

Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

32/8-6.1.

(Број захтева)

29.05.2019.

(Датум)

Веће научних области
биотехничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*)
пореклом из различитих домаћина у Србији“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Фитомедицина

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

1. Бранка, Радојко, Петровић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета,
студијски програм):
Пољопривредни факултет, Студијски програм
Фитомедицина

Универзитет у Београду

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2017.

4. Година уписа на докторске студије: 2017/2018.

5. Назив студијског програма
докторских студија: Пољопривредне науке, модул Фитомедицина

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: Ивана Станковић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Nikolić, D., Vučurović, A., **Stanković, I.**, Radović, N., Zečević, K., Bulajić, A., Krstić, B. (2018): Viruses affecting tomato crops in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 225-235.
2. Bulajić, A., **Stanković, I.**, Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Ivanović, M., Krstić, B. (2014): *Tomato spotted wilt virus* - Potato Cultivar Susceptibility and Tuber Transmission. *American Journal of Potato Research* 91:186-194.
3. Milošević, D., **Stanković, I.**, Bulajić, A., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Petrović, G., Krstić, B. (2015): Detection and molecular characterization of *Pepper mild mottle virus* in Serbia. *Genetika (Beograd)* 47: 651-663.
4. Vučurović, A., Bulajić, A., **Stanković, I.**, Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., Krstić, B. (2012): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. *European Journal of Plant Pathology* 133: 935-947.
5. **Stanković, I.**, Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Berenji, J., Krstić B. (2011): Status of tobacco viruses in Serbia and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Acta Virologica* 55: 337-347.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 29.05.2019. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Душан Живковић

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/8-6.1.
Датум: 29.05.2019. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 51. и 52. Правилника о правилима докторских академских студија и члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 29.05.2019. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ тема докторске дисертације коју је поднела **БРАНКА ПЕТРОВИЋ, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«ГЕНЕТИЧКА СТРУКТУРА ПОПУЛАЦИЈЕ ВИРУСА БРОНЗАВОСТИ ПАРАДАЈЗА (*Tomato spotted wilt tospovirus*) ПОРЕКЛОМ ИЗ РАЗЛИЧИТИХ ДОМАЋИНА У СРБИЈИ»**.

II За ментора се именује др Ивана Станковић, ванредни професор.

III На одлуку о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора сагласност даје одговарајуће Веће научних области Универзитета у Београду.

Образложење

Наставно-научно веће факултета разматрало је и усвојило Извештај о позитивној оцени научне заснованости теме докторске дисертације коју је поднела Бранка Петровић, мастер.

Наставно-научно веће факултета је приликом доношења одлуке оцењивало да ли је реч о оригиналној идеји и да ли је тема од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Сходно изнетом одлучено је као у диспозитиву.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Број:

Дана 18.04.2019. године

Београд - Земун

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: *Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Бранке Петровић, мастер инжењера пољопривреде*

На основу члана 44. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог већа Катедре за фитопатологију и мишљења Наставно-научног већа Института за фитомедицину, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 26.03.2019. године, донело је одлуку бр. 32/6-4.1. да се образује Комисија у саставу др Ивана Станковић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет (ужа научна област: Фитопатологија), др Бранка Крстић, редовни професор, Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет (ужа научна област: Фитопатологија) и др Данијела Ристић, научни сарадник, Институт за заштиту биља и животну средину, Београд (ужа научна дисциплина: Фитопатологија) за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Бранке Петровић, мастер инжењер пољопривреде, под насловом:

„Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*) пореклом са различитих домаћина у Србији“

Кандидат је дана 10.04.2019. године одбранио пријављену тему докторске дисертације, а потписан записник предат је у Студентску службу 10.04.2019. године. У име Комисије председник, подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

1.1 Биографија кандидата

Бранка, Радојко, Петровић рођена је 28.06.1993. године у Београду, Република Србија. Основне академске студије на Универзитету у Београду-Пољопривредном факултету, студијски програм Биљна производња, модул Фитомедицина, уписала је школске 2012/13. године, а дипломирала је 27.09.2016. године са просечном оценом 9,46 (девет и 46/100). Завршни рад под насловом „Развијање брзог и ефикасног протокола за екстракцију укупних РНК за доказивање вируса парадајза“ одбранила је са оценом 10 (десет). Мастер академске студије на Универзитету у Београду-Пољопривредном факултету, студијски програм Фитомедицина уписала је школске 2016/17. године, а завршила је 27.09.2017. године са просечном оценом 9,88 (девет и 88/100), одбравши мастер рад под насловом „Карактеризација изолата вируса мозаика краставца на основу секвенци СР и МР гена применом анализе полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената (RFLP методе)“ са оценом 10 (десет). Докторске академске студије на Универзитету у Београду-Пољопривредном факултету, студијски програм

Пољопривредне науке, модул Фитомедицина, уписала је школске 2017/18. године. Од 2018. године као стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије ангажована је на Катедри за фитопатологију, Универзитета у Београду-Пољопривредног факултета, на пројекту III 43001: „Агробiodиверзитет и коришћење земљишта у Србији: интегрисана процена бiодиверзитета кључних група артропода и биљних патогена“. Поводом 97 година постојања и рада 28.03.2016. године, Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет, доделио је похвалницу Бранки Петровић за постигнут одличан успех на студијском програму Биљна производња, модул Фитомедицина. До сада је саопштила два научна рада на националним скуповима. Говори, чита и пише енглески језик и члан је Друштва за заштиту биља Србије.

1.2 Предлог теме докторске дисертације

Предложена тема дисертације “Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*) пореклом са различитих домаћина у Србији“ је добро одмерена и у потпуности одражава предвиђене циљеве, програм и предмет истраживања, али Комисија предлаже промену наслова у “Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*) пореклом из различитих домаћина у Србији“. Комисија предлаже промену наслова због усаглашавања са недавно извршеним променама у таксономији фамилија и родова у оквиру реда *Bunyavirales* и да би наслов био у духу српског језика.

2. Предмет и циљ дисертације

2.1 Предмет и програм истраживања

Предмет истраживања предвиђен изработом ове докторске дисертације је састав и генетичка структура природне популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV) пореклом из различитих домаћина и локалитета у Србији, прикупљених у различитим годинама, односно вегетационим сезонама. Програм истраживања обухватиће молекуларну идентификацију и карактеризацију изолата овог вируса пореклом из различитих биљака домаћина сакупљених на различитим локалитетима, секвенцирање различитих делова генома и испитивање генетичког диверзитета и варијабилности изолата, филогенетске анализе, анализу рекомбинација и одређивање селекционог притиска. Добијени резултати допринеће утврђивању састава природне популације и расветљавању молекуларне епидемиологије, укључујући могуће путеве интродукције и начин ширења овог вируса у нашој земљи.

Обољење које изазива вирус бронзавости парадајза први пут је описано 1919. године у Аустралији као пегаво увенуће парадајза, а вирусна природа обољења потврђена је 1930. године (**Samuel et al., 1930**). До 1940. године TSWV је интензивно проучаван и описан у многим земљама као вирус који проузрокује обољење са великим економским последицама. Међутим, после Другог светског рата TSWV је у западној Европи и у медитеранском региону практично нестао. Могући узрок нестанка вируса било је или напуштање гајења дувана у западној Европи или промена у популацији вектора *T. tabaci*, имајући у виду да различите популације *T. tabaci*, који је у то време био најважнији вектор овог вируса, имају различиту ефикасност у преношењу TSWV (**Chatzivassiliou et al., 2000a**). Раних 80-их година XX века уочена је поновна масовна појава и изражено географско ширење вируса, чему је претходила брза експанзија другог ефикасног вектора - *Frankliniella occidentalis*. Ова врста, пореклом из Северне Америке, данас је широко

распрострањена у Европи (EPPO/CABI, 1997) и поновно епидемијско ширење вируса у Европи уско је повезано са појавом и брзим ширењем новог ефикасног вектора.

Данас, TSWV је један од десет економски најзначајнијих и најпроучаванијих биљних вируса, одговоран за бројне епидемије на различитим усевама широм света (OEPP/EPPO, 1999). Због широке распрострањености и ефикасности свог вектора, али и због недостатака специфичности у односу на домаћине, TSWV је један од најдеструктивнијих вируса у свету. Вредност губитака услед заразе овим вирусом процењује се на око 1 милијарду долара годишње (Scott, 2000). Вирус је одговоран за бројне епидемије на различитим усевама у различитим деловима света, а најчешће на поврћу и украсним биљкама. У неким регионима Бразила, Аргентине, Канаде, Данске, Италије, Холандије, Велике Британије и САД, TSWV је постао економски најважнији вирус (OEPP/EPPO, 1999).

У Србији, присуство TSWV први пут је забележено на дувану 1969. године (Мицковски, 1969). Касније, присуство вируса доказано је и у парадајзу (Мијатовић и сар., 1999), паприци (Дукић и сар., 2002), као и у 23 рода украсних биљака (Крстић и Булајић, 2007; Stanković et al., 2011b; Stanković et al., 2013; Nikolić et al., 2013). Последњих година забележено је и ширење круга домаћина овог вируса у нашој земљи, па су тако забележени и први налази овог вируса на црном и белом луку (Stanković et al., 2012) и две врсте тикава *Cucurbita pepo* 'Beogradska' и *C. maxima* (Vučurović et al., 2012). *C. maxima* се наводи као нови домаћин овог вируса не само у Србији, већ и у свету. Проучавања у нашој земљи, пре свега, односе се на утврђивање појаве и распрострањености TSWV на различитим домаћинима, док је делимична молекуларна карактеризација на основу секвенци N гена (*nucleocapsid gene*) обављена само за изолате овог вируса, пореклом са дувана, паприке и парадајза (Stanković et al., 2011a; Милошевић, 2013; Nikolić et al., 2018).

Досадашња истраживања указала су на проширење круга домаћина овог вируса како у Европи и свету, тако и у Србији, што поткрепљује чињеницу да се TSWV убраја у биљне вирусе са најширим кругом домаћина, који за сада броји преко 1300 биљних врста из 92 фамилије, које укључују бројне значајне повртарске и индустријске културе, као и различите украсне биљке, али и коровске врсте (EFSA, 2012).

У природи се TSWV преноси путем вектора-трипса, од којих се као најзначајније врсте наводе *F. occidentalis* и *T. tabaci*, а значајан начин преношења је и зараженим пропагативним материјалом (Pappu et al., 2009). Коровске врсте, домаћини овог вируса и репродуктивни домаћини за векторе, омогућавају одржавање TSWV у зимском периоду и представљају најзначајнији извор инокулума овог вируса.

Честице TSWV су квазисферичне, величине 80-120 nm и окружене су двоструком липопротеинском мембраном. Геном чине три линеарне једноланчане неинфективне RNA [ss (–) RNA] или „ambisense” RNA [ss (+/–) RNA], означене као S (*short*), M (*middle*) и L (*large*). Највећа L RNA је неинфективна (–) и кодира RNA-зависну RNA полимеразу (RdRp). M RNA је бицистронска и кодира NSm протеин који је укључен у кретање вируса од ћелије до ћелије (*movement*, транспортни протеин) и гликопротеине Gp и Gc које кодира вирусно-комплементарни ланац M RNA (*nonviral sense*). S RNA је такође бицистронска и кодира стварање NSs неструктурног протеина који изазива формирање агрегата или филамената у ћелијама зараженим TSWV и има функцију утишавања гена (*gene silencing*) и N структурни протеин (протеин нуклеокапсида), који кодира вирусно-комплементарни ланац S RNA (*nonviral sense*) (Pappu et al. 2009).

TSWV у природи па чак и у истој биљци домаћину постоји као комплекс сојева, што указује на његову изразиту варијабилност (**Chatzivassiliou et al., 2000b; Persley et al., 2006**). Хетерогеност популације и брза адаптибилност су две основне фенотипске карактеристике по којима се TSWV истиче међу осталим биљним вирусима (**Tsompana et al., 2005**). Због постојања троделног генома, разноврсност сојева овог вируса условљена је не само мутацијама и рекомбинацијама већ и псеудорекомбинацијама које подразумевају прерасподелу између самих геномних сегмената (**Qiu et al., 1999**). На основу филогенетских анализа кодирајућих (N, NSm и NSs) и не кодирајућих (IGR на S и M RNA) секвенци TSWV, могуће је утврдити сличности и разлике на молекуларном нивоу између различитих изолата овог вируса, које се доводе у везу са његовим географским пореклом (**Heinze et al., 2003; Tsompana et al., 2005**). На основу досадашњих истраживања, заснованих на филогенетским анализама, утврђено је да је популација овог вируса дефинисана на основу географског порекла, уз извесна одступања услед интензивне размене зараженог биљног материјала путем међународне трговине, која доводи до протока гена између географски различитих региона (**Tsompana et al., 2005**). **Tentchev et al. (2011)** наводе да се груписање француских изолата TSWV у оквиру Азијске групе може довести у везу са постојањем три независне интродукције овог вируса у Европу.

Разлике између изолата нарочито се односе на експресију симптома на различитим домаћинима, серолошке особине и адаптибилност TSWV на нове домаћине и нова географска подручја. Поред тога, велика варијабилност вируса омогућава брзо превазилажење конвенционалне и трансгенетске резистентности (**Cho et al., 1996**), што додатно отежава контролу обољења.

Велика индивидуална генетичка варијабилност унутар појединачне врсте је одлика свих фитопатогених вируса који имају RNA геном, па и TSWV. Карактеризација полиморфног модела генетичке варијабилности вируса пресудна је у разумевању филогенетских међуодноса, генетичке структуре популације и епидемиолошких чинилаца као што су порекло, број интродукција и начин ширења изолата овог вируса, као и еволутивних механизма који утичу на појаву нових или повећање значаја већ постојећих изолата и других фактора који доприносе превазилажењу отпорности и савладавању других стратегија контроле. Први подаци о генетичкој структури природне популације TSWV и први подаци о факторима који обликују популацију овог вируса у нашој земљи добиће се применом RT-PCR методе и умножавањем фрагмената довољно варијабилних и информативних геномних региона различитих RNA сегмената, затим прорачуном генетичког диверзитета и филогенетских анализа, као и анализом рекомбинација и утврђивањем статистичких параметара генетичке структуре природне популације овог вируса.

2.2 Научни циљ истраживања

Основни циљ ове докторске дисертације је да се кроз утврђивање генетичког диверзитета и структуре популације TSWV, коришћењем секвенци репрезентативних изолата овог вируса пореклом из различитих домаћина и са различитих локалитета у Србији, утврди утицај различитих фактора на обликовање популације овог вируса у нашој земљи.

Молекуларна карактеризација одабраних изолата TSWV, заснована на прорачуну генетичког диверзитета између испитиваних изолата и са изолатима из других делова света и на филогенетској анализи секвенцираних различитих делова три геномна сегмената, даће увид не само у структуру популације и диверзитет изолата овог вируса у

нашој земљи, већ ће указати и на постојање рекомбинација и псеудорекомбинација и њихову заступљеност, факторе који утичу на облик варирања и степен промена у оквиру популације овог вируса у Србији, као и одговоре на важна епидемиолошка питања као што су извори заразе, начини интродукције и ширења овог вируса.

Предвиђена истраживања молекуларне карактеризације изолата TSWV из Србије, пореклом из различитих биљака домаћина и различитог географског порекла, подразумевају коришћење података секвенци одређених гена испитиваних изолата вируса за филогенетске анализе, евалуацију параметара популационе генетике, диференцирање субпопулација вируса на територији Србије и утврђивање еволутивног селекционог притиска на геном вируса. На овај начин ће се утврдити генетичка варијабилност изолата пореклом из Србије, њихова међусобна еволутивна повезаност, као и повезаност са изолатима овог вируса из других делова света.

3. Основне хипотезе од којих се полази у истраживању

Испитивања која ће се обавити у оквиру ове докторске дисертације, заснована су на чињеници да је почев од 80-их година XX века, TSWV проузроковач бројних епидемија на различитим усевима широм света. Експанзија и брзо ширење новог ефикасног вектора допринели су поновној масовној појави и епидемијском ширењу вируса у Европи, па и Србији. Осим тога, чињеница да се TSWV показао као високо адаптибилан вирус, који брзо превазилази створену отпорност биљака, даје му важну улогу у производњи бројних повртарских, индустријских и украсних биљака.

Досадашња проучавања појаве, присуства и распрострањености TSWV у нашој земљи указала су на економски значај овог вируса чије је присуство у Србији утврђено на важним пољопривредним културама као што су дуван, парадајз, паприка и тикве, али и бројне врсте украсних биљака. Обзиром на велики економски значај TSWV, повећану међународну размену биљног материјала и могућност интродукције овог вируса увозом зараженог или трипсима инфицираног вегетативног пропагативног материјала, претпоставка је да ће молекуларна истраживања у оквиру ове докторске дисертације, заснована на принципима популационе генетике указати на начине и путеве ширења овог вируса и омогућити даља молекуларна епидемиолошка истраживања која ће имати за циљ развој стратегије која укључује примену ефикаснијих мера контроле овог вируса у нашој земљи.

Имајући у виду изражену варијабилност TSWV, претпоставља се да ће проучавање молекуларне популационе генетике овог вируса дати веома прецизна сазнања о генетичком диверзитету и структури популације овог вируса у нашој земљи. Такође, претпоставка је да ће се анализом одређених параметара популационе генетике и њиховом статистичком обрадом утврдити могући фактори који утичу на еволутивне промене, односно обликују варирање и степен промена у оквиру популације овог вируса. Нова сазнања о структури популације и молекуларној епидемиологији допринеће бољем познавању овог вируса у нашој земљи.

4. Методе које ће се применити у истраживањима

4.1. Изолати TSWV

У циљу анализе генетичке структуре популације TSWV у Србији, за истраживања одабраће се изолати TSWV пореклом из најзначајнијих домаћина вируса у нашој земљи укључујући дукан, парадајз, паприку и различите врсте украсних биљака (*Impatiens* sp., *Chrysanthemum* sp., *Brugmansia* sp., *Vinca* sp.) пореклом из различитих локалитета (Куписина, Велико Војловце, Рача Крагујевачка, Бешка, Бачки Петровац, Нови Кнежевац, Љутово, Лапотинце, Хртковци, Врањска Бања, Цековица) у којима је присуство вируса претходно доказано применом DAS-ELISA теста. За ова истраживања користиће се изолати овог вируса сакупљени у периоду од 2015. до 2017. године, као и изолати из колекције Лабораторије за вирусологију и микологију, Катедре за фитопатологију, Института за фитомедицину како би се обухватио што већи број биљака домаћина или истих домаћина са различитим симптомима природне заразе пореклом са што већег броја локалитета на територији наше земље, сакупљених у различитом временском периоду.

4.2. Амплификација различитих гена одабраних изолата TSWV

Метода реверзне транскрипције праћене ланчаном реакцијом полимеразе (*Reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) биће примењена у циљу умножавања различитих делова генома одабраних изолата TSWV који су довољно конзервативни да би се доказали изолати вируса из различитих биљака домаћина и довољно варијабилни да би указали на разлике између испитиваних изолата овог вируса.

Екстракција укупних RNA из биљног материјала обавиће се применом RNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) према упутству произвођача или применом цетилтриметиламонијум бромид (CTAB) протокола (Li et al., 2008).

Умножавање фрагмената четири гена одабраних изолата TSWV обавиће се применом „One-step“ RT-PCR Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) коришћењем специфичних парова прајмера и то: L2 TSWV F/L1 TSWV R (Mumford et al., 1996) за умножавање RdRp гена (RNA-зависна RNA полимеразе) у оквиру L сегмента, M66/M962 (Qiu et al., 1998) за умножавање NSm гена (транспортни протеин) у оквиру M сегмента, као и TSWVCP-f/TSWVCP-r (Vučković et al., 2012) за умножавање N гена (структурни протеин) и S70/S890 (Qiu et al., 1998) за умножавање NSs гена (неструктурни протеин) у оквиру S сегмента.

Визуелизација умножених продуката PCR реакције извршиће се електрофоретским раздвајањем у 1% агарозном гелу у 1x TBE пуферу, бојењем етидијумбромидом и посатрањем под UV-трансулуминатором.

4.3. Пречишћавање PCR продуката и секвенцирање

У циљу добијања секвенци одабраних изолата TSWV за наведена четири гена, након извршене амплификације, PCR продукти свих појединачних гена одабраних изолата биће послати на услужно пречишћавање и секвенцирање у Macrogen, Inc., Јужна Кореја.

4.4. Анализа секвенци одабраних изолата TSWV

Даља карактеризација овог вируса, као и прорачун генетичке сличности и утврђивање диверзитета секвенци изолата овог вируса у нашој земљи обавиће се након обраде добијених секвенци у програму FinchTV Version 1.4.0. и њиховим међусобним поређењем у CLUSTAL W програму, интегрисаном унутар софтверског пакета MEGA 6.0

(Thompson et al., 1994; Tamura et al., 2013) и добијањем консензус секвенци одабраних изолата. Анализа добијених консензус секвенци извршиће се најпре помоћу BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) анализе, а након тога утврдиће се прорачун нуклеотидне и аминокиселинске сличности одабраних изолата са изолатима из других делова света, чије су секвенце доступне у GenBank бази података (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Како би се извршио прорачун генетичке сличности секвенци гена одабраних изолата са изолатима из других делова света, користиће се програм MEGA верзија 6.0.

4.5. Филогенетске анализе

У циљу проучавања еволутивне повезаности изолата TSWV, вишеструко упаривање секвенци и реконструкција филогенетских стабла за различите делове генома секвенционираних изолата из Србије пореклом из различитих биљака домаћина и различитих локалитета са изолатима доступним у бази података обавиће се употребом neighbor-joining или maximum parsimony методе, интегрисане унутар програма MEGA верзија 6.0 и „bootstrap“ анализе са 1000 понављања. Израчунавање просечне вредности генетичке удаљености унутар и између група које су се издвојиле у филогенетским стаблима, обавиће се применом параметра одређеног применом методе максималне веродостојности на основу најниже вредности BIC (*Bayesian Information Criterion*) за испитивани сет секвенци. Груписање одабраних изолата у реконструисаним филогенетским стаблима указаће на састав и структуру популације TSWV у Србији, али и на могуће постојање рекомбинантних или псеудорекомбинантних изолата. Осим тога, анализа филогенетске повезаности између изолата TSWV пореклом из Србије обавиће се и употребом TCS 1.21 програма (Clement et al., 2000), који ће указати на диверзитет анализираних секвенци у односу на остале секвенце TSWV у свету, бројност хаплотипова, као и на могуће путеве интродукције овог вируса у нашу земљу.

4.6. Анализа рекомбинација

Испитивање постојања рекомбинантних изолата обавиће се помоћу RDP v4.36 (*Recombination Detection Program*) софтвера (Martin et al., 2015), који поред основног RDP програма истовремено користи још шест различитих програма који детектују постојање рекомбинација у анализираним секвенцама: BOOTSCAN/RECSCAN, GENECONV, MAXCHI (*Maximum Chi Square*), CHIMAERA, SISCAN (*Sister Scanning*), 3SEQ и LARD (*Likelihood Assisted Recombination Detection*). Уколико се утврди постојање рекомбинантних изолата, применом овог програма одредиће се број појединачних места рекомбинације, као и родитељске секвенце рекомбинантних изолата.

4.7. „Codon-based“ Z-тест селекције

Како би се утврдио тип селекције (позитивна, негативна или неутрална селекција) под којим се налазе секвенце гена одабраних изолата, која утиче на обликовање и састав популације TSWV у Србији, примениће се „codon-based“ Z-тест селекције имплементиран у MEGA 6.0 софтверу. Најпре ће се одредити број синонимних супституција по синонимном месту (dS) и број несинонимних супституција по несинонимном месту (dN), као и њихове варијансе $Var(dS)$ и $Var(dN)$, а затим ће се израчунати вредност Z по формули $Z=(dN-dS)/SQRT(Var(dS)+Var(dN))$. Вредност $Z>1$ (однос $dN/dS>1$) указује на позитивну селекцију, $Z<1$ (однос $dN/dS<1$) указује на негативну („purifying“) селекцију, а уколико је $Z=1$ (однос $dN/dS=1$) ради се о неутралној селекцији. Ове анализе ће се обавити

коришћењем Nei-Gojobori супституционог модела и „bootstrap“ анализе са 1000 понављања (Nei and Kumar, 2000) имплементираних у MEGA 6.0 софтверу.

Сва испитивања, осим секвенцирања, обавиће се у Лабораторији за вирусологију и микологију, Катедре за фитопатологију, Универзитета у Београду-Пољопривредног факултета.

5. Очекивани резултати и научни допринос

Предложена докторска дисертација планира истраживања која по обиму и теми нису раније обављена у нашој земљи, због чега се очекује већи број значајних резултата. Очекује се да ће опсежна молекуларна карактеризација одабраних изолата указати на степен варирања изолата TSWV, најзначајније изворе варирања у оквиру популације, утицај међународне трговине на учесталост интродукција, значај развоја локалних популација, утврђивање врсте селекционог притиска и других епидемиолошких фактора који утичу на обликовање популације овог вируса у нашој земљи.

6. Закључак

На основу анализе поднете пријаве, одржане јавне одбране научне заснованости теме, предложеног програма и научног циља докторске дисертације мастер инжењера пољопривреде Бранке Петровић, стипендисте Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под измењеним насловом: “Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*) пореклом из различитих домаћина у Србији“, Комисија сматра да је изабрана тема од великог значаја за науку и праксу.

Мада TSWV проузрокује значајне економске штете у производњи великог броја повртарских, индустријских и украсних биљака постоји мало података о саставу и генетичкој структури популације овог вируса у нашој земљи, тако да ће истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом представљати комплетну студију о овом вирусу у нашој земљи. Истраживањима у оквиру ове докторске дисертације обавиће се детаљна молекуларна карактеризација изолата TSWV пореклом из различитих домаћина кроз прорачун генетичког диверзитета, филогенетске анализе секвенци различитих делова три геномна сегмената, утврђивање постојања рекомбинантних сојева, као и проучавање одређених параметара еволуције. На овај начин добиће се први подаци о генетичкој структури природне популације и факторима који обликују популацију овог вируса у нашој земљи.

Поред великог фундаменталног, ова докторска дисертација имаће и практични значај јер ће утврдити начине и путеве интродукције и ширења овог вируса и омогућити даља молекуларна епидемиолошка истраживања и примену ефикаснијих и дуготрајнијих стратегија контроле обољења која овај вирус изазива у нашој земљи.

На основу свега изнетог, Комисија позитивно оцењује поднету пријаву и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати поднету пријаву и Бранки Петровић, мастер инжењеру пољопривреде одобри израду докторске дисертације под измењеним насловом: “Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*) пореклом из различитих домаћина у Србији“.

Комисија за ментора ове докторске дисертације предлага др Ивану Станковић, ванредног професора.

7. Име и референце предложеног ментора

Име и презиме ментора: др Ивана Станковић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Nikolić, D., Vučurović, A., **Stanković, I.**, Radović, N., Zečević, K., Bulajić, A., Krstić, B. (2018): Viruses affecting tomato crops in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 225-235.
2. Bulajić, A., **Stanković, I.**, Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Ivanović, M., Krstić, B. (2014): *Tomato spotted wilt virus* - Potato Cultivar Susceptibility and Tuber Transmission. *American Journal of Potato Research* 91:186-194.
3. Milošević, D., **Stanković, I.**, Bulajić, A., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Petrović, G., Krstić, B. (2015): Detection and molecular characterization of *Pepper mild mottle virus* in Serbia. *Genetika (Beograd)* 47: 651-663.
4. Vučurović, A., Bulajić, A., **Stanković, I.**, Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., Krstić, B. (2012): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. *European Journal of Plant Pathology* 133: 935-947.
5. **Stanković, I.**, Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Berenji, J., Krstić B. (2011): Status of tobacco viruses in Serbia and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Acta Virologica* 55: 337-347.

Београд, 18.04.2019. године

Чланови Комисије:

др Бранка Крстић, редовни професор
(ужа научна област: Фитопатологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет

др Ивана Станковић, ванредни професор
(ужа научна област: Фитопатологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет

др Данијела Ристић, научни сарадник
(ужа научна дисциплина: Фитопатологија)
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд

Прилог 1. Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидата Бранке Петровић

- Николић, Д., Вучуровић, А., Станковић, И., Зечевић, К., **Петровић, Б.**, Крстић, Б. (2018): Диверзитет и заступљеност вируса парадајза у Србији. Зборник резимеа 15. Симпозијума о заштити биља, Сарајево, Босна и Херцеговина, стр. 29-30.
- Николић, Д., Вучуровић, А., Станковић, И., Зечевић, К., **Петровић, Б.**, Крстић, Б. (2018): Присуство и распрострањеност вируса мозаика парадајза и вируса мозаика дувана на парадајзу у Србији. Зборник резимеа радова XV Саветовања о заштити биља, Златибор, Србија, стр. 31-32.

Прилог 2. Списак литературе која ће се користити

- Chatzivassiliou, E. K., Livieratos, I., Jenser, G., Katis, N. I. (2000a): Ornamental plants and thrips populations associated with Tomato spotted wilt virus in Greece. *Phytoparasitica* 28: 257-264.
- Chatzivassiliou, E. K., Weekes, R., Morris, J., Wood, K. R., Barker, I., Katis, N. I. (2000b): *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in Greece: its incidence following the expansion of *Frankliniella occidentalis* and characterisation of isolates collected from various hosts. *Annals of Applied Biology* 137: 127-134.
- Cho, J. J., Custer, D. M., Brommonschenkel, S. H., Tanksley, S. D. (1996): Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to the *Tomato spotted wilt virus*. *Acta Horticulturae* 431: 367-378.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A. (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- Дукић, Н., Finetti Sialer, М. М., Gallitelli, D., Крстић, Б., Вицо, И., Дудук, Б. (2002): Молекуларна идентификација вируса бронзавости парадајза на паприци. Зборник резимеа XII Симпозијума о заштити биља и саветовања о примени пестицида, Златибор, Србија, стр. 72.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH) (2012): Scientific opinion on the pest categorization of the tospoviruses. *EFSA Journal* 10: 2772.
- Heinze, C., Willingmann, P., Schwach, F., Adam, G. (2003): An unusual large intergenic region in the S-RNA of a Bulgarian *Tomato spotted wilt virus* isolate. *Archives of Virology* 148: 199-205.
- Крстић, Б., Булајић, А. (2007): Карантински вируси поврћа и украсних биљака у заштићеном простору. Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет и Министарство пољопривреде, водопривреде и шумарства, Београд.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J., Kinard, G. (2008): A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods* 154: 48-55.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B. (2015): RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1: vev003, <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>.
- Мицковски, Ј. (1969): *Tomato spotted wilt virus* на дувану у Југославији (*Lycopersicum virus* 3-Smith). *Заштита биља* 105: 203-214.
- Мијатовић, М., Обрадовић, А., Ивановић, М., Стевановић, Д. (1999): Распрострањеност и интензитет појаве неких вируса паразита паприке у Србији. *Заштита биља* 50: 151-159.
- Mumford, R. A., Barker, I., Wood, K. R. (1996): An improved method for the detection of *Tospoviruses* using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 57: 109-115.
- Nei, M., Kumar, S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nikolić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Bulajić, A., Krstić, B. (2013): First Report of *Tomato spotted wilt virus* on *Brugmansia* sp. in Serbia. *Plant Disease* 97: 850.

- Nikolić, D., Vučurović, A., Stanković, I., Radović, N., Zečević, K., Bulajić, A., Krstić B. (2018): Viruses affecting tomato crops in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, doi: 10.1007/s10658-018-1467-y.
- OEPP/EPPO (1999): Data sheets on quarantine pests. *Tomato spotted wilt virus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 29: 465-472.
- Pappu, H. R., Jones, R. A. C., Jain, R. K. (2009): Global status of *tomspovirus* epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141: 219-236.
- Persley, D. M., Thomas, J. E. and Sharman, M. (2006): *Tospoviruses*—an Australian perspective. *Australasian Plant Pathology* 35: 161-180.
- Qiu, W., Moyer, J. W. (1999): *Tomato spotted wilt tospovirus* adapts to TSWV N gene-derived resistance by genome reassortment. *Phytopathology* 89: 575-582.
- Samuel, G., Bald, J. G., Pittman, H. A. (1930): Investigations on „spotted wilt“ of tomatoes. *Australian Council of Science and industrial Research Bulletin* 44: 64.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Berenji, J., Krstić B. (2011a): Status of tobacco viruses in Serbia and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Acta Virologica* 55: 337-347.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Jović, J., Krstić, B. (2011b): First report of *Tomato spotted wilt virus* on *Gerbera hybrida* in Serbia. *Plant Disease* 95: 226.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Nikolić, D., Krstić, B. (2012): First Report of *Tomato spotted wilt virus* Infecting Onion and Garlic in Serbia. *Plant Disease* 96: 918.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Nikolić, D., Krstić, B. (2013): First Report of *Tomato spotted wilt virus* on Chrysanthemum in Serbia. *Plant Disease* 97: 150.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J. M., Moury, B. (2011): Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology* 92: 961 - 973.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M., Moyer, J. W. (2005): The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Molecular Ecology* 14: 53-66.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., Krstić, B. (2012): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. *European Journal of Plant Pathology* 133: 935-947.