

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ  
Милице Николић, мастер инж.

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>
1. Датум и орган који је именовao комисију 24. мај 2018. године, Наставно-научно веће Пољопривредног факултета
2. Састав комисије са знаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:  Др Ференц Баги, редовни професор, ужа н.о. Фитопатологија, 09.02.2017. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет – ментор  Др Вера Стојшин, редовни професор, ужа н.о. Фитопатологија, 09.12.2013. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет – члан  Др Славица Станковић, научни саветник, ужа н.о. Фитопатологија, 27.06.2012. Институт за кукуруз „Земун Поље“, Београд – члан
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>
1. Име, име једног родитеља, презиме: Милица (Веселин) Николић
2. Датум рођења, општина, држава: 10.10.1987, Савски венац, Београд, Република Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Пољопривредни факултет, Фитомедицина-фитопатологија, мастер инжењер пољопривреде
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2017. година, Агрономија
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука

### **III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

“*Aspergillus parasiticus* Spreare – токсигена врста гљиве на зрну кукуруза у производним условима Србије ”

### **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикана и сл.

Дисертација садржи 9 поглавља / 144 стране / 26 слика/ 20 табела/ 7 графикана/ 257 референци / захвалницу/ биографију).

Дисертација садржи поглавља: Увод, Преглед литературе, Циљ истраживања, Радна хипотеза, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак, Литература.

Последњих година, климатске промене погодиле су неуобичајено високом интензитету појаве патогених и токсигених врста рода *Aspergillus* у агроколошким условима у току вегетације кукуруза у Србији. Високе температуре, као и висока релативна влажност ваздуха су неопходне за појаву и интензивнији развој аспергилозе клипа кукуруза у пољским условима. Врста *A. parasiticus* први пут изолована је са зрна кукуруза у Србији у току вегетације, 2012. године.

У оквиру овог истраживања извршена су проучавања гљиве *A. parasiticus* у Србији. Истраживање је обухватило експерименте изведене како у пољским, тако и у лабораторијским условима, у периоду од 2013-2016. године. На терену је посматрана, евидентирана и оцењивана појава симптома аспергилозе на клипу кукуруза, и распрострањеност ове врсте у Србији. Приликом обилазака локалитета сакупљени су биљни узорци са симптомима болести, из којих је изолована и идентификована поменута врста гљиве. Потврђено је да је ова врста широко распрострањена на читавој територији државе, посебно у ратарским регионима.

Из прикупљених биљних узорака издвојено је 46 изолата пореклом из различитих локалитета, за даља истраживања. Проучавани изолати испољили су већу или мању дивергентност у погледу патогених, одгајивачких и морфолошких одлика и утврђено је да припадају врсти *A. parasiticus*. Токсиколошким анализама (ELISA, HPLC) утврђено је да испитивани изолати *A. parasiticus* синтетишу афлатоксине G групе, који су директно токсични за човека.

У овом истраживању први пут је примењена молекуларна метода у проучавању врсте *A. parasiticus* у Србији. Примењена је молекуларна техника: RFLP-PCR (коришћењем пара прајмера IGS-F/IGS-R). Молекуларна анализа омогућила је идентификацију и проучавање генетске структуре 46 изолата *A. parasiticus* пореклом са зрна кукуруза, из различитих локалитета.

### **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

**Увод.** Дат је кратак преглед статуса и проблематике гљиве *A. parasiticus* у Србији, са посебним освртом на ратарство чију производњу угрожава ова токсигена гљива.

**Преглед литературе.** Обухватио је преглед распрострањености и значаја *A. parasiticus* у свету и код нас, опис круга домаћина и симптома аспергилозе коју ова гљива проузрокује. Описане су патогене, морфолошке, одгајивачке, токсигене и молекуларне одлике *A. parasiticus*. Представљене су методе идентификације врсте *A. parasiticus* које се данас примењују у фитопатологији, од класичних до савремених, молекуларних метода. На овај начин, прегледом литературе презентована су објављена сазнања о врсти *A. parasiticus*, која

су коришћена приликом постављања циљева истраживања и тумачења резултата.

**Циљеви истраживања.** Јасно су дефинисани на основу проучене литературе и проблематике истраживања.

**Материјал и методе.** Описане су методе мониторинга испитиваних локалитета и здравствених прегледа кукуруза, у циљу утврђивања појаве, распрострањености и диверзитета врсте *A. parasiticus* у Србији. Дат је приказ метода коришћених у оцени штетности ове гљиве на кукурузу, како у лабораторијским тако и у пољским условима. Представљене су методе сакупљања узорака, изолације гљиве и провере патогености добијених изолата. Описане су методе коришћене у проучавању морфолошких и одгајивачких особина одабраних изолата. Посебан сегмент у овом поглављу обухватио је токсиколошке (ELISA, HPLC) и молекуларне (PCR-RFLP) методе, примењене у циљу проучавања антигених својстава и генетске структуре *A. parasiticus*.

**Резултати и дискусија.** Резултати су приказани јасно и концизно, одговарајућим редоследом према току истраживања и коришћеним методама. Прво су дати резултати о појави, распрострањености и диверзитету *A. parasiticus* по истраживаним локалитетима у Србији. Дата је оцена штетности на кукурузу, по годинама и локалитетима. Описани су симптоми болести на кукурузу. Приказани су резултати изолације ове токсигене врсте и њене патогене, морфолошке, одгајивачке одлике. Дати су резултати токсигених својстава проучаваних изолата који су добијени у анализама помоћу ELISA теста и HPLC методе. Представљени су резултати молекуларних анализа добијени применом молекуларних техника, PCR-RFLP методом.

У дискусији су утврђеним редоследом анализирани и коментарисани добијени резултати, који су упоређивани са објављеним литературним подацима.

**Закључак** је, у складу са резултатима истраживања, изведен јасно и концизно.

**Литература** даје јасан приказ коришћених литературних навода.

#### **VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01.јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

#### **RADOVI OBJAVLJENI U NAUČNIM ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA (SCI lista) :**

1. **Nikolić, M.,** Nikolić, A., Jauković, M., Savić, I., Petrović, T., Bagi, F., Stanković, S. (2018): Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates originated from wheat. *Genetika* 50 (1): 143-150.

#### **RADOVI OBJAVLJENI U ČASOPISIMA KOJI SE NALAZE U BAZI PODATAKA, A IMAJU REDOVNU MEĐUNARODNU DISTRIBUCIJU I REZIME NA STRANOM JEZIKU:**

2. **Nikolić, M.,** Stanković, S., Savić, I. (2017): Comparison of methods for determination of the toxigenic potential of *Aspergillus parasiticus* Speare and *Aspergillus flavus* Link isolated from maize. Presented on the 6<sup>th</sup> International Scientific Meeting: Mycology, Mycotoxicology and Mycoses, September 27-29, 2017, Novi Sad, Serbia, published in *Matica Srpska Journal for Natural Sciences* 133: 95-104.

#### **RADOVI OBJAVLJENI U DOMAĆIM ČASOPISIMA:**

3. **Nikolić, M.**, Savić, I., Stanković, S. (2016): Pathogenicity of *Aspergillus spp.* isolates originating from Serbia. *Ratarstvo i povrtarstvo* 53 (3), 101-105.

**RADOVI SAOPŠTENI NA MEĐUNARODNIM NAUČNIM SKUPOVIMA:**

4. Stanković S., Obradović A., **Nikolić M.**, Nikolić A., Krnjaja V., Ignjatovic-Micic D. (2017): Novel *Fusarium* and *Aspergillus* species on cereal kernels in Southeastern Europe. 1th Mycokey Conference, Septeber 11-14, 2017. Ghent, Belgium, Abstract, 209.
5. Stanković, S., Obradović, A., **Nikolić, M.**, Savić, I., Krnjaja, V., Delić, N., Stanković, G. (2018): Relationships between resistances to *Fusarium* and *Aspergillus* ear rots and mycotoxins contamination in maize kernels. 60th Annual Maize Genetics Conference, March 22-25, 2018. Saint-Malo, France, 185.
6. Nikolić, A., **Nikolić, M.**, Ignjatović-Mićić, D., Marković, K., Stanković, S. (2018): Identification of *A. flavus* and *A. parasiticus* in different crops using molecular genetic methods. 4th Congress of Croatian Geneticists with international participation, September 26-29, 2018, Krk, 57.

## VII ZAKЉUČCI ODNOSNO REZULTATI ISTRAŽIVANJA

- Na osnovu rezultata dobijenih istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:
- U toku četvorogodišnjih ispitivanja (2013-2016) identifikovana je, po prvi put u Srbiji, vrsta *A. parasiticus* kao prouzrokovalac aspergilozne truleži zrna i klipa kukuruza u polju i skladištima.
- Ispitivanjem makroskopskih morfoloških karakteristika izolata *A. parasiticus* ukazano je na mali biodiverzitet proučavanih izolata. Kolonije izolata na PDA podlozi formirale su obilnu tamnozelenu, gustu navlaku od micelije gljive, pamučastog izgleda.
- Svi izolati *A. parasiticus* obrazuju jednoćelijske, nazubljene konidije na MEA podlozi. Prečnik konidija ispitivanih izolata varirao je od 4,08µm (MRI 4197, MRI 4261, MRI 4266) do 6,86µm (MRI 3802, MRI 4254). Formiranje sklerocija zabeleženo je u miceliji kod 32 izolata, 14 dana posle zasejavanja na CZ podlozi.
- Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je statistički značajan uticaj interakcije ispitivanih izolata i svetlosnog režima ( $p < 0.01$ ) na dnevni porast prečnika kolonija. U svetlosnom režimu 12h svetlo/12h tama na PDA podlozi trećeg, petog i sedmog dana po inokulaciji najbrži porast imao je izolat MRI 3994. Najmanji porast trećeg i petog dana imao je izolat MRI 4256, a sedmog dana izolat MRI 3812 (40,88 mm). U svetlosnom režimu 24h mrak trećeg i petog dana po inokulaciji najbrži porast imao je izolat MRI 4265, a nakon sedam dana kod izolata MRI 4045 (73,50 mm). Trećeg i petog dana po inokulaciji najmanji porast zabeležen je kod izolata MRI 4257, a nakon sedam dana kod izolata MRI 4256 (41,25 mm).
- Različite temperature uticale su statistički značajno na porast kolonija ispitivanih izolata *A. parasiticus* ( $P < 0,01$ ). Najveći broj ispitivanih izolata ispoljio je najveći prosečan porast na temperaturi od 30°C, dok su pojedini izolati ispoljili nešto manji prosečan porast na temperaturama od 37°C i 25°C. Na temperaturama od 12°C i 43°C prestaje porast ispitivanih izolata.
- Svi ispitivani izolati *A. parasiticus* ispoljili su statistički značajnu razliku u brzini porasta kolonije na različitim hranljivim podlogama ( $P < 0,01$ ). Veliki broj (78,72%) izolata vrste *A. parasiticus* najbrže je rastao na PDA podlozi, na kojoj je prosečan porast nakon sedam dana bio u intervalu od 41,25±13,86 do 73,50±0,29 mm. Sporiji prosečan porast uočen je na CYA podlozi (36,5±1,32-69,25±0,48 mm). Najsporiji porast za sve ispitivane izolate je uočen je na MEA podlozi, i iznosio je od 40,63±0,47 do 62,25±0,32 mm.
- Test patogenosti ukazao je da su svi ispitivani izolati *A. parasiticus* patogeni na klipu kukuruza, jer su prouzrokovali simptome aspergiloze klipa, kao i da postoji divergentnost u ispoljavanju virulentnosti. Patogenost izolata je potvrđena reizolacijom i ponovnom identifikacijom, čime su zadovoljeni Kohovi postulati.
- Test patogenosti u laboratorijskim uslovima ukazao je da su svi ispitivani izolati prouzrokovali simptome na listu ječma. Uočena je velika varijabilnost u agresivnosti izolata.
- Ispitivanje potencijala sinteze mikotoksina, na osnovu rezultata Elisa testa, pokazalo je da su svi izolati *A. parasiticus* sintetisali aflatoksine. Izolati su, u najmanjem procentu (13%), sintetisali AFB1 u koncentracijama 1-10 µg/kg, a u najvećem (54%) u koncentracijama višim od 50 µg/kg. Izolati su, u najvećem procentu, sintetisali AFLA u

koncentracijama višim od 50 µg/kg. Samo kod izolata MRI 4267 detektovana je koncentracija AFLA u najmanjem procentu (1-10 µg/kg).

- Poređenjem koncentracija mikotoksina kod izolata dobijenih Elisa testom, pokazali su da postoji statistički visoko značajna korelacija između potencijala produkcije AFB1 i AFLA kod ispitivanih izolata ( $r=0,66^{**}$ ).
- Ispitivanje potencijala sinteze mikotoksina, na osnovu rezultata HPLC metode, pokazalo je da je najveće koncentracije AFB1 sintetisao izolat MRI 4194 (7361,03 µg/kg), dok je najmanje koncentracije MRI 3808 (14,24 µg/kg). Najveće koncentracije AFG1 stvorili su izolati MRI 4198 (7421,58 µg/kg), MRI 4195 (7191,62 µg/kg), MRI 4197 (7122,59 µg/kg). Najmanje koncentracije ovog mikotoksina sintetisali su izolati MRI 3808 (3,27 µg/kg). Kod izolata MRI 4194, MRI 4252 i MRI 4265 nije došlo do sinteze AFG2, dok izolati MRI 3808 i MRI 4275 nisu bili sposobni za sintezu AFB2 i AFG2.
- Ispitivani izolati *A.parasiticus* koji su sintetisali aflatoksine (50%) su u najvećem procentu sintetisali AFB1 (84,78%), dok je broj izolata koji su sintetisali AFG1 bila znatno manja (15,22%). Međutim, utvrđeno je osam izolata koji su sintetisali AFG1 u višim koncentracijama, u odnosu na AFB1. Poređenjem koncentracija mikotoksina kod izolata *A. parasiticus*, na osnovu rezultata HPLC metode, uočeno je da postoji visoko statistički značajna korelacija između sintetisanih koncentracija AFB1 i AFG1 ( $r=0,82^{**}$ ), kao i između AFB2 i AFG2 ( $r=0,63^{**}$ ).
- Veliki procenat (50%) ispitivanih izolata nije sintetisalo aflatoksine B1, B2, G1 i G2 ili jeste u veoma niskim koncentracijama uz nemogućnost određivanja njihovih vrednosti.
- Ehrlich-ov test na filter papiru je pokazao da svi ispitivani izolati *A. parasiticus* daju negativnu reakciju. Izostala je pojava žutog prstena, što ukazuje da ovi izolati ne stvaraju ciklopiazoničnu kiselinu.
- Multiplex PCR detekcijom potvrđen je identitet svih izolata prethodno okarakterisanih na osnovu morfoloških, ekoloških, odgajivačkih i toksigenih karakteristika kao vrsta *A. parasiticus*. Primenom RFLP-PCR metode korišćenjem restrikcioni enzima, omogućeno je razlikovanje vrste *A. parasiticus* od morfološki slične vrste *A. flavus*, što je ujedno i prva identifikacija ove patogene vrste na molekularnom nivou u Srbiji.
- Obzirom da su utvrđeni izolati *A. parasiticus* koji ne sintetišu aflatoksine, treba razmotriti mogućnost proučavanja atoksigenih izolata, i njihovu primenu u svojstvu bioloških agenasa u zaštiti bilja
- Morfološka, patogena, ekološka, odgajivačka, toksigena i molekularna karakterizacija izolata *A. parasiticus* poreklom sa zrna kukuruza, pružila je uvid u prisustvo, rasprostranjenost i biodiverzitet ove vrste u Srbiji.

#### **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Резултати су приказани јасно и прегледно, табелама, графиконима и сликама, а тумачење резултата у складу је са научним принципима, те комисија даје позитивну оцену приказа и тумачења резултата истраживања.

#### **IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и

концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе.

Дисертација садржи све битне елементе научног рада, од приказа владајућих ставова у литератури о фитопатогеној и токсигеној гљиви која је предмет истраживања, преко примењених метода рада, до резултата са дискусијом и закључком.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци.

С обзиром да у Србији нема довољно података о врсти *A. parasiticus*, ова дисертација представља оригиналан допринос познавању распрострањености, биодиверзитета и значаја врсте *A. parasiticus* на овом подручју. Имајући у виду да се ради о узročнику једне од веома деструктивних болести на кукурузу, која у повољним условима за настанак инфекције смањује принос и до 50%, погоршава квалитет кукуруза и на тај начин доводи до озбиљних губитака у производњи, резултати ових истраживања послужиће бољем познавању ове фитопатогене врсте гљиве.

Значај врсте *A. parasiticus* поред нарушавања квалитета зрна кукуруза, огледа се и у томе што она синтетише токсичне супстанце – афлатоксине, који са аспекта утицаја на здравље људи и животиња представљају једну од најзначајнијих група микотоксина. У фокусу истраживања је оцена интензитета заразе клипа кукуруза. Истовремено испитивање садржаја афлатоксина G групе, који су директно токсични за човека и укупних афлатоксина које синтетише ова врста гљиве, наглашава свеобухватни утицај врсте *A. parasiticus* на компоненте приноса и здравствену безбедност кукуруза.

Резултати ових истраживања могу дати основу за даља истраживања са циљем њихове примене у производњи, доради и складиштењу зрна и семена житарица, као и у технолошким процесима у производњи хране за људе и животиње.

Резултати ових истраживања могу наћи широку примену у производњи здравствено безбедне хране и сточне хране, затим у програму оплемењивања генотипова кукуруза на толерантност према токсигеним врстама рода *Aspergillus*. Испитивањем токсигених, патогених и генетичких карактеристика изолата *A. parasiticus* добијени су резултати који могу бити од великог значаја за селекционере, узгајиваче житарица, складиштаре, као и произвођаче хране. Први пут примењене и модификоване методе могу допринети брзој, ефикасној, економски оправданој и поузданој идентификацији врста рода *Aspergillus*, као и у идентификацији њихове способности синтезе микотоксина.

Добијени резултати могу допринети изналажењу поступака на основу којих би се на економски рационалан и оправдан начин, редуковала контаминација зрна жита микотоксинима. Истраживања у оквиру ове докторске дисертације имају развојно примењен значај и могу се применити за развој микологије, оплемењивање биља, органску производњу, исхрану животиња и др.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања  
Недостаци нису уочени.

**X ПРЕДЛОГ:**

**На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже да се докторска дисертација Милице Николић, мастер инж., под називом “*Aspergillus parasiticus* Spreare – токсигена врста гљиве на зрну кукуруза у производним условима Србије”, прихвати, а кандидату одобри одбрана.**

НАВЕСТИ ИМЕ И ЗВАЊЕ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ  
ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Др Ференц Баги, редовни професор  
Пољопривредни факултет, Нови Сад - ментор

Др Вера Стојшин, редовни професор  
Пољопривредни факултет, Нови Сад - члан

Др Славица Станковић, научни саветник  
Институт за кукуруз „Земун Поље“, Београд - члан

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.