

Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Веће научних области
биотехничких наука

32/25-4.1.

(Број захтева)

28.02.2024.

(Датум)

(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 чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Генетички и биохемијски одговор генотипова луцерке на токсично деловање јона
алуминијума у условима повећане киселости“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Ратарство и повртарство

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

1. Марија, Драган, Степић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета,
студијски програм):

Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет, Биологија

3. Година завршетка

претходног нивоа студија: 2019.

4. Година уписа на докторске студије: 2020/2021.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Пољопривредне науке

6. Датум подношења пријаве
теме докторске дисертације 17.11.2023.

ПОДАЦИ О ПРВОМ МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: др Славен Продановић

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Randjelovic P., Djordjevic V., Miladinovic J., **Prodanovic S.**, Ceran M., Vollmann J. (2023): High-throughput phenotyping for non-destructive estimation of soybean fresh biomass using a machine learning model and temporal UAV data. *Plant methods*, 19/1, -.
2. Rankovic, D., Todorovic, G., Tabakovic, M., **Prodanovic, S.**, Bocanski, J., Delic N. (2021): Direct and Joint Effects of Genotype, Defoliation and Crop Density on the Yield of Three Inbred Maize Lines. *Agriculture–Basel*, 11/6, 509-514.
3. Wang, R., Zhang, J., Luo, F., Liu, N., **Prodanovic, S.**, Yan, Y. (2021): Cloning and Molecular Characterization of Two Novel Lmw-M Type Glutenin Genes from *Triticum spelta* L. *Genetika*, 53/1, 141-155.
4. Popovic, A., Kravic, N., **Prodanovic, S.**, Filipovic, M., Secanski, M., Babic, V., Miritescu, M. (2020): Characterisation and Evaluation Towards Selection of Maize Landraces with the Best Per Sie Performances. *Romanian Agricultural Research*, 37, 49-58.
5. Andjelkovic, V., Cvejic, S., Jocic, S., Kondic-Spika, A., Marjanovic-Jeromela, A., Mikic, S., **Prodanovic, S.**, Radanovic, A., Savic-Ivanov, M., Trkulja, D., Miladinovic, D. (2020): Use of plant genetic resources in crop improvement-example of Serbia. *Genetic resources and crop evolution*, 67/8, 1935-1948.

ПОДАЦИ О ДРУГОМ МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: др Јасмина Радовић

Звање: научни саветник

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Nay, M. M., Grieder, C., Frey, L., A., Amdahl, H., **Radovic, J.**, B., Jaluvka, L., Palme, A., Skot, L., Ruttink, T., Kolliker, R. (2023): Multi-location trials and population-based genotyping reveal high diversity and adaptation to breeding environments in a large collection of red clover. *Frontiers in plant science*, 14, -.
2. Babić, S., Sokolović, D., **Radović, J.**, Anđelković, S., Lugić, Z., Petrović, M., Zorniћ, V. (2023): Variability of meadow fescue accessions and productivity and quality of their polycross progenies. *Romanian Agricultural Research*, 40: 169-176.
3. Luković, M., Šilc, U., Vasin, J., **Radović, J.**, Topisirović, G., Kostić, M., Dajić-Stevanović, Z. (2022): Assessment of quality and chemical composition of continental halophytic grasslands in south-east Europe. *Not. Bot. Horti Agr. Cluj-Napoca*, 50(1): 12694.
4. Andjelković, S., **Radović, J.**, Babić, S., Vasić, T., Djurić, S., Stamenov, D., Hajnal Jafari T. (2020): Response of Microorganisms in Alfalfa Rhizosphere to Microbial Inoculation. *Legume Research*, 43 (5): 706-710.

5. Zornić, V., Stevović, V., Lugić, Z., Anđelković, S., Jevtić, G., **Radović, J.**, Petrović, M. (2019): Effect of nitrogen and lime on the floristic composition soil microbes and dry matter yield of *Danthonietum calycinae* grassland. Not. Bot. Horti Agr. Cluj-Napoca, 47(4): 1055-1062.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 28.02.2024. 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: 32/25-4.1.
Датум: 28.02.2024. 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 28.02.2024. године, донело је

ОДЛУКУ

I ПРИХВАТА СЕ тема докторске дисертације коју је поднела **МАРИЈА СТЕПИЋ, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«ГЕНЕТИЧКИ И БИОХЕМИЈСКИ ОДГОВОР ГЕНОТИПОВА ЛУЦЕРКЕ НА ТОКСИЧНО ДЕЛОВАЊЕ ЈОНА АЛУМИНИЈУМА У УСЛОВИМА ПОВЕЋАНЕ КИСЕЛОСТИ».**

II За првог ментора се именује др Славен Продановић, редовни професор Универзитета у Београду - Пољопривредног факултета.

За другог ментора се именује др Јасмина Радовић, научни саветник Института за крмно биље у Крушевцу.

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 Марија Степић, 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, менторима, Институту за ратарство и повртарство, Студентској служби и архиви.

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Број: 32/23-4.1.

Дана 25. 1. 2024. године

Београд - Земун

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидаткиње Марије Степић, мастер биолога

На основу члана 44. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог Већа Катедре за генетику, оплемењивање биљака и семенарство и мишљења Наставно-научног већа Института за ратарство и повртарство, Наставно-научно веће Пољопривредног факултета на седници одржаној 27. 12. 2023. године, донело је одлуку бр. 32/23-4.1 да се образује Комисија у саставу др Славен Продановић, редовни професор, Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет (ужа научна област: Оплемењивање биљака), др Јасмина Радовић, научни саветник, Институт за крмно биље Крушевац (Научна дисциплина: Биотехничке науке - Пољопривреда), др Саво Вучковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет (ужа научна област: Крмно биље и травњаци), др Светлана Тошић, ванредни професор, Универзитет у Нишу – Природно-математички факултет (ужа научна област: Ботаника) и др Јелена Виторовић, ванредни професор, Универзитет у Нишу – Природно-математички факултет (ужа научна област: Експериментална биологија и биотехнологија) за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидаткиње Марије Степић, мастера, под насловом: „Генетички и биохемијски одговор генотипова луцерке на токсично деловање јона алуминијума у условима повећане киселости“.

Кандидаткиња је дана 9. 01. 2024. године одбранила пријављену тему докторске дисертације. У име Комисије, председник Комисије, др Саво Вучковић, редовни професор, подноси

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

1.1. Биографија кандидата

Марија Степић је рођена 3. децембра 1995. године у Крушевцу, Република Србија. Завршила је основне академске студије на Природно-математичком факултету у Нишу, на Департману за биологију и екологију. Мастер рад на Природно-математичком факултету у Нишу, на студијском програму Биологија, одбранила је 2019. године под називом „Ефекат уља конопље на хронични стрес изазван водоник пероксидом код ларви врсте *Drosophila melanogaster*“. Докторске студије уписала је 2020. године, на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Пољопривредне науке, Модул: Ратарство и повртарство.

Добитница је повеље за најбољег студента који је завршио мастер академске студије у школској 2018/2019. године на студијском програму „Биологија“ Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу. У завршној години основних академских студија школске 2016/2017. године, као и завршној години мастер академских студија 2018/2019. године била је добитница стипендије Доситеја, коју додељује Фонд за младе таленте Републике Србије.

1.2. Предлог теме докторске дисертације

Комисија је прихватила предложени наслов дисертације који гласи „**Генетички и биохемијски одговор генотипова луцерке на токсично деловање јона алуминијума у условима повећане киселости**“. Комисија сматра да тема са овим насловом пружа јасну слику о предмету, програму и научним циљевима дисертације. Тема је из научне области биотехничке науке / пољопривредне науке, ужа научна област генетика и оплемењивање биљака.

2. Предмет и циљ дисертације

2.1. Предмет и програм дисертације

Предмет дисертације је испитивање одговора различитих генотипова луцерке на токсичан ефекат алуминијума (Al).

Луцерка (*Medicago sativa* L.) је једна од најстаријих и најважнијих вишегодишњих крмних биљака, која се користи као висококвалитетно сено и силажа (Annicchiarico et al., 2015). Луцерка заузима значајне површине земљишта у свету и код нас. Има битно место у плодореду јер побољшава физичка својства и биогеност земљишта, утиче на микробиолошке процесе, а захваљујући азотофиксацији, повећава садржај азота, а самим тим повећава и плодност земљишта.

Земљина кора садржи велике количине алуминијума од којих је већина присутна у нетоксичном облику. Алуминијум је амфотерни елемент са активним хемијским својствима: реагује са јаким базама и раствара се и у киселим растворима. При ацидификацији земљишта, када рН падне испод 5,5, алуминосиликатне глине и минерали алуминијум-хидроксида се растварају у токсичне облике, од којих су најтоксичнији за биљке Al^{3+} и $Al(OH)^{2+}$ (Chowra et al., 2017, Krstic et al., 2012).

Токсичност метала је један од највећих глобалних проблема у пољопривреди, међу којима је токсичност алуминијума најраспрострањеније ограничење које смањује раст и принос многих усева на киселим земљиштима широм света. Око 50% светских обрадивих површина је кисело (Jaskoviak et al., 2019). Сходно томе, алуминијумски стрес се појавио као кључно еколошко питање за биљке, одмах након стреса изазваног сушом (Kranper et al., 2010). Примарни симптом токсичности алуминијума на биљкама је инхибиција раста корена, која настаје услед промена у структури ткива и различитих биохемијских процеса (Khoiriah et al., 2016). Значајна последица деловања алуминијумског стреса је увећана продукција реактивних врста кисеоника (ROS), у које спадају слободни радикали попут $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$ и не-радикали као што су H_2O_2 и 1O_2 (Fábián et al., 2019). ROS настају као нуспроизвод метаболизма кисеоника и имају улогу у ћелијској организацији и хомеостазу (Phaniendra et al., 2015). Они су и токсични молекули који изазивају оксидативно

оштећење ДНК, протеина, липида и других важних биомолекула чиме се мења нормални редокс статус биљке. ROS доводи до смрти ћелија у ткиву корена биљке, као и до повећања активности антиоксидативних ензима супероксид-дисмутазе, аскорбат-пероксидазе, каталазе и глутатион-редуктазе (Shahnavaz i Sanadhia, 2017). Компоненте незасићених масних киселина мембранских фосфолипида посебно су подложне штетном деловању ROS-а. Оштећења мембранских липида доводе до повећања садржаја малондиалдехида (MDA). Садржај MDA се често користи као индикатор степена липидне пероксидације (Sharma et al., 2012). Доказано је да алуминијум изазива деградацију хлорофила а и b у листовима, што за последицу има смањење интензитета фотосинтезе.

Луцерка је веома осетљива на низак pH; на њен раст и развој снажно утичу киселост земљишта и токсичност Al^{3+} јона (Khu et al., 2012). Алуминијумски стрес луцерке изазива низ иреверзибилних молекуларних промена у биљкама, успоравајући њихов раст и развој, што последично утиче на принос и квалитет усева. Код луцерке се квалитет биомасе првенствено односи на садржај суве материје и садржај протеина. Најосетљивији делови биљних ћелија и ткива луцерке на Al јоне су: једро, ћелијска мембрана и зид, односно цитоскелет и врх корена. Због токсичности алуминијума, коренов систем постаје браон боје, отечен, закривљен и значајно му недостаје бочно гранање, док листови постају некротични услед хлорозе (Butare et al., 2011). Запремина корена је једна од најосетљивијих особина на токсичност алуминијумом, а потом и пречник стабљике, висине биљке и површине листа.

Степен токсичности Al јона зависи у знатној мери од генотипа биљке, односно од тога у којој мери је генотип Al осетљив или Al толерантан (Rahman et al., 2018). Биљке имају различите механизме којима се супротстављају токсичним ефектима алуминијума, а чија је основа генетичка. Детаљније су проучени механизам искључивања и механизам унутрашње толеранције. Одговор биљака на токсичност алуминијума започиње на молекуларном нивоу, а експримује се на фенотипу, кроз промену морфолошких, анатомских, биохемијских и физиолошких особина. Фенотипизација адаптације корена луцерке на земљиште са повећаном киселошћу и садржајем алуминијума представља добру основу за усмерену селекцију на толерантност према токсичности Al. Оплемењивачи врше дескрипцију различитих генотипова према њиховом одговору на абиотички стрес изазван токсичним Al-јонима, како би одабрали одговарајуће родитеље за укрштања. Такав приступ у раду омогућава стварање сорти луцерке које дају високе и стабилне приносе на земљиштима различитог степена киселости.

Програм дисертације – Истраживања ће се спровести током наредног периода коришћењем генотипова из ген-колекције Института за крмно биље, кроз огледе у контролисаним условима, односно коришћењем хидропонике и судова, у понављањима, како би се добила одговарајућа база података о утицају Al јона на морфолошке и продуктивне особине. Осим тога, део истраживања ће се обавити у лабораторијама Института и Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, у циљу одређивања квалитета биомасе генотипова луцерке и обављања одговарајућих биохемијских анализа. Одговори сваког генотипа на токсично деловање јона алуминијума у условима повећане киселости, као и контролне варијанте, биће фенотипизирани, а њихова морфологија биће забележена дигиталном камером. После реализације овог дела програма, кандидаткиња ће приступити статистичкој обради података, табеларном и графичком приказивању резултата, као и дискусији тих резултата, уз поређење са резултатима других аутора, те писању текста дисертације.

2.2. Научни циљ истраживања

Основни циљ истраживања ове докторске дисертације јесте испитивање одговора различитих генотипова луцерке на низак рН уз присуство алуминијума. Ради реализације овог циља вршиће се скрининг различитог селекционог материјала, односно испитаће се његова толерантност према токсичним Al-јонима у хидропонским условима и на земљишном супстрату у судовима. Генотипови са највећом толеранцијом на токсичност алуминијума ће се користити као родитељи за рекомбинацију гена и за добијање потомства, како би се побољшао домаћи сортимент луцерке.

У фокусу ових истраживања је процес оплемењивања луцерке, односно налажење иновативних решења при стварању нових, толерантних сорти. У складу са тим, истраживања у дисертацији су постављена тако да омогућују и реализацију следећих циљева:

1. Моделирање генске експресија (енг. Modeling of gene expression) на стрес изазван алуминијумом: издвојиће се особине по којима генотипови реагују на исти начин, као и особине које имају различити смер промене;

2. Анализа варијација особина унутар популација (енг. Within-population variation) у генетичком одговору на абиотички стрес изазван токсичним Al јонима, а што оплемењивачима указује на разлике у минор генима између генотипова луцерке и на погодност популација за селекцију;

3. Процена вредности генетичких параметара особина (компонената толерантности на токсичност Al) луцерке, на основу праћења реакције биљака при променама спољних услова (хидропонски раствор и земљишни супстрат) и концентрације Al, укључујући израчунавање компонената фенотипске варијабилности и херитабилности. То је битно јер указује на време трајања и очекивану добит селекције при усмерењу на одређене особине луцерке.

4. Одређивање корелативних веза између особина унутар популација, између различитих генотипова и при примењеним третманима. Познавање корелација је корисно при усмереној селекцији на одређену особину јер омогућава да се предвиде промене вредности других особина.

На основу добијених информација о генетичкој основи и статистичких, односно биометријских анализа одредиће се селекциони критеријуми и правци за одабир генотипова луцерке толерантних на испитивани абиотички стрес.

3. Основне хипотезе од којих се полази у истраживању

У овом истраживању полази се од следећих претпоставки:

1. При испитивању колекције различитих генотипова луцерке на толерантност према ниској рН вредности у присуству токсичних јона алуминијума уочиће се значајне генотипске разлике. Преглед (скрининг) одабраних генетичких ресурса луцерке ће омогућити да се издвоје генотипови са највећом толерантношћу.

2. Очекује се да ефекат различитих рН и концентрација Al неће бити исти на особине луцерке. За претпоставити је да ће излагање генотипова јонима алуминијума при ниској рН имати негативан ефекат на морфолошке особине биљака, посебно особине корена, при чему се очекује знатна унутар-популациона и међу-популациона варијабилност.

3. Биохемијски параметри ће омогућити квантификацију стреса код генотипова луцерке и зато се могу користити као показатељи нивоа толерантности према ниској рН и садржају алуминијума.

4. За очекивати је да одабране индивидуе са најслабијим генетичким и биохемијским одговором на испитивани абиотски стрес имају пожељне мајор гене и високу фреквенцију минор гена за толерантност према ниској рН и садржају алуминијума. Оне могу бити успешно коришћене у даљем процесу селекције.

4. Методе које ће се применити у истраживању

4.1. Биљни материјал - У истраживањима ће се бити укључен биљни материјал различите отпорности на повећану киселост земљишта. Укупно ће се испитивати 30 различитих генотипова. Као стандард ће се користити сорте К 28 (сорта Института за крмно биље) и Зузана (сорта Оплемењивачке станице Железице, Брно, Република Чешка), које су у пракси показале већу толерантност на гајење на земљиштима повећане киселости. Поред тога, користиће се домаће сорте (5), домаће популације (3), експерименталне линије Института за крмно биље (10), као и страни селекциони материјал (10).

4.2. Огледи у контролисаним условима – Скрининг генотипова луцерке на толерантност према ниској рН и садржају алуминијума вршиће се у хидропонским условима и у судовима.

4.2.1. Хидропонски услови - Семе ће бити постављено у перфориране калупе од стиropора, који ће плутати на Hoagland-овом раствору $\frac{1}{2}$ јачине (рН 6) следећег састава: 2,5 mM KNO_3 , 0,5 mM NH_4NO_3 , 1 mM MgSO_4 , 0,5mM KH_2PO_4 , 2mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 25 μM FeSO_4 , 25 μM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 2,5 μM KI , 50 μM MnSO_4 , 50 μM H_3BO_3 , 0,05 μM CuSO_4 , 15 μM ZnSO_4 , 0,5 μM NaMoO_4 и 0,05 μM CoCl_2 . У систем ће бити постављена пумпа која ће обезбедити аерацију раствора. Цео систем ће се поставити у контролисаним условима, у комори за раст са константном температуром од 25°C (дан/ноћ), са фотопериодом од 14 сати. Недељу дана након сетве, додаће се предтретман CaCl_2 у трајању од 24 h, како би се одржала хомеостаза и како би се спречило да алуминијум реагује са другим елементима, најпре фосфором. Након тога, биљке ће бити третиране Hoagland-овим раствором $\frac{1}{2}$ јачине (рН 4,5) са додатком AlCl_3 концентрације 100 μM . Третман алуминијумом ће трајати 2 недеље, а целокупан скрининг 3 недеље. Сваки генотип ће бити заступљен са 30 биљака по третману. Третмани толерантности на алуминијум и низак рН ће бити следећи: 1. контрола (хранљиви раствор рН вредности 6), 2. низак рН (хранљиви раствор рН вредности 4,5) и 3. низак рН и Al^{3+} (хранљиви раствор рН вредности 4,5 уз додатак AlCl_3 концентрације 100 μM). На клијанцима ће се пратити: морфолошке особине (дужина корена, свежа маса корена, дужина хипокотила, број бочних коренова, дужина бочних коренова, свежа маса изданка) и анализирати биохемијске особине (активност антиоксидативних ензима (каталазе и пероксидазе), концентрација пролина, MDA и хлорофила, као и степен акумулације алуминијума у врховима корена бојењем хематоксилином).

4.2.2. Огледи у судовима - Преглед (скрининг) генотипова луцерке на толерантност према токсичности алуминијума, спровешће се и у судовима испуњеним земљишним супстратом. Сваки генотип ће бити заступљен са 30 биљака по третману. Када биљке достигну старост 2 недеље, потапаће се свакодневно 1 h у растворе

различитих концентрација алуминијума у трајању од 6 недеља. Толерантност на алуминијум и низак pH ће се испитати у следећим третманима: 1. контрола (pH 6), 2. низак pH (pH 4,5), 3. низак pH и Al (pH 4,5, AlCl₃ - 2 mM), 4. низак pH и Al (pH 4,5, AlCl₃ - 5 mM), 5. низак pH и Al (pH 4,5, AlCl₃ - 10 mM). На биљкама ће се пратити: морфолошке особине (запремина корена, дужина корена, свежа маса корена, сува маса корена, висина биљке, свежа надземна маса, сува надземна маса) и анализирати биохемијске особине (активност антиоксидативних ензима (каталазе, пероксидазе), концентрација пролина, MDA и хлорофила).

4.3. Лабораторијске анализе – Биохемијске методе

4.3.1. Активност антиоксидативних ензима одредиће се спектрофотометријски. Прво ће се извршити изолација протеина. Делови ткива биљака (на -80°C), механички ће бити уситњени у порцеланским аванима уз коришћење течног азота. Изолациони пуфер ће се састојати од 50 mM Tris-HCl (pH 7), 8,2 mM EDTA, 10% (v/v) глицерола, 2% (v/v) поливинилполипиролитона, 10 mM β-меркаптоетанола и 1,5% (v/v) протеазног инхибиторног коктела за екстракте биљних ћелија и ткива. Након хомогенизације, материјал ће бити пребачен у микротубе и центрифугиран 15 минута на 14000 rpm, ради уклањања делова ћелије. Центрифугирањем се добија талог у коме ће се налазити органеле, ћелијски зидови, и супернатант у коме ће се налазити протеини, и то првенствено ензими (протеински екстракт).

Активност ензима каталазе ће бити одређена спектрофотометријски, методом према Aebi (1984). Метода се заснива на праћењу промене апсорбанце услед смањивања количине водоник пероксида при деловању ензима каталазе. Промена апсорбанце ће бити праћена на спектрофотометру у временским интервалима на таласној дужини од 240 nm.

Активност ензима гвајакол пероксидазе ће такође бити одређена спектрофотометријски, методом према Siegel i Galston (1967). Метода се заснива на праћењу промене апсорбанце услед оксидације гвајакола при деловању ензима гвајакол пероксидазе при чему се формира жуто-смеђе обојени тетрагвајакол. Промена апсорбанце ће бити праћена спектрофотометријски у временским интервалима на таласној дужини од 470 nm.

4.3.2. Концентрација пролина биће одређена спектрофотометријски према методи Bates et al. (1973). Метода је заснована на реакцији нинхидрина (2,2-дихидрокси-1,3-индадион) са екстрахованим пролином при чему настаје обојење чији је интензитет пропорционалан концентрацији пролина у узорку.

4.3.3. Концентрација малондиалдехида (MDA) ће се одредити такође спектрофотометријски, читавањем на таласним дужинама од 532 и 600 nm, према методи Heath и Packer (1968).

4.3.4. Концентрација фотосинтетичких пигмената (хлорофил а, хлорофил b, укупни хлорофил и каротеноиди) ће бити вршена спектрофотометријски методом према Đukić (2013). Екстракција фотосинтетичких пигмената биће вршена помоћу ацетона. Хомогенизација ће бити вршена у тамној просторији због фотосензибилности самих пигмената. Апсорбанце фотосинтетичких пигмената ће бити прочитане на таласним дужинама од 662, 644 и 440 nm.

4.3.5. Степен акумулације алуминијума у врховима корена биће одређен бојењем хематоксилином, по модификованој методи Polle et al. (1978).

4.4. Статистичка обрада података – Примениће се анализа варијансе (ANOVA), а статистички значајне разлике између третмана и генотипова биће процењене на основу

LSD теста са прагом значајности 0,05. Интеракције између сорти и различитих концентрација алуминијума ће бити процењене помоћу факторијалне анализе варијансе, а разлике ће бити тестиране помоћу LSD теста. Експериментални подаци за све особине биће представљени као просечна вредност узорка параметара и биће наведене њихове мере варијабилности (стандардна грешка, стандардна девијација и коефицијент варијације). За биометријску обраду података у циљу добијања генетичких параметара користиће се модел Falconer и Mackay (1995). За одређивање корелативне повезаности особине израчунаће се Pearson-ови коефицијенти простих фенотипских корелација.

5. Очекивани резултати и научни допринос

Очекивани резултат ове докторске дисертације јесте изналажење детаља о генетичком и биохемијском механизму одговара луцерке на токсично деловање јона алуминијума у киселој средини. Из колекције гермплазме луцерке Института за крмно биље, која ће бити коришћена у овој докторској дисертацији, идентификоваће се најтолерентнији генотипови на наведени абиотички стрес. Добиће се база података о морфолошким и биохемијским особинама значајног дела домаће колекције луцерке. Процениће се колика је варијабилност испољена у популацијама луцерке за особине које су у вези са толеранцијом на токсичне јоне алуминијума и да ли она представља погодну основу за селекцију супериорних генотипова.

Као резултат ове дисертације очекује се развој модела генске експресија на стрес изазван алуминијумом. Такође ће се извршити процена вредности генетичких параметара испитиваних особина повезаних са толерантношћу на токсичност Al. Формираће се матрица корелационих коефицијената између тих особина. Та сазнања допринеће унапређењу процеса оплемењивања луцерке и убрзању селекционог процеса после хибридизације одабраних родитеља. Ова дисертација допринеће да се произведу нове сорте луцерке које ће моћи да се гаје на земљишту повећане киселости, односно да се повећају производне површине под луцерком.

Очекивани резултат ове дисертације је што ће се обавити поређење две методе испитивања толерантности луцерке на абиотички стрес. До сада је било уобичајено да се анализира одговор биљака на стрес кроз пољске огледе и огледе у судовима. У овој дисертацији уведена су хидропонска испитивања биљног материјала. Уколико се та метода испитивања толерантности на токсичност алуминијума покаже подједнако информативна као метода судова, увела би се као валидна у оплемењивачку праксу, јер се њеном применом долази до резултата брже, лакше и једноставније.

Осим наведеног, кроз рад на дисертацији, Марија Степић ће овладати потребним вештинама за анализу биохемијских параметара, што ће у великој мери унапредити рад на конвенционалном оплемењивачком процесу на луцерки.

6. Закључак

На основу анализе поднете пријаве, одржане јавне одбране научне заснованости теме, предложеног програма и очекиваних резултата докторске дисертације кандидаткиње Марије Степић, мастер биолога, Комисија сматра да је изабрана тема, под насловом, „Генетички и биохемијски одговор генотипова луцерке на токсично деловање јона алуминијума у условима повећане киселости“, од великог значаја за науку и праксу.

Наведени наслов докторске дисертације одговара постављеном циљу као и програму истраживања. Кандидаткиња је током писања пријаве и јавне одбране показала широко знање везано за проблематику проучавања токсичности алуминијума, као и компетентност и иновативност у решавању задатака које поставља дисертација. Комисија је уверена да ће кандидаткиња у потпуности реализовати предложени програм. Истраживања у оквиру ове дисертације заснивају се на морфолошкој и биохемијској карактеризацији различитих генотипова луцерке у условима алуминијумског стреса. Истраживањима се врши детекција механизма толерантности на абиотички стрес индукован токсичним деловањем јона алуминијума у условима повећане киселости. Истраживања по овој теми доприносе унапређењу оплемењивачких програма за добијање селекционог материјала луцерке са повећаном толеранцијом на токсичност алуминијума у киселим земљиштима.

На основу свега изнетог, Комисија позитивно оцењује поднету пријаву и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да Марији Степић, мастер биологу, одобри израду докторске дисертације под насловом „**Генетички и биохемијски одговор генотипова луцерке на токсично деловање јона алуминијума у условима повећане киселости**“.

Комисија предлаже да кандидаткињи при реализацији докторске дисертације буде ментор 1 др Славен Продановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и ментор 2 др Јасмина Радовић, научни саветник Института за крмно биље, Крушевац. Др Славен Продановић ће кандидаткињи пружити знање и подршку из стручних области генетике и оплемењивања биљака у универзитетској средини, док ће др Јасмина Радовић, као руководилац научног пројекта у Институту за крмно биље, саветовати кандидаткињу о практичним аспектима истраживања.

7. Име и референце предложеног/их ментора

Име и презиме ментора 1: **др Славен Продановић**. Звање: **редовни професор**
Списак радова који квалификују ментора 1 за вођење докторске дисертације:

1. Randjelovic P., Djordjevic V., Miladinovic J., **Prodanovic S.**, Ceran M., Vollmann J. (2023): High-throughput phenotyping for non-destructive estimation of soybean fresh biomass using a machine learning model and temporal UAV data. *Plant methods*, 19/1, -.
2. Rankovic, D., Todorovic, G., Tabakovic, M., **Prodanovic, S.**, Bocanski, J., Delic N. (2021): Direct and Joint Effects of Genotype, Defoliation and Crop Density on the Yield of Three Inbred Maize Lines. *Agriculture–Basel*, 11/6, 509-514.
3. Wang, R., Zhang, J., Luo, F., Liu, N., **Prodanovic, S.**, Yan, Y. (2021): Cloning and Molecular Characterization of Two Novel Lmw-M Type Glutenin Genes from *Triticum spelta* L. *Genetika*, 53/1, 141-155.
4. Popovic, A., Kravic, N., **Prodanovic, S.**, Filipovic, M., Secanski, M., Babic, V., Miricescu, M. (2020): Characterisation and Evaluation Towards Selection of Maize Landraces with the Best Per Sie Performances. *Romanian Agricultural Research*, 37, 49-58.
5. Andjelkovic, V., Cvejic, S., Jovic, S., Kondic-Spika, A., Marjanovic-Jeromela, A., Mikic, S., **Prodanovic, S.**, Radanovic, A., Savic-Ivanov, M., Trkulja, D., Miladinovic, D. (2020): Use of plant genetic resources in crop improvement-example of Serbia. *Genetic resources and crop evolution*, 67/8, 1935-1948.

Име и презиме ментора 2: **др Јасмина Радовић**. Звање: научни саветник
Списак радова који квалификују ментора 2 за вођење докторске дисертације:

1. Nay, M. M., Grieder, C., Frey, L., A., Amdahl, H., **Radovic, J.**, B., Jaluvka, L., Palme, A., Skot, L., Ruttink, T., Kolliker, R. (2023): Multi-location trials and population-based genotyping reveal high diversity and adaptation to breeding environments in a large collection of red clover. *Frontiers in plant science*, 14, -.
2. Babić, S., Sokolović, D., **Radović, J.**, Anđelković, S., Lugić, Z., Petrović, M., Zornić, V. (2023): Variability of meadow fescue accessions and productivity and quality of their polycross progenies. *Romanian Agricultural Research*, 40: 169-176.
3. Luković, M., Šilc, U., Vasin, J., **Radović, J.**, Topisirović, G., Kostić, M., Dajić-Stevanović, Z. (2022): Assessment of quality and chemical composition of continental halophytic grasslands in south-east Europe. *Not. Bot. Horti Agr. Cluj-Napoca*, 50(1): 12694.
4. Andjelković, S., **Radović, J.**, Babić, S., Vasić, T., Djurić, S., Stamenov, D., Hajnal Jafari T. (2020): Response of Microorganisms in Alfalfa Rhizosphere to Microbial Inoculation. *Legume Research*, 43 (5): 706-710.
5. Zornić, V., Stevović, V., Lugić, Z., Anđelković, S., Jevtić, G., **Radović, J.**, Petrović, M. (2019): Effect of nitrogen and lime on the floristic composition soil microbes and dry matter yield of *Danthonietum calycinae* grassland. *Not. Bot. Horti Agr. Cluj-Napoca*, 47(4): 1055-1062.

Београд – Земун
Дана 25. 01. 2024. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Саво Вучковић, редовни професор, председник
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет,
(Ужа научна област: Крмно биље и травњаци)

др Славен Продановић, редовни професор, члан
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет,
(Ужа научна област: Оплеменењање биљака)

др Јасмина Радовић, научни саветник, члан
Институт за крмно биље Крушевац,
(Научна дисциплина: Биотехничке науке - Пољопривреда)

др Светлана Тошић, ванредни професор, члан
Универзитет у Нишу – Природно-математички факултет,
(Ужа научна област: Ботаника)

др Јелена Виторовић, ванредни професор, члан
Универзитет у Нишу – Природно-математички факултет,
(Ужа научна област: Експериментална биологија и биотехнологија)

Прилог 1. Списак литературе која ће се користити у истраживању:

1. Aebi H. (1984): Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, 105: 121-126.
2. Annicchiarico P., Nazzicari N., Li X., Wei Y., Pecetti L., Brummer E. C. (2015): Accuracy of genomic selection for alfalfa biomass yield in different reference populations. BMC genomics, 16: 1-13.
3. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973): Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39: 205–207.
4. Butare, L., Rao, I., Lepoivre, P., Polania, J., Cajiao, C., Cuasquer, J., Beebe, S. (2011): New genetic sources of resistance in the genus Phaseolus to individual and combined aluminium toxicity and progressive soil drying stresses. Euphytica, 181, 385-404.
5. Chowra U., Yanase E., Koyama H., Panda S. K. (2017): Aluminium-induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper. Protoplasma, 254, 293-302.
6. Đukić N. (2013): Eksperimentalna biohemija, praktikum. Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno matematički fakultet, Kragujvac.
7. Fábíán A., Sáfrán E., Szabó-Eitel G., Barnabás B., Jäger K. (2019): Stigma functionality and fertility are reduced by heat and drought co-stress in wheat. Frontiers in Plant Science, 10, 244.
8. Falconer D.S., Mackay T.F. (1995): Introduction to Quantitative Genetics (4th ed.). Longman. ISBN 978-0582243026
9. Heath R.L., Packer L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics, 125: 189-198.
10. Jaskowiak J., Kwasniewska J., Milewska-Hendel A., Kurczynska E.U., Szurman-Zubrzycka M., Szarejko I. (2019): Aluminum alters the histology and pectin cell wall composition of barley roots. International Journal of Molecular Sciences, 20(12): 3039.
11. Khoiriyah A., Putra E.T.S., Yudono P. (2016): Proline activity and growth of oil palm affected by aluminium toxicity and silica as ameliorant. Ilmu Pertanian (Agricultural Science), 1(1): 007-012.
12. Khu D.M., Reyno R., Brummer E. C., Monteros M. J. (2012): Screening methods for aluminum tolerance in alfalfa. Crop Science, 52(1): 161-167.
13. Kranner I., Minibayeva F.V., Beckett R.P., Seal C.E. (2010): What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. New Phytologist, 188(3): 655-673.
14. Krstic D., Djalovic I., Nikezic D., Bjelic D. (2012): Aluminium in acid soils: chemistry, toxicity and impact on maize plants. Food production-approaches, challenges and tasks, 231-242.
15. Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. (2015): Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian j. of clinical biochemistry, 30: 11-26.
16. Polle E., Konzak C.F., Kattrick J.A. (1978). Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. Crop Science, 18(5): 823-827.
17. Rahman M.A., Lee S.H., Ji H.C., Kabir A.H., Jones C.S., Lee, K.W. (2018): Importance of mineral nutrition for mitigating aluminum toxicity in plants on acidic soils: current status and opportunities. International journal of molecular sciences, 19(10): 3073.

18. Shahnawaz M.D., Sanadhya D. (2017): Aluminium induced oxidative stress and antioxidants system in two barley varieties and its alleviation through ascorbic acid and salicylic acid seed priming approach. *Life*, 50: 26.
19. Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 1-26.
20. Siegel B.Z., Galston W. (1967): The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiology*, 42: 221-226.

Прилог 2. Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидата

1. Spasov, K, **Stepić, M.**, Vitorović, J., Cvetković, V., Jovanović, N., Dimitrijević, J., Stanković, N., Mitrović, T., Joković, N. (2019): *Drosophila* larvae exposed to H₂O₂ as a model of acute oxidative stress for the examination of plants antioxidative potential. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions Stara planina Mt. 20th-23th June, 117.
2. Andjelković, S., Babić S., Milenković, J., **Stepić, M.**, Marković, J., Bekčić, F., Mitra, D. (2022): The response of different cultivars birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) on pre-sowing inoculation. Proceedings of XIII International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2022", October 06-09, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 142-147.
3. Marković, J., Vasić, T., **Stepić, M.**, Racić, N., Bekčić, F., Lazarević, Đ., Kostić, I. (2022): Structural and non-structural carbohydrates content of apple pomace silages. Proceedings of XIII International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2022", October 06-09, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 1169-1174.
4. Marković, J., Lazarević, Đ., Racić, N., **Stepić, M.**, Bekčić, F., Kostić, I., Vasić, T. (2022): Primarily protein fractions by CNCPS (Cornell Net Carbohydrates and Protein System) of apple pomace silages. Journal of mountain agriculture on the Balkans, 25 (1), 264-279.
5. Бекчић, Ф., Вицо, И., Вучковић, Н., Микић, С., **Степић, М.**, Анђелковић, С., Дудук, Н. (2022): *Penicillium crustosum* - проузроковач плаве трулежи плодова нектарине. Зборник резимеа XVII Саветовања о заштити биља, Златибор, 34-35.
6. Petrović, M., Prijović, M., Živković-Antić, I., Stojanović, V., Vymyslický, T., **Stepić, M.**, Babić, S., Sokolović, D. (2022): Pregled flore specijalnog rezervata prirode "Osredak" deceniju nakon završetka studije zaštite. Zaštita Prirode, 72(1-2), 25-38.
7. Marković, J., Milenković J., Petrović, M., Zornić, B., Racić, N., **Stepić M.**, Blagojević M. (2023): Nutritive value of field pea-oat and common vetch-oat bicrops. Journal of Agricultural Sciences (Belgrade), Vol. 68, No. 1, 1-18. Review article.
8. Петровић, М., Пријовић, М., **Степић, М.**, Анђелковић, С., Бабић, С., Зорнић, В., Соколовић, Д. (2023): Багремац (*Amorpha fruticosa* L.) страна инвазивна врста на простору Специјалног резервата природе "Осредак". Прва конференција Српског биолошког друштва "Стеван Јаковљевић" Крагујевац, 20-22.09. Крагујевац, Србија, Књига извода: 111 стр.
9. Bekčić, F., Duduk, N., Lugić, Z., Radović, J., Babić, S., **Stepić, M.** and Andelković, S. (2023): Antifungal activity of rhizobia against red clover pathogens from genus *Fusarium*. Proceedings of XIV International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2023". 5-8 October, Jahorina, Bosnia and Herzegovina. 607-612.
10. Marković, J., Vasić, T., Zornić, V., Racić, N., Bekčić, F., **Stepić, M.**, Kostić, I. (2023): Nutritive value of Italian rye grass – red clover mixtures depending on the seeding rate in the mixtures. Proceedings of the XIV International Agriculture Symposium »Agrosym 2023«, 5-8 October, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 274-279.
11. **Степић, М.**, Бекчић, Ф., Пријовић, М., Радовић, Ј., Здравковић, Ј. (2023): Генетички одговор луцерке на токсично деловање јона алуминијума на киселој хидропонској култури. Зборник абстраката X Симпозијума друштва селекционара и семенара Републике Србије и VII Симпозијума секције за оплемењивање организама Друштва генетичара Србије, 16-18 октобар, Врњачка бања, 127-128.

12. Petrović, M., Zornić, V., Lugić, Z., **Stepić, M.**, Prijović, M., Vymyslicky, T., Anđelković, B. (2023): An initial metabolomic study on Hungarian clover. Book of abstracts of the 35th meeting of the EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section, 10-14 September, Brno, Czech Republic, 33-35.
13. Prijović M., Sokolović D, Babić S, Petrović M, **Stepić M**, Lazarević Đ, Sabovljević A (2023): Morpho-biochemical response of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations to water shortage. Book of Abstracts of the 35th Meeting of the EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section, 10 – 14 September, Brno, Czech Republic.
14. Bekčić, F., **Stepić, M.**, Anđelković, S., Marković, J., Vučković, N., Vico, I., Duduk, N. (2023): Wilt of red clover caused by *Fusarium oxysporum*. Book of abstract of the 35th Meeting of the EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section, 10-14 September, Brno, Czech Republic, 105-106.
15. Petrović, M., Zornić, V., Milenković, J., **Stepić, M.**, Radović, J., Tomić D., Andjelković, S. (2023): Predselekciono ispitivanje genotipova mađarske dateline. Zbornik apstrakata X simpozijum društva selekcionera i semenara Republike Srbije i VII simpozijum selekcije za oplemenjivanje organizama društva genetičara Srbije, 16.-18. oktobar, Vrnjačka Banja, 63-64.