

**НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Датум: 01.02.2016.

Предмет: Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације мр Горана Станковића

Одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Пољопривредног факултета од 27. 01. 2016 године, именована је Комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације мр Горана Ј. Станковића, истраживача сарадника у Институту за кукуруз „Земун Поље” под насловом: “Утврђивање дивергентности синтетичких популација кукуруза и њиховог потомства фенотипским и молекуларним маркерима”.

Комисија у саставу: др Гордана Шурлан Момировић, редовни професор у пензији Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Томислав Живановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Јелена Ванчетовић, научни саветник Института за кукуруз „Земун Поље“, др Славен Продановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Душан Станисављевић, научни сарадник Института за ратарство и повртарство, Нови Сад, прегледала је и оценила докторску дисертацију и подноси Већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација мр Горана Ј. Станковића написана је на 161 стране куцаног текста и садржи 43 табеле, 12 графикана и 5 слика. У дисертацији је цитирано 188 извора литературе.

Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику; Информације о ментору и члановима комисије; Захвалницу; Резиме на српском и енглеском језику; Садржај; Текст по поглављима: Увод (стр. 1 - 3), Циљ истраживања (стр. 4), Преглед литературе (стр. 5 - 30), Радна хипотеза (стр. 31), Материјал и метод рада (стр. 32 – 60), Резултати и дискусија (стр. 61 – 139), Закључак (стр. 140 - 142) и Литература (143 - 161), Биографију аутора; Изјаву о ауторству; Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

2. Приказ и анализа дисертације

У поглављу **Увод** наводе се да су оплемењивачи кукуруза под сталним притиском стварања нових, побољшаних хибридних комбинације, а то се најчешће постиже употребом елитног селекционог материјала уске генетичке основе. Једна од метода која се користи за инкорпорацију егзотичне гермплазме у адаптирани материјал је рекурентна селекција која омогућава мале, успешне промене у фреквенцији алела уз повећање генетичке варијабилности. Избор почетног материјала за селекцију је потребно извршити на бази оцене агрономских особина, анализе порекла, одговарајућих генетичких параметара и резултата анализа молекуларних маркера.

Избор мање групе индивидуа из популације, са којима ће се наставити даљи рад, је критична тачка једног програма селекције кукуруза.

Као **Циљ истраживања** докторске дисертације истиче се значај процене генетичке дивергентности родитељских инбред линија, синтетичких популација кукуруза и њиховог потомства. Претпоставка је да ће се применом S_1 рекурентне селекције добити инбред линије бољих агрономских особина и веће генетичке варијабилности у односу на родитељске. Мр Горан Станковић у овом поглављу дефинисао је следеће циљеве истраживања: проучавање разлика и промена у фреквенцији алела између родитеља, синтетичких популација и њиховог потомства; испитивање акумулације пожељних алела у потомствима; утврђивање генетичке варијабилности родитељских линија, синтетичких популација и њиховог потомства; испитивање сродности родитељских линија и процена вредности синтетичких популација за даљи рад на добијању инбред линија кукуруза.

У поглављу **Преглед литературе** приказани су резултати истраживања других аутора који су блиско повезани за предмет истраживања дисертације. Уз помоћ других литерарних извора разматран је проблем смањења генетичке варијабилности селекционог материјала који се користи у програмима оплемењивања кукуруза. Данас је у комерцијалној употреби само 5% укупне гермплазме кукуруза. Пољопривреда у развијеним земљама се заснива на гајењу малог броја хибрида чија је генетичка основа релативно уска и униформна. Селекционери су одбацили велики део „лоших“ инбред линија на рачун малог броја генотипова високе адаптивне вредности. Одабрани генотипови се даље користе за стварање F_2 популација и синтетика уске генетичке основе као извора нових линија. Крајем прошлог века, 80% комерцијалних линија у С.А.Д. било је пореклом из две популације, а у Европи су три линије учествовале у стварању 50% комерцијалних хибрида кукуруза. С друге стране, адаптација биљака на различите услове спољашње средине, толерантност на биотичке и абиотичке стресове зависи од постојеће генетичке варијабилности. Проучавања на молекуларном нивоу су потврдила да је генетичка дивергентност у позитивној корелацији са хетерозисом. Увидевши важност генетичке варијабилности почетног материјала селекционери су почели да стварају синтетичке популације које у себи садрже више елитних линија добрих агрономских особина и комбинационих вредности и егзотичну гермплазму. Под претпоставком да егзотична гермплазма садржи алеле за пожељне особине, они нису приступачни док се не укључе у адаптирани материјал кроз дугорочне програме цикличне селекције и већи број рекомбинација. Рекурентна селекција је можда најбољи метод за уношење нове гермплазме у селекционе програме кукуруза пошто допушта додатне рекомбинације и мале промене у фреквенцији алела уз одржавање генетичке варијабилности.

У поглављу **Радна хипотеза** се полази од претпоставке да ће се стварањем синтетичких популација од одабраних родитељских линија постићи већа акумулација пожељних алела за агрономски важне особине; да ће се формирањем синтетичких популација повећати генетичка варијабилност материјала и побољшати средње вредности испитиваних особина.

У поглављу **Материјал и метод рада** за ово истраживање одабране су две синтетичке популације кукуруза (*Syn ZP* и *Syn ZP/USA*) настале у дугорочном програму оплемењивања у Институту за кукуруз Земун Поље. Осим ове две популације, у истраживање су укључене и њихове родитељске линије, потомства која су настала из ових популација након првог циклуса S_1 рекурентне селекције, као и синтетичка популација настала рекомбинацијом две наведене популације. Да би се добио материјал за огледе извршена је самооплодња око 300 биљака у сва три синтетика и одабране су по 92 S_1 фамилије. Оглед са њима је постављен по *Nested* дизајну у две

локације и две године (Земун Поље и Панчево у првој, и Земун Поље и Бечеј у другој години). При извођењу огледа примењена је стандардна агротехника за гајење кукуруза. Проучаване су следеће особине: принос зрна са 14% влаге изражен у t/ha, садржај влаге у зрну приликом бербе (%), висина биљке од површине земље до врха метлице (cm), висина клипа од површине земље до нодуса који носи горњи клип (cm), укупан број листова, број листова изнад и испод горњег клипа, дужина клипа (cm), број редова зрна на клипу, број зрна у реду и маса 1000 зрна (g). Други део овог истраживања чинио је оглед са инбред линијама које су учествовале у стварању синтетика, инбред линијама које су добијене из синтетика *Syn ZP* и *Syn ZP/USA*, као и свим трима синтетичким популацијама *per se*. Оглед је био постављен по дизајну потпуно случајног блок система (*RCBD*) на истим локацијама.

Статистичком анализом обухваћене су: средње вредности особина, анализа варијансе и корелационе анализе за оба типа огледа, а херитабилност у ширем смислу, генетичка добит од селекције, функционална анализа између променљивих и анализа главних компоненти (*PCA*) за огледе по *Nested* дизајну.

Од молекуларних анализа урађени су *SSR* маркери за утврђивање сродности и варијабилности експерименталног материјала. За обраду ових резултата коришћен је *NTSYS pc 2.1* статистички програмски пакет.

Геномска ДНК је изолована из семена линија (по пет зрна) и семена синтетика (по 30 зрна) а екстракција ДНК је урађена према протоколу Rogers-а и Bendich-а (1988). Маркер анализа је урађена по методи Edwards-а et al. (1991) коришћењем 24 пара *SSR* прајмера. Информације о позицији на хромозому (*bin*), дужини поновака и секвенцама преузете су из базе података, *Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB)*. Статистички програм *PowerMarker v.3,25 (Liu i Muse, 2005)* коришћен је за израчунавање броја алела, очекиване хетерозиготности и вредности *PIC*-а за сваки *SSR* маркер на основу података о величини умножених секвенци.

Поглавље **Резултати и дискусија** се састоји од неколико потпоглавља. У потпоглављу **Средње вредности квантитативних особина и анализа варијансе код *S1* фамилија синтетичких популација кукуруза** је уочен значај варијабилности почетног материјала за успех оплемењивања, па је један од начина стварање синтетичких популација широке генетичке основе уз даљу примену одговарајућег метода рекурентне селекције. Може се уочити да инкорпорација стране гермплазме у адаптирани материјал није утицала на повећање приноса *S1* фамилија *Syn ZP/USA* у односу на *Syn ZP*. Просечан принос зрна код 92 *S1* фамилије *Syn ZP/USA* (3,328 t/h) је био значајно нижи од просечног приноса у *Syn ZP* (3,783 t/ha). Међутим, ако се посматрају минималне и максималне вредности за принос, примећује се да је принос већи код појединих фамилија *Syn ZP/USA* (4,52 t/ha) у односу на *Syn ZP* (4,06 t/ha), и то веома значајно

Један од најбитнијих параметара за селекцију из популација кукуруза је генетичка варијанса испитиваних фамилија. Утврђене вредности за генетичку варијансу код све три синтетичке популације могу се сматрати значајним пошто су два и више пута веће од вредности својих стандардних грешака. Највећу генетичку варијансу је имала популација *Syn FS* (0,75), значајно нижу *Syn ZP/USA* (0,56), а врло значајно мању у односу на предходне две популације *Syn ZP* (0,28). Иако је принос популације *Syn ZP/USA* нижи од популације *Syn ZP* веће вредност генетичке варијансе указује да је у материјалу на тај начин добијена већа варијабилност која се може искористити за даљу селекцију.

Херитабилност за принос зрна је износила 52,83% код *Syn ZP*, 55,97% за *Syn ZP/USA* и 58,82 % за *Syn SF*. Разлике између израчунатих вредности овог параметра

нису биле велике, што је и било очекивано, пошто је ова особина под великим утицајем спољне средине.

У потпоглављу **Коефицијенти корелација између квантитативних особина код S1 фамилија синтетичких популација кукуруза** може се приметити да су најјачи утицај на принос, код све три популације, имале дужина клипа и број зрна у реду. Насупрот њима, најслабији утицај на принос зрна је имала маса 1000 зрна. Инкорпорација стране гермплазме је утицала на повећање коефицијента генетичке корелације између приноса и дужине клипа код популације *Syn ZP/USA* ($r_g=0,897^{**}$) у односу на популацију *Syn ZP* ($r_g=0,864^{**}$), а код популације *Syn FS* је добијена најнижа вредност овог коефицијента ($r_g=0,844^{**}$). Мало другачији распоред коефицијената генетичке корелације био је присутан код утицаја броја зрна у реду на принос зрна. Највећи утицај је поново био код *Syn ZP/USA* ($r_g=0,791^{**}$), нешто мањи код популације *Syn FS* ($r_g=0,785^{**}$), док је најмањи утицај забележен код популације *Syn ZP* ($r_g=0,766^{**}$). И за ову особину су разлике коефицијената биле мале и сви су коефицијенти били високо значајни. Насупрот овим особинама, маса 1000 зрна је имала најмањи утицај на принос зрна код сва три синтетика који није био значајан. Код популације *Syn ZP* је израчунат највећи коефицијент генетичке корелације од $r_g=0,193^{nz}$, нешто мањи код *Syn ZP/USA* ($r_g=0,176^{nz}$), а најмањи код *Syn FS* ($r_g=0,118^{nz}$).

У потпоглављу **Генетичка добит од селекције код S1 фамилија синтетичких популација кукуруза** истиче се да применом одговарајућих метода селекционери покушавају да остваре што већи генетички прогрес у некој популацији. У практичној селекцији је од великог значаја процена очекиване генетичке добити од селекције као показатеља успешности примењеног селекционог метода и вредности испитиване популације. Величина генетичке добити од селекције зависи од постојеће варијабилности у популацији, висине херитабилности испитиваних особина, интензитета селекције и броја генерација потребних за један циклус рекурентне селекције (Eberhart, 1980). Најмања очекивана генетичка добит за принос зрна је добијена код популације *Syn ZP* и кретала се од 4,53% за интензитет селекције од 20% до 6,68% за интензитет селекције од 5%. Највећа генетичка добит од селекције за принос зрна је израчуната код популације *Syn ZP/USA* и кретала се од 7,27% за интензитет селекције од 20% до 10,72% за интензитет селекције од 5%. Код популације *Syn FS* генетичка добит се кретала од 5,43% за интензитет селекције од 20% до 8,00% за интензитет селекције од 5%.

С обзиром да генетички коефицијенти корелација показују узајамне везе између две особине тешко је, у маси бројних корелација, одредити стварни утицај појединих особина. Мултиваријациона анализа (PCA) је ефикасан метод за редукцију сета података како би се укупна варијанса оригиналних података свела на варијансу мањег броја некорелисаних синтетичких варијабли и описан је у потпоглављу **Мултиваријациона анализа особина код S1 фамилија синтетичких популација кукуруза**. Одређени број S₁ фамилија је груписан око координатног почетка који представља имагинарни фенотип са средњим вредностима свих особина. Већи део фамилија је био распоређен на различитим удаљеностима од координатног почетка. Највећи индиректан утицај на принос зрна израчунат је за дужину клипа и број зрна у реду код све три синтетичке популације. Остале испитиване особине су показале различите индиректне утицаје на принос зрна код различитих популација.

У потпоглављу **Средње вредности квантитативних особина и анализа варијансе код родитељских линија и линија потомства синтетичких популација кукуруза** су највећи просечни принос оствариле три синтетичке популације *per se*, што је и очекиван резултат. Ако ове вредности упоредимо са просечним приносом S₁

фамилија, видимо да је *Syn FS per se* (7,592 t/ha) поново имао највећи принос зрна, али је *Syn ZP/USA per se* (7,068 t/ha) остварио већи принос од *Syn ZP per se* (6,817 t/ha). Високо значајно већи принос од просека линија (3,957 t/ha) су оствариле три линије потомства (*Syn ZP/USA-12/4-2-1-1-1-1=5,842 t/ha*; *Syn ZP/USA-12/6-2-3-2-2-1=5,709 t/ha* и *Syn ZP/USA-6/2-1-2-2-1-1=5,218 t/ha*) и једна родитељска линија, R348 (5,111 t/ha). Све три линије потомства воде порекло из *Syn ZP/USA*. Најприноснија линија из *Syn ZP* је била *Syn ZP-116/4-1-1-1-1-1* која је достигла принос зрна од 4,307 t/ha али је, са друге стране, линија *Syn ZP-13/1-1-1-1-1-1* пореклом из овог синтетика имала најмањи принос зрна (2,876 t/ha). Може се приметити да су све линије потомства, осим линија P1, P3 (пореклом из *Syn ZP*) и P8 (пореклом из *Syn ZP/USA*) имале већи принос од родитељских линија. Најнижи принос од родитељских линија имала је линија R59 (2,876 t/ha) што је веома интересантно, с обзиром да је линија из исте сорте, R348, имала највећи принос зрна међу родитељским линијама. Може се истаћи да су применом рекурентне селекције из синтетисаног почетног материјала створене линије са већим приносом зрна у односу на родитељске линије.

У потпоглављу **Коефицијенти корелација између испитиваних особина код родитељских линија и линија потомства синтетичких популација кукуруза** се наводи да су коефицијенти корелација између приноса зрна и осталих испитиваних особина код родитељских линија и линија потомства показали велику разноврсност испитиваног материјала. Вредности коефицијената корелација варирају од $r = -0,32^{**}$ (број редова зрна и принос зрна код P10) до $r = 0,92^{**}$ (дужина клипа и принос зрна код P1). Ако се посматрају вредности корелација за синтетичке популације *per se*, примећује се да је релативан однос исти као код њихових S₁ фамилија. Код све три популације највећи утицај на принос зрна има дужина клипа. Утицај ове особине је био најмањи код *Syn ZP per se* ($r = 0,79^{**}$), а највећи код *Syn FS per se* ($r = 0,95$).

За одређивање генетичке сличности између линија родитеља, синтетичких популација *per se* и линија потомства синтетичких популација *Syn ZP* и *Syn ZP/USA* коришћена су 24 SSR маркера што је приказано у потпоглављу **Генетичке сличности између родитеља, синтетичких популација *per se* и линија потомства синтетичких популација кукуруза анализираних помоћу SSR маркера**. Укупан број детектованих алела код родитељских линија износио је 116, а просечан број алела по локусу 4,83.

Код линија потомства синтетичких популација укупно је детектовано 100 алела, а њихов просечан број по локусу износио је 4,17. Највећи број алела (девет) је детектован на локусу *umc1506*, а само један на локусу *umc1418*. PIC вредности за сва потомства су се кретале од 0,09 за прајмер *bnlg557* до 0,78 за прајмер *umc1492*.

Анализа генетичке сличности помоћу SSR маркера засебно за линије потомства *Syn ZP*, односно *Syn ZP/USA* дала је мало другачију слику. Укупан број алела који је лоциран помоћу 24 SSR маркера за потомства *Syn ZP* је био 79, а просечан број по локусу 3,29. Само један алел је био детектован на локусу *umc1418*, док је највећи број алела (пет) пронађен на чак 5 локуса, и то *umc1282*; *umc1506*; *bnlg557*; *umc1695* и *umc1492*. Укупан број алела за потомства синтетика *Syn ZP/USA* је износио 80, а просечан број алела по локусу 3,33. Највећи број алела (шест) је детектован на локусима *bnlg1643*; *bnlg197*; *umc1695* и *bnlg2235*, а само по један алел на локусима *umc1418* и *umc2047*.

Вредности коефицијената генетичке сличности (ГС) између родитељских линија и синтетика *per se* кретале су се од 0,45 до 0,82, са средњом вредношћу од 0,61. Коефицијенти генетичке сличности (ГС) између синтетика *Syn ZP per se*, *Syn ZP/USA per se* и линија које воде порекло из њих, кретали су се од 0,45 до 0,85, уз средњу вредност од 0,64.

Највећа генетичка сличност је забележена између линија Syn ZP/USA-12/6-2-3-1-1-1 и Syn ZP/USA-52/4-1-1-2-1-1 и износи 0,85. Може се приметити да су најмање вредности ГС биле између Syn ZP *per se* и свих линија насталих из Syn ZP/USA, што се и могло претпоставити, и оне су се кретала од 0,45 до 0,58, са средњом вредношћу од 0,52. Ова сличност је била мања него ГС између два синтетика (0,62), што се може објаснити утицајем селекције на испитиване генотипове. Сличност Syn ZP са линијама добијеним из њега се кретала од 0,62 до 0,70 (средња вредност 0,66), док се сличност Syn ZP/USA са његовим потомствима кретала од 0,62 до 0,82 (средња вредност 0,71).

У поглављу **Закључак** наводи се да је присутан задовољавајући ниво варијабилности за све испитиване особине код S₁ фамилија синтетичких популација, чиме је испуњен основни предуслов за успешну примену даље селекције кукуруза. Укрштање домаће са страном гермплазмом у Syn ZP/USA је допринело статистички високо значајно повећању средњих вредности за висину биљке (239,76 cm) и висину клипа (107,80 cm) у односу на Syn ZP (VB=223,61 cm и VK=104,07 cm). Рекомбинација гермплазме ове две популације у Syn FS је условило статистички високо значајно повећање средњих вредности свих испитиваних особина.

Јаче генетичке корелације приноса зрна утврђене су са дужином клипа, бројем зрна у реду и укупним бројем листова код све три популације. Јачина корелације за ове особине је била већа код Syn ZP/USA у односу на Syn ZP и Syn FS.

Очекивана генетичка добит од селекције S₁ фамилија за принос зрна била је највећа код популације Syn ZP/USA. За популације Syn ZP/USA и Syn FS израчуната је већа генетичка добит за већину особина у односу на Syn ZP, осим за укупан број листова и број листова испод клипа.

Поређењем средњих вредности синтетика *per se*, родитељских линија и линија потомства утврђено је побољшање особина код линија потомства за све испитиване особине у односу на већину родитељских линија. Потомства Syn ZP/USA су имала боље средње вредности за важније агрономске особине у односу на потомства Syn ZP.

Молекуларном анализом синтетика *per se*, родитељских линија и линија потомства утврђено је да се просечан број алела по локусу смањено са 4,83 код родитељских линија на 4,17 код линија потомства. Кластер анализа генотипова на основу молекуларних маркера груписала је родитељске линије према њиховом познатом пореклу, а линије потомства према изворним популацијама.

Све три испитиване синтетичке популације имају велики селекциони потенцијал. Примењени метод S₁ рекурентне селекције је допринео стварању нових линија супериорнијих од родитељских.

У поглављу **Литература** наведен је списак од 188 референци које су у докторској дисертацији коришћене као основ за примењене методе истраживања и за поређење добијених резултата са другим истраживањима. Референце су сложене по абецедном реду и написане правилно, у складу са прихваћеним стандардима за навођење

3. Закључак и предлог

Истраживања у докторској дисертацији мр Горана Станковића су обављена у потпуности према програму предвиђеном у пријави. Резултати које је кандидат добио у својим истраживањима представљају оригинална решења и драгоцено искуство за оплемењивачки рад на стварању разноврсног генетичког материјала ради даље селекције кукуруза.

У дисертацији су проучавани параметри генетичке варијабилности, херитабилност, генетичка добит од селекције, директни и индиректни корелациони

односи и генетичка дивергентност код синтетичких популација, као и родитељских линија и линија њиховог потомства. За истраживање су коришћене S₁ фамилије три синтетичке популације, синтетици *per se*, десет линија родитеља и једанаест линија потомства.

Резултати истраживања у овој докторској дисертацији потврдили су ефикасност S₁ рекурентне селекције за поправку приноса зрна популација *per se*, као и осталих важних агрономских особина кукуруза. Инкорпорација стране гермплазме у локални материјал, као и додатне рекомбинације, створиле су повећану генетичку варијабилност, а сходно томе је повећана и генетичка добит од селекције. За формирање почетних популација одабран је разноврстан генетички материјал који је током рада на њему задржао своју варијабилност.

Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију мр Горана Станковића, под насловом: “Утврђивање дивергентности синтетичких популација кукуруза и њиховог потомства фенотипским и молекуларним маркерима”, и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да ову оцену усвоји, чиме би си пружила могућност кандидату да приступи јавној одбрани ове докторске дисертације.

Чланови комисије:

др Гордана Шурлан Момировић, редовни професор у пензији, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду (ужа научна област генетика)

др Томислав Живановић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду (ужа научна област генетика)

др Јелена Ванчетовић, научни саветник, Институт за кукуруз „Земун Поље“ (ужа научна област оплемењивање биљака)

др Славен Продановић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду (ужа научна област оплемењивање биљака)

др Душан Станисављевић, научни сарадник, Институт за ратарство и повртарство Нови Сад (ужа научна област оплемењивање биљака)

Рад објављен SCI на листи:

1. Delić, N., **G. Stanković**, K. Konstantinov (2009): Use of non parametric statistics in estimation of genotypes stability. *Maydica* 54: 155-160.