у обзир старост биљака и учесталост појаве болести, може се тврдити да је бактериозни рак раширен путем латентно зараженог садног материјала. На основу резултата остварених током наведених истраживања закључено је да је искључиво туморогени *A. vitis* проузроковач бактериозног рака винове лозе у Србији. За изолацију патогена из ткива тумора могу се користити и неселективне хранљиве подлоге, с тим да се посебна пажња мора посветити дезинфекцији биљног материјала. Молекуларне методе, пре свега PCR, показале су се погодним за рутинску и прелиминарну идентификацију сојева *A. vitis*, док су применом класичних бактериолошких метода потврђени ови резултати. Најподеснија биљка за проверу патогености сојева била је винова лоза, док се резултати добијени коришћењем сунцокрета и парадајза као тест биљака углавном не могу сматрати поузданим.

Међу проучаваним сојевима *A. vitis* пореклом из Србије установљене су генетичке разлике, везане како за хромозомску, тако и плазмидну ДНК. Генотипска сродност сојева пореклом из наше земље са проучаваним сојевима из иностранства, указивала је на њихово заједничко порекло. Коришћењем метода RAPD и гер-PCR, као и секвенцирањем три конститутивна гена (*dnaK*, *gyrB* и *recA*) и 16S-23S рРНК ITS региона, утврђено је постојање клоналних група унутар проучаване популације, а постојале су и снажне индикације о присуству клоналних комплекса унутар врсте *A. vitis*. Такође, установљено је постојање повезаности између хромозомске и плазмидне ДНК код појединих генетичких група код врсте *A. vitis*. Разлике међу проучаваним сојевима установљене су такође у тесту инхибиције са антагонистичким сојем КФБ 0207 (F2/5).

Литература. У дисертацији је наведено 326 референци, од чега 20 домаћих и 306 страних аутора, које представљају избор најзначајнијих радова објављених у овој области. Цитиране референце обухватају широк спектар извора литературе што указује на темељно проучену проблематику од стране кандидата. Избор литературних извора је актуелан, а цитирање је изведено на правилан начин.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Немање Кузмановића, дипл. инж., под насловом: „Идентификација, карактеризација и генетички диверзитет сојева *Agrobacterium spp.*, проузроковача бактериозног рака винове лозе“ представља оригиналан истраживачки рад од научног и практичног значаја. Спроведеним истраживањима испуњен је план наведен у пријави докторске дисертације.

Резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације представљају помак у проучавању бактериозног рака винове лозе у нашој земљи, односно бактерије проузроковача овог обољења. Научни значај огледа се у томе што је коришћењем различитих приступа, првенствено PCR методе, постављен оквир за развој протокола којима би се могла извршити брза, осетљива и поуздана детекција и идентификација патогена. Анализом генетичког диверзитета детаљно су проучени филогенетски односи међу проучаваним сојевима, али су расветљена и поједина питања везана за екологију патогена и епидемиологију обољења. Пре свега, генотипска сродност сојева пореклом из наше земље са проучаваним сојевима из иностранства, указивала је на њихово заједничко порекло. У овом раду утврђено је постојање клоналних група унутар проучаване популације, а постојале су и снажне индиције о присуству клоналних комплекса унутар врсте *A. vitis*. Такође, у овом раду још једном је потврђено постојање повезаности између хромозомске и плазмидне ДНК код врсте *A. vitis*. Детаљна карактеризација патогена довела је до закључка да наведено обољење винове лозе у Србији проузрокује врста *A. vitis*, а не *A. tumefaciens*, како се до сада сматрало. Овим радом је по први пут од открића бактериозног рака винове лозе у Србији, применом најсавременијих метода, извршена правилна идентификација патогена. Одређивање проузроковача бактериозног рака и потврда генотипске сродности са сојевима из иностранства је од посебног практичног значаја и доприноси разумевању епидемиологије обољења.

Методе коришћене у истраживањима омогућиле су кандидату да адекватно и у потпуности провери постављену хипотезу и тако оствари постављени задатак и циљ. Рад је написан јасним стилем, а резултати су коректно објашњени, документовани и дискутовани. Тумачења резултата су научно заснована и исправно поређена са резултатима других аутора. Током израде докторске дисертације, на темељу добијених резултата, проистекао је рад објављен у часопису међународног значаја категорије М23. У часописима националног значаја, категорије М51, објављен је један рад, као и више усмених саопштења на научним и стручним скуповима у земљи и иностранству.

Имајући у виду остварене резултате, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Немање Кузмановића, дипл. инж., под насловом: **„Идентификација, карактеризација и генетички диверзитет сојева *Agrobacterium spp.*, проузроковача бактериозног рака винове лозе“** и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да усвоји оцену и омогући кандидату да приступи јавној одбрани докторске дисертације пред наведеном Комисијом.

Чланови Комисије:

Др Алекса Обрадовић, редовни професор
(област Фитопатологија)
Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет

Др Јелица Балаж, редовни професор
(област Фитопатологија)
Универзитет у Новом Саду - Пољопривредни факултет

Др Вељко Гавриловић, виши научни сарадник
(област Фитопатологија)
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд

Др Небојша Марковић, редовни професор
(област Опште виноградарство)
Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет

Др Милан Ивановић, доцент
(област Фитопатологија)
Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет

Прилог:

Сепарат објављеног рада дипл. инж. Немање Кузмановића у научном часопису на SCI листи

Kuzmanović, N., Gašić, K., Ivanović, M., Prokić, A., Obradović, A. (2012): Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia. Archives of Biological Science 64, 1487-1497.