

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

**ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ КАНДИДАТА
МАРИНЕ ТОМИЧИЋ**

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
1. Датум и орган који је именовao комисију 28.05.2015. Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду
2. Састав комисије са назнаком 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 Михајла Ђан, ванредни професор, Генетика; 17.07.2013., Природно-математички факултет, Нови Сад, председник - др Драгана Обрехт Видаковић, ванредни професор, Генетика, 17.11.2010., Природно-математички факултет, Нови Сад, ментор - др Вук Ђорђевић, научни сарадник, Генетика и оплемењивање биљака, 02.11.2011., Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад, ментор - др Јелена Пураћ, доцент, Молекуларна биологија, 01.07.2010., Природно-математички факултет, Нови Сад, члан - др Јегор Миладиновић, научни саветник, Генетика и оплемењивање биљака, 21.11.2007., Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад, члан
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
1. Име, име једног родитеља, презиме: Марина (Радивој) Томичић
2. Датум рођења, општина, држава: 08.11.1986., Рума, Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Природно-математички факултет Универзитет у Новом Саду, Мастер академске студије биологије; модул: молекуларна биологија, Мастер биолог
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2010., Доктор наука – биолошке науке
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:-
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
Ефекти оплемењивања на генетичку диференцијацију и варијабилност генома у елитној гермплазми соје (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.)

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графика и сл.

Докторска дисертација „Ефекти оплемењивања на генетичку диференцијацију и варијабилност генома у елитној гермплазми соје (*Glycine max* (L.) Merr.)“ кандидата Марине Томичић написана је на 129 страна текста, подељеног у 9 поглавља (увод – 2 стране, преглед литературе – 17 страна, циљ истраживања – 2 стране, радна хипотеза – 1 страна, материјал и методе – 17 страна, резултати – 50 страна, дискусија – 25 страна, заључак – 3 стране, литература – 12 страна). Рад садржи 27 слика, 16 табела, 209 литературних навода и 1 прилог. На почетку докторске дисертације налази се неопходна кључна документација на српском и енглеском језику, Садржај, Листа илустрација, Листа табела, Захвалница и Листа скраћеница кориштених у тексту. На крају се налази биографија кандидата.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У поглављу **УВОД** кандидат сажето износи основне карактеристике врсте *Glycine max*, објекта истраживања, осврћући се на ботаничку класификацију, структуру генома, физиолошке карактеристике, као и на значај соје као ратарске културе у свету и нашој земљи.

Поглавље **ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ** садржи неколико подпоглавља са прегледом најновијих сазнања у вези са применом резултата генетичких истраживања у оплемењивању соје. Прво подпоглавље бави се историјским аспектима доместификације соје и правцима формирања гермплазме која је корићена у програмима оплемењивања у центрима на територији азијских земаља, САД и Европе. Кандидат посебну пажњу посвећује разматрању литературе која се бави ефектима вештачке селекције која се базира на стварање елитних генотипова и последицама програма хибридизација „*elite by elite*“ на диверзитет гермплазме. У другом подпоглављу приказан је преглед различитих стратегија примене молекуларних маркера у оплемењивању соје, као и различити приступи мапирања региона генома који учествују у контроли развоја важних агрономских својстава. Кандидат је обрадио литературу која се бави предностима и недостацима бипаренталног и асоцијативног мапирања, а посебно је детаљно описан приступ „*hitchhiking*“ мапирања. Обзиром да је у научној јавности развијено неколико различитих популационо-генетичких приступа за детерминацију локуса на које је деловала селекција током оплемењивања, у раду је сваки приступ детаљно коментарисан, а касније у експерименталном делу рада и примењен.

Са агрономског и комерцијалног аспекта најважнија својства соје су детерминисана полигенима чија се експресија налази под утицајем срединских фактора. Познавање локације и варијабилности региона генома у елитној гермплазми, који су модификовани у процесу оплемењивања на начин да су специфично прилагођени условима узгоја на просторима централне и источне Европе, је важна и вишеструко корисна информација за оплемењиваче. У складу са тим кандидат је поставио следеће **ЦИЉЕВЕ ИСТРАЖИВАЊА:**

- анализом педигреа елитних генотипова утврдити родитељски допринос свих предачких сорти и на основу резултата анализа одабрати генотипове предачке популације;
- анализом полиморфности микросателитских локуса одредити ниво генетичког диверзитета у елитној и предачкој популацији соје и одредити генетичку структуру и степен диференцијације испитиваних популација;
- идентификација микросателитских локуса, односно региона генома соје на које је деловала селекција током оплемењивања у агроклиматским условима централне и источне Европе, користећи више различитих статистичких метода за детекцију феномена генетичког стопирања (“*hitchhiking*” мапирање);

- валидација добијених резултата, анализом генетичког диверзитета и диференцијације елитне и предачке популације соје на основу различитих група локуса, селективно позитивних и неутралних, тестирањем проласка популација кроз генетичко уско грло, као и утврђивањем нивоа гаметског дисеквилибријума у анализираним популацијама соје;
- *In silico* анализа геномских региона који су се налазили у селективној предности, претрагом база података и биоинформатичким анализама, како би се, као крајњи циљ, обавила идентификација локуса за квантитативне особине или мајор гена који детерминишу својства на које је деловала селекција током оплемењивања соје у централној и источној Европи, те имају практичан значај у специфичним агроклиматским условима овог региона.

На основу прегледа литературе кандидат је дефинисао следеће одреднице **РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ**:

- одабрани микросателитски локуси испољавају адекватан ниво полиморфности те су применљиви молекуларни маркери за анализу генетичког диверзитета и испитивање популационе диференцијације, а осим тога, услед блиске везаности са генима соје, на основу ових молекуларних маркера се могу пратити и гени фаворизовани током селекције;
- елитне сорте соје имају уску генетичку основу, узроковану малим бројем оснивачких, предачких генотипова и укрштањем "*elite by elite*", а као последица дугогодишњег и интензивног оплемењивања, елитна популација соје има мањи генетички диверзитет у односу на предачку популацију;
- постоји генетичка структурираност предачке и елитне популације соје, као и одређени степен међу-популационе диференцијације;
- у елитној популацији соје је током оплемењивања деловала јака селекција која је довела до промена у појединим регионима генома, а које се огледају у значајном смањењу генетичког диверзитета и високом степену међу-популационе диференцијације;
- приликом детекције локуса на које је деловала селекција може се уочити одређени удео лажно позитивних резултата који се могу тестирати применом различитим статистичких модела;
- након деловања селекције долази до повећања стопе гаметског дисеквилибријума;
- елитна популација соје није прошла кроз генетичко уско грло;
- локуси на које је деловала селекција током оплемењивања детерминишу агрономски значајна својства која имају улогу у адаптацији елитних сорти соје на агроклиматске услове централне и источне Европе.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** садржи детаљан опис методе која је послужила за одабир материјала који је испитиван са информацијама о типу ткива које је послужило као извор за изолацију и проверу квалитета ДНК. У овом поглављу налази се и подпоглавље које се бави детаљним прегледом кориштених лабораторијских метода за анализе полиморфности 68 микросателитских локуса са опсежним описом који омогућава да на основу процедура наведених у овој докторској дисертацији слични експерименти могу бити лако спроведени. У подпоглављу које се бави методама статистичке обраде података кандидат је навео разлог због кога су поједини програми одабрани, опширан опис кориштених статистичких пакета из области популационе генетике, као и детаље анализа и образложења за дефинисање појединих параметара у статистичким пакетима.

РЕЗУЛТАТИ рада су изложени у шестом поглављу, а текстуални приказ је илустрован са 27 слика и 16 табела. У првом делу су систематично и јасно приказани резултати анализе предачке и елитне популације соје на основу варијабилности 68 микросателитских локуса. Сви добијени параметри генетичког диверзитета су адекватно приказани. Други део у поглављу РЕЗУЛТАТИ чине подаци о генетичкој структури популација соје, са јасним графичким приказом издвајања две популације. У трећем делу поглавља РЕЗУЛТАТИ сагледана је генетичка диференцијација популација соје применом различитих приступа: на основу F_{st} параметара, анализе молекуларне варијансе и анализе

главних координата. Подаци добијени применом различитих статистичких анализа су адекватно табеларно или графички приказани што олакшава праћење разлика и специфичности примењених тестова. У наредном делу приказани су резултати идентификације локуса на које је деловала селекција, применом различитих тестова и модела, и на јасан начин изнети комплексни резултати свих примењених анализа, са посебним освртом на интеграцију свих добијених резултата. У оквиру истог подпоглавља, издвојени су резултати детекције популационих разлика у генетичком диверзитету и диференцијацији на основу различитих група локуса. У петом и шестом делу поглавља РЕЗУЛТАТИ приказани су израчунати параметри детекције генетичког сигнала уског грла и гаметског дисеквилибријума. У последњем делу поглавља РЕЗУЛТАТИ кандидат пореди геномске локације микросателита који су идентификовани као селективно значајни, са положајем претходно мапираних локуса за квантитативне особине код соје, у циљу карактеризације селективно значајних кандидат локуса. Сви резултати су адекватно обрађени и јасно графички приказани.

У делу **ДИСКУСИЈА**, кандидат је дао свеобухватну интерпретацију добијених резултата и њихову критичку анализу. Поглавље дискусија је организовано у три подпоглавља, у оквиру којих је интегрисана дискусија резултата о: генетичкој варијабилности, структури и диференцијацији популација соје; карактеризацији локуса на које је деловала селекција и интерпретацији селективно значајних кандидат локуса. Кандидат критички и објективно сагледава добијену генетичку структурираност популација соје која се није у потпуности подударала са поделом анализираних генотипова на основу педигреа. Јасно је истакнута и образложена ерозија генетичког диверзитета у елитној популацији соје у односу на предачку популацију, на основу свих анализираних популационо-генетичких параметара. Кандидат на основу својих резултата и коришћењем савремене литературе евалуира значај и могућност примене „*hitchhiking*” мапирања, и истиче да коришћењем најмање две анализе, се потврђује девет селективно значајних микросателитских локуса у истраживању, што потврђује хипотезу да селекција делује на ограничен број локуса широм генома. Добијене резултате о генетичкој варијабилности, структури и диференцијацији популација соје, кандидат пореди са претходно објављеним студијама других популација. Сагледавањем свих резултата кандидат закључује да резултати ове дисертације имају значај за допуну знања о генетичкој колекцији соје која чини гермплазму у програмима оплемењивања у Институту за ратарство и повртарство у Новом Саду и да би се добијени резултати потенцијално могли искористити за олакшано увођење пожељних алела приликом стварања нових елитних сорти, тј. допринети развоју молекуларног оплемењивања и маркер-асистираних селекције.

У оквиру поглавља **ЗАКЉУЧАК**, на основу добијених резултата наведени су закључци који су правилно изведени и јасно и разумљиво формулисани у складу са постављеним циљевима докторске дисертације.

Девето поглавље представља **списак литературе**. Укупно је цитирано 209 литературних јединица, које обухватају библиографске податке везане за биологију врсте *Glycine max*, популационо-генетичка истраживања ове и сличних ратарских култура, као и радове који се баве како геномиком тако и оплемењивањем соје. Највећи број литературних навода подразумева радове објављене у току последњих десет година у врхунским међународним часописима.

У опширном **Прилогу** ове докторске дисертације налазе се табеле са различитим типовима података који су генерисани током експерименталног рада. Приложена је табела са подацима о уделу појединих генотипова предачке популације у педигреу елитних сорти соје. Наведени су детаљни подаци о секвенци олигонуклеотида који су кориштени за амплификацију микросателитских локуса. У приложеним табелама налазе се и подаци о фреквенцији алела анализираних микросателитских локуса, вредности РС₀А анализе, резултати добијени применом различитих демографских модела миграција, резултати

анализа генетичког уског грла, вредности параметара гаметског дисеквилибријума за везане локусе у анализираним популацијама, као и извод QTL из SoyBase (2015) са детаљним информацијама о позицији идентификованих региона кандидата са графичким приказом геномске локације селективно значајних региона и мапирајућих интервала познатих QTL-ова соје, на основу генетичке мапе “Composite 2003”.

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.

M21 (рад у врхунском међународном часопису)

1. **Tomicic M.**, Djordjevic B., Obreht D., Miladinovic J., Brbaklic Lj., Mikic A., Mikic S. (2015) Tracking footprints of selection associated with soybean adaptation to Central-East Europe environments. *Euphytica*, 203: 701-713.

M34 (саопштење са међународног скупа штампано у изводу)

1. Đorđević, V., **Tomičić, M.**, Obreht, D., Brbaklić, Lj., Miladinović, J., Mikić, A., Mikić S. (2014): Genetic hitchhiking mapping in soybean II. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, 28th September – 2nd October, pp 346.
2. Đorđević, V., **Tomičić, M.**, Vidić, M., Miladinović, J., Mikić, A. (2013): Learning from past: Implication of neutral variability changes during soybean breeding on further breeding process. First Legume Society Conference, Novi Sad, Serbia, 9-11 May, p. 81.
3. **Tomičić M.**, Đorđević V., Obreht D., Brbaklić Lj., Miladinović J., Mikić A., Mikić S. (2014) Genetic hitchhiking mapping in soybean I. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, 28th September - 2nd October, pp 345.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Истраживање ефеката оплемењивања соје на генетичку диференцијацију и варијабилност генома у елитној гермплазми спроведено је квантификовањем генетичког диверзитета у појединачним популацијама соје и анализа популационо-генетичке диференцијације на основу испитивања 68 микросателитских локуса. Током истраживања су потврђене све радне хипотезе и испуњени сви постављени циљеви који су довели до следећих закључака:

1. Елитне сорте соје које се гаје на подручју централне и источне Европе имају уску генетичку основу, условљено чињеницом да је само пет предачких генотипова (Mandarin, Capital, Richland, Strain No. 18 i Mukden), који воде порекло са простора Северне Америке, обухватало 50% педигреа елитне популације.
2. Одабрани микросателитски локуси су применљиви молекуларни маркери за анализе генетичког диверзитета и диференцијације популација соје, који су без обзира на блиску сродност популација испољили адекватан ниво полиморфности, што је омогућило поређење предачких и елитних генотипова соје. Утврђено је смањење генетичког диверзитета елитних сорти које се гаје на подручју централне и источне Европе у односу на предачку популацију, настало као последица дугогодишњег оплемењивања. Сви

анализирани популационо-генетички параметри имали су статистички значајно веће средње вредности у предачкој у односу на елитну популацију.

3. Испитивани генотипови соје су структурирани у два генетичка кластера, што се није у потпуности подударало са поделом генотипова на основу педигра. Наиме, генетичка структура популација је осликавала историју оплемењивања соје, тако да су добијени резултати узроковани позитивном корелацијом између родитељског доприноса предачких генотипова елитној популацији и коефицијента припадности генетичком кластеру. Ни анализа главних координата, PCoA није омогућила јасно груписање анализираних генотипова. Уочена преклапања између узорака условљавају низак ниво међупопулационе генетичке диференцијације, на шта је указала ниска просечна вредност индекса фиксације *Fst* (0,058) као и анализа молекуларне варијансе, која указује да варирање између популација износи 9%, док се највећи удео укупне генетичке варијабилности уочава унутар испитиваних популација.

4. Применом „*hitchhiking*” мапирања и коришћењем четири различита приступа, емпиријских као и приступа који се заснивају на коришћењу демографских модела, детектовано је девет микросателитских локуса на које је деловала селекција током оплемењивања соје у агроклиматским условима централне и источне Европе. Ефекти селекције су, у зависности од примењене методе, уочени на различитом броју SSR локуса у геному соје, од 5,9% до 17,6%, при чему одређени удео локуса представљају лажно позитивне резултате. Значајна акумулација пожељних алела у елитној популацији у односу на предачку је осим утицаја модерног оплемењивања, потврдила поузданост „*hitchhiking*“ мапирања за идентификацију селективно значајних локуса и алела.

5. E1 ген који се налази у близини маркера Satt557 и има кључну улогу у регулисању времена цветања и сазревања код соје, или регион у околини овог гена, има значајан утицај на адаптацију испитиваних елитних генотипова соје на агроклиматске услове подручја централне и источне Европе.

6. Као резултат деловања селекције и адаптација соје на агроклиматске услове централне и источне Европе, у елитној популацији је константовано значајно повећање гаметског дисеквилибријума у односу на предачку популацију, узроковано оснивачким ефектом приликом настајања високоприносних линија. Деловање позитивне селекције на идентификоване микросателитске локусе потврђено је значајним смањењем генетичког диверзитета селективно значајних локуса у поређењу са неутралним локусима у елитној популацији, што није био случај у предачкој популацији. Осим тога, анализа молекуларне варијансе и *Fst* вредност селективно значајних локуса су указале на висок степен диференцијације између популација, док су неутрални локуси показали тек незнатну популациону диференцијацију.

7. Елитна популација соје није прошла кроз генетичко уско грло, те смањење генетичког диверзитета идентификованих селективно значајних локуса није настало услед неког од демографских ефеката, него као резултат деловања селекције.

8. *In silico* анализом, у селективно значајним геномским региона је идентификовано укупно 264 QTL-ова, чије категорије представљају најбољу потврду деловања селекције. Најзаступљенији су били локуси који су детерминисали својства у вези са репродуктивним развојем биљке. Остали QTL-ови су утицали на особине које су важне приликом стварања униформних сорти, што представљају својства на основу којих се уобичајено обавља селекција биљака током оплемењивања. Значајан број локуса је имао директан утицај на принос, компоненте приноса, као и садржај функционалних и резервних компоненти семена соје. Овим се стекао увид да је током настанка елитне популације деловање селекције највећим делом било усмерено ка стварању сорти које су адаптабилне на агроклиматске услове гајења, у централној и источној Европи са високим и стабилним приносом. Осим тога, утврђено је да се у девет селективно значајних региона налазило укупно 111 потенцијалних гена на које је деловала селекција, чији је највећи број

продуката учествовао у регулацији транскрипције, везујући се за специфичне ДНК секвенце. Једнако бројни су били и гени који су учествовали у процесима транспорта, унутар ћелије, као и између ћелије и спољашње средине.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

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

Кандидат је веома рационално приступио приказу, обради и анализи великог броја резултата које је успешно систематизовао у логичке целине. Резултати истраживања су прегледно и аналитички представљени, статистички адекватно обрађени, детаљно продискутовани, објективно и критички упоређивани са резултатима других аутора. Прегледности резултата значајно доприносе многобројни графикони и табеле. На основу детаљне дискусије изведени су закључци који дају одговоре на постављене циљеве докторске дисертације.

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

Комисија оцењује да је докторска дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Дисертација садржи све битне елементе као што су: дефинисање теме, циљева и значаја истраживања, преглед постојећих истраживања, јасно дефинисане радне хипотезе, приказ методологије рада, јасан и систематичан приказ резултата и њихову адекватну дискусију. Закључци су правилно изведени на основу добијених резултата. У списку литературе налазе се све литературне јединице које су цитиране у тексту дисертације.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Комисија сматра да ова докторска дисертација представља оригиналан научни допринос јачању мултидисциплинарног приступа у области примене класичне популационе генетике у оплемењивању биљака. Посебан акценат Комисија ставља на резултате који су омогућили детаљну карактеризацију варијабилности генетичке колекције соје која чини гермплазму у пројектима оплемењивања и сагледавање последица вештачке селекције на богатство генског фонда. Резултати ове докторске дисертације имају и практичан значај на пољу развоја молекуларног оплемењивања, тренутно најперспективнијем начину селекције, и стварању високоприносних сорти соје специфично прилагођених агроеколошким условима централне и источне Европе.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Комисија је мишљења да ова докторска дисертација нема недостатака, постављени циљеви су испуњени.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

Комисија предлаже да се докторска дисертација под насловом „**Ефекти оплемењивања на генетичку диференцијацију и варијабилност генома у елитној гермплазми соје (*Glycine max* (L.) Merr.)**“ прихвати и да се кандидату **Марини Томичић** одобри одбрана.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Проф. др Михајла Ђан, председник
Природно-математички факултет, Нови Сад

Проф. др Драгана Обрехт Видаковић, ментор
Природно-математички факултет, Нови Сад

др Вук Ђорђевић, научни сарадник, ментор
Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад

др Јелена Пураћ, доцент, члан
Природно-математички факултет, Нови Сад

др Јегор Миладиновић, научни саветник, члан
Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад