

Биолошки факултет
Број захтева: 33/142-1
Датум: 12.6.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Љиљана С. Брбаклић**

студент докторских студија на студијском програму Молекуларна биологија, Молекуларна биологија еукариота.

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Молекуларна и асоцијативна анализа својстава класа пшенице (*Triticum aestivum* L.)“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 27.02.2014. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-753/3-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Молекуларна и асоцијативна анализа својстава класа пшенице (*Triticum aestivum* L.)“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 17.04.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/76-17.04.2015. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Светлана Радовић	редовни професор	биохемија и молекуларна биологија	Универзитет у Београду- Биолошки факултет
2.	др Анкица Кондић- Шпика	научни саветник	генетика и оплемењивање	Институт за ратарство и повртарство - Нови Сад
3.	др Весна Максимовић	научни саветник	молекуларна биологија	Универзитет у Београду – Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 12. јуна 2015. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

- Прилог:**
1. Реферат комисије са предлогом.
 2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата
 3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.
 4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/142-12.6.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на VIII редовној седници одржаној 12.6.2015. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Љиљане Брбаклић, под називом:

„Молекуларна и асоцијативна анализа својстава класа пшенице (*Triticum aestivum* L.)“.

Универзитет је дана 27.02.2014. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-753/3-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Brbaklić, Lj., Trkulja, D., Kondić-Špika, A., Hristov, N., Denčić, S., Mikić, S., Tomičić, M., Kobiljski, B. (2015): Genetic associations in the detection of QTLs for wheat spike-related traits. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.50(2): 149-159. DOI: 10.1590/S0100-204X2015000200007. **M22**

Brbaklić, Lj., Trkulja, D., Kondić-Špika, A., Mikić, S., Tomičić, M., Kobiljski, B. (2015): Determination of population structure of wheat core collection for association mapping. Cereal Research Communications. 43(1): 22-28. DOI: 10.1556/CRC.2014.0027. **M23**

Декан Биолошког факултета

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 17.04.2015. године, прихваћен је извештај ментора др Анкице Кондић-Шпика и др Светлане Радовић о урађеној докторској дисертацији Љиљане С. Брбаклић, истраживача сарадника у Институту за ратарство и повртарство у Новом Саду под насловом „Молекуларна и асоцијативна анализа својстава класа пшенице (*Triticum aestivum* L.)“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Светлана Радовић, редовни професор Универзитета у Београду - Биолошки факултет - ментор, др Анкица Кондић-Шпика, научни саветник Института за ратарство и повртарство у Новом Саду - ментор и др Весна Максимовић, научни саветник Универзитета у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Љиљане С. Брбаклић под насловом "Молекуларна и асоцијативна анализа својстава класа пшенице (*Triticum aestivum* L.)" урађена је у Одељењу за биотехнологију у Институту за ратарство и повртарство у Новом Саду као део пројекта под називом "Савремено оплемењивање за садашње и будуће потребе" под бројем TR31066 финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Докторска дисертација Љиљане С. Брбаклић је написана на 138 страна. Уводних страна (Насловна страна на српском и енглеском језику, Страна са информацијама о менторима и члановима комисије, Захвалница, Резиме на српском и енглеском језику, Скраћенице и Садржај) има 14 страна. Дисертација се састоји из следећих поглавља: **Увод** (22 стране), **Циљ рада** (1 страна), **Материјал и методе** (13 страна), **Резултати** (34 стране), **Дискусија** (23 стране), **Закључци** (2 стране), **Литература** (25 страна са 215 референци), и **Прилози** (10 страна) Дисертација садржи 12 слика (2 у поглављу Увод и 10

у поглављу Резултати), 24 табеле (2 у поглављу Материјал и методе и 22 у поглављу Резултати). На крају дисертације су приложена следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна).

Анализа докторске дисертације:

Ова докторска дисертација припада области молекуларног оплемењивања биљака и бави се проблемом увођења савремених метода из области молекуларне биологије и генетике у конвенционалне оплемењивачке програме пшенице.

Пшеница (*Triticum aestivum* L.) представља једну од најважнијих житарица која је широко заступљена у производњи у свету и са укупном производњом зрна се налази на трећем месту, иза кукуруза и пиринча. Захваљујући значају ове биљне врсте, посебно у људској исхрани, један од најважнијих аспеката у оплемењивању пшенице јесте побољшање постојећих сорти као и добијање нових генотипова повећаног генетичког потенцијала за принос. Развој и примена савремених метода из области молекуларних маркера, имплементирана са класичним начинима оплемењивања, пружа нове могућности у примени маркер-асистираних селекција током процеса оплемењивања.

Хлебна пшеница је алохексаплоидна врста са изузетно сложеним геномом кога чине три генома различитог порекла (ААББДД) и сваки садржи по седам парова хромозома ($2n=6x=42$). С обзиром на комплексност генома, велики изазов представља имплементација најновијих молекуларних и генетичких метода и техника како би се идентификовали хромозомски региони и гени одговорни за експресију жељеног фенотипа. Уношење ових генских региона у постојеће сорте је од великог интереса за побољшање и унапређење производних карактеристика ове житарице. Од првобитног открића пре 30-ак година до данас развој молекуларних маркера је омогућио њихову широку примену у бројним истраживањима, пре свега за утврђивање генетичке варијабилности, формирање генетичких профила тзв. фингерпринтинг, процену генетичке удаљености између популација и оплемењивачког материјала, откривање моногенских и локуса за квантитативна својства (QTL – quantitative trait loci). Најважније агрономске и еволутивно важне особине налазе се под контролом већег броја гена, односно локуса за квантитативна својства. Тако су и особине класа, које представљају најважније компоненте приноса, као и адаптивне особине квантитативна својства која се налазе под већим утицајем фактора спољашње средине.

У последње две деценије откривање и анализа локуса за квантитативна својства код пшенице углавном је вршена применом линкиџ тј. QTL анализа, које захтевају стварање специјално дизајнираних мапирајућих популација, које настају укрштањем два родитеља који се у великој мери разликују у особини од интереса, као што је нпр. толерантни и нетолерантни генотип у погледу лисне рђе, пепелнице итд. Међутим, најновији и најефикаснији приступ у детекцији везе између молекуларних маркера и одабраног својства остварује се путем асоцијативног мапирања којим се постиже ефикаснија примена маркер - асистираних селекције у оплемењивању пшенице. Пионирска асоцијативна истраживања су успешно спроведена у људској популацији ради идентификације локуса за комплексне болести, чиме је отворен пут за примену истог модела на различитим биљним врстама, првобитно урађена на кукурузу. Основна предност асоцијативног мапирања у односу на класично QTL мапирање је директан рад на оплемењивачком материјалу, што значајно скраћује време неопходно за стварање експерименталних популација, као што су двоструки хаплоиди, блиско изогене линије, линије из Ф2 популације итд. Такође у оваквом материјалу се открива знатно већи број алелних варијанти и постиже боља моћ резолуције при мапирању, што олакшава примену маркер-асистираних селекције. Асоцијативна истраживања су послужила за откривање бројних веза маркер-својство, па самим тим и хромозомских региона одговорних за читав низ агрономски значајних својстава, као што су: различити параметри квалитета, величина и облик семена, отпорност на различите болести пшенице, дормантност и дуговечност семена, најважније компоненте приноса и принос *per se*.

У том смислу, циљеви ове дисертације су били да се утврди генетичка варијабилност применом микросателитских маркера као најчешће коришћених и информативних молекуларних маркера у истраживањима на овој биљној култури. Потом је као најважнији предуслов асоцијативне анализе било неопходно проценити генетичку структуру испитиване популације базиране на молекуларним подацима. Поред молекуларних, анализирана су и својства класа, као најважнијих компоненти приноса, и адаптабилна својства у току пет вегетационих сезона. С обзиром на то да се асоцијативна анализа заснива на неравнотежи везаности (*LD-linkage disequilibrium*), испитиван је *LD* маркера између различитих хромозома. Посебан акценат ове докторске дисертације дат је на анализу везе између микросателитских локуса и одабраних особина у свим испитиваним годинама применом асоцијативног мапирања. На тај начин су идентификовани значајни и стабилни локуси одговорни за експресију карактеристика класа и адаптивних својстава и утврђени су пожељни алели у оквиру ових локуса који

имају највећи утицај на фенотипску варијабилност појединачних особина. Све то је послужило за одабир генотипова који су носиоци пожељних алела за поједине карактеристике класа, а који би могли да послуже као родитељи у наредним укрштањима, ради побољшања постојећих или стварања нових генотипова са одређеним карактеристикама класа.

У дисертацији је коришћено 283 генотипа пшенице који су репрезентативни део Генетичке колекције Одељења за стрна жита. Генотипови су током вишедеценијске фенотипске евалуације у пољским условима показали значајну варијабилност у морфологији класа и другим агрономски значајним особинама. Одабир генотипова је подразумевао и различито географско порекло, па су се тако у истраживању нашли генотипови створени у различитим оплемењивачким институцијама, пореклом са свих пет континената, обухватајући чак 24 земље. Пољски огледи су изведени на локалитету огледних поља Римски шанчеви Института за ратарство и повртарство у току пет вегетационих сезона: 1994/95., 1995/96., 1996/97., 1997/98., 1998/99. Експерименти су постављени по случајном блок систему, на парцелама величине од 1,2 m² сејаним у 6 редова, са размаком од 20 cm, уз примену стандардне агротехнике. Током раста и развића бележено је осам својстава класа и то: број класића по класу, број стерилних класића по класу, број зрна по класу, дужина класа, дужина вршне интернодије, маса класа, маса зрна по класу, индекс класа и два адаптивна својства: време класања и време цветања. Све особине су мерене и бележене током свих пет сезона, осим дужине вршне интернодије која је мерена само у три испитиване године (1996/97., 1997/98., 1998/99. године).

У овој дисертацији урађена је молекуларна анализа на свим испитиваним генотиповима применом микросателитских маркера. Микросателити су одабрани на основу блиске позиције у односу на ген(е) и/или локусе за квантитативна својства, а која су у претходним литературним подацима показала везу са појединим компонентама приноса и/или неким другим важним агрономским својствима пшенице. Њихов пажљив одабир је подразумевао и распоред дуж сва три генома и релативно равномеран распоред дуж појединачних хромозома, преузетих из базе података *GrainGenes* (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>). Изолација ДНК из сваког појединачног генотипа је урађена *CTAB* методом из младих листова клијанаца пшенице. Након екстракције вршено је квантитативно и квалитативно одређивање изолата геномске ДНК на спектрофотометру. Главни показатељ чистоће ДНК је однос апсорбанце УВ светлости на таласним дужинама од 280 nm и 260 nm, тј. максималне апсорбанције за протеине и за дволанчани ДНК молекул. Умножавање и анализа 41 микросателита на одређеном броју

узорака послужило је за оптимизацију програма за ланчану реакцију полимеразе сваког појединачног маркера. Утврђена је ефикасност и задовољавајући степен полиморфности у оквиру 30 микросателитских локуса, који су употребљени за анализу 283 генотипа пшенице. Продукти ланчане реакције полимеразе су детектовани путем капиларне електрофорезе на генетичком анализатору (АБИ 3130), а потом сакупљени и сачувани у програму Data Collection верзија 3.0 (Applied Biosystems). Анализа је урађена у програму Gene Mapper Software верзија 4.0. У циљу утврђивања генетичке и фенотипске варијабилности, процене генетичке структуре, као и асоцијативне анализе коришћени су различити програми: PowerMarker v.3.25, Excel Microsatellite Toolkit, Structure, TASSEL v.4.0.

У овој докторској тези први пут је показана значајна генетичка варијабилност на молекуларном нивоу великог броја узорака оплемењивачког материјала пшенице. Примена микросателита је показала и потврдила њихов значај као информативних, полиморфних, геном специфичних, широко распрострањених маркера у геному пшенице. Микросателитском анализом утврђен је велики број алелних варијанти (349), као и значајан степен полиморфности (PIC - polymorphism information content) (0,68). Просечан број алела по локусу (11,5) такође је један од бројних параметара који је урађен као показатељ значајног диверзитета. Највећа полиморфност (0,74) је откривена у оквиру Б генома, док је најмања (0,56) присутна у Д геному, што је у складу са еволуцијом и процесом настанка хексаплоидне пшенице. Осим молекуларне анализе, и фенотипска оцена 10 агрономски важних својстава је показала значајну фенотипску варијабилност током пет анализираних година. Највећа вредност коефицијента корелације уочена је између времена класања и цветања (0,975), као и између масе класа и масе зрна по класу (0,953), док су све корелације са индексом класа биле негативне.

Главни предуслов асоцијативне анализе је процена структуре у популацији за коју је коришћено неколико различитих програма. Анализом у програму Structure применом Бајесовог алгоритма утврђено је присуство 6 потпопулација на основу вредности вероватноће. Корекцијама овог модела према инструкцијама Евана процењена је прерасподела генотипова у 3 субпопулације. Класификација на основу вероватноће била је знатно ефикаснија, с обзиром на то да Еванова корекција углавном предвиђа присуство две или три субпопулације независно од броја испитиваних маркера и диверзитета у испитиваном материјалу. Дистрибуција генотипова у појединачне потпопулације може делимично да се објасни географским пореклом и педигре подацима. Такође, потпуна

расподела на основу порекла је отежавајућа јер се елитне линије и оплемењивачки материјал користи и размењује између и унутар различитих оплемењивачких центара. Поред ове, урађена је и унутрашња генетичка структура применом анализе главних координата (*PCoA-principal coordinate analyze*) која је показала сличну дистрибуцију генотипова у координатном систему као и у програму Structure. Тако се структура популације детерминисана моделом у програму Structure показала као одлично средство за дефинисање генетичке структуре, а ови резултати су били кључна компонента за даљу асоцијативну анализу.

Како би се утврдио удео генетичког варирања унутар и између добијених потпопулација урађена је анализа молекуларне варијансе (AMOVA) при чему је највећи удео варирања (91%) потицао од варирања између индивидуа унутар популације, док је најмање (3%) варирање утврђено у оквиру индивидуа. Највеће варирање је пре свега последица варијабилности која потиче од разлика између сорти из различитих оплемењивачких центара, док је најмање у оквиру генотипова исте популације, што је и очекивано на основу добијеног груписања.

Неравнотежа везаности (LD - linkage disequilibrium) има важну улогу у асоцијативној анализи и детерминацији резолуције асоцијативног мапирања. Како је анализом обухваћен мали број маркера са истог хромозома само две вредности интерхромозомског LD су се показале значајне. Иако је појава на независним хромозомима изненађујућа, она се објашњава путем рекомбинација и/или епистатичких интеракција између самих хромозома током процеса селекције. Значајно је напоменути да су вредности LD биле мале и нису могле имати утицај на асоцијативну анализу.

Значајна молекуларна и фенотипска варијабилност била је одличан основ за детекцију везе маркер-својство у току пет анализираних година. Примењен је општи линерани модел (GLM - General Linear Model) помоћу кога је детектован знатно већи број веза (415) у односу на мешовити линеарни модел (MLM - Mixed Linear Model) који је показао већу дискриминацију у погледу детектованих асоцијација (208). У обзир су узети стабилни локуси у већем броју испитиваних година поређењем оба модела, како би се избегле лажне асоцијације и могућност занемаривања потенцијалних локуса детектованих применом само једног модела. На тај начин су све испитиване особине показале везу са одговарајућим бројем маркера у више од 3 испитиване године, осим масе класа и масе зрна по класу које нису биле постојане у више од три године разматрајући оба модела. Укупно су детектована 33 значајна QTL која су лоцирана на следећим хромозомима: 1Б (3), 2А (12), 2Б (1), 2Д (15), 5Б (1) и 6А (1). Од укупног броја испитиваних маркера, 12

микросателита је показало везу са једном или више испитиваних особина. Посебан значај поред детектованих QTL у ранијим истраживањима имају новооткривени локуси као што је QTL одговоран за дужину класа у близини маркера *WMC333* (6A), QTL за број зрна по класу у близини маркера *BARC101* (2B), као и QTL за дужину вршне интернодије и QTL за индекс класа смештен у близини маркера *CFA2086* (2A).

На основу резултата ефеката алела унутар појединачних стабилних локуса издвојени су пожељни алели као и генотипови који су носиоци жељених алела за поједине карактеристике класа и адаптивне особине.

Резултати добијени у оквиру ове докторске тезе указују на могућност имплементације маркер-асистираних селекција у постојеће оплемењивачке програме пшенице чиме би се остварило пре свега повећање приноса генотипова пшенице. Прецизније, генотипови носиоци пожељних алела ће бити искоришћени као потенцијални родитељи у даљим укрштањима који ће послужити за уношење ових алела у нове генотипове. На овај начин ће се омогућити стварање генотипова пшенице са жељеним карактеристикама класа и тиме повећати генетички потенцијал за принос.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Brbaklić, Lj.**, Trkulja, D., Kondić-Špika, A., Hristov, N., Denčić, S., Mikić, S., Tomičić, M., Kobiljski, B. (2015): Genetic associations in the detection of QTLs for wheat spike-related traits. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.50(2): 149-159. DOI: 10.1590/S0100-204X2015000200007. **M22**
2. **Brbaklić, Lj.**, Trkulja, D., Kondić-Špika, A., Mikić, S., Tomičić, M., Kobiljski, B. (2015): Determination of population structure of wheat core collection for association mapping. *Cereal Research Communications*. 43(1): 22-28. DOI: 10.1556/CRC.2014.0027. **M23**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Brbaklić, Lj.**, Trkulja, D., Kondić-Špika, A., Kobiljski, B (2014): Genetic control of heading and flowering time in wheat. In Joint EUCARPIA Cereal Section & ITMI Conference, June 29 -July 4, 2014, Wernigerode, German. p.142. **M34**

Мишљење и предлог Комисије:

На основу увида у докторску дисертацију **Љиљане С. Брбаклић**, чији смо приказ дали у извештају, сматрамо да је дисертација урађена и написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме, да је у њој коришћена адекватна и савремена експериментална методологија и да садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Докторска дисертација Љиљане Брбаклић представља оригиналан научни допринос изучавању диверзитета генома пшенице, као и утврђивању везе између микросателитских маркера и агрономски важних својстава применом асоцијативног приступа. Ови резултати од посебног су значаја за оплемењиваче пшенице, јер постоји могућност њихове директне примене у маркер-асистираној селекцији и унапређењу ефикасности и економичности оплемењивачког процеса. На значај резултата ове дисертације указује и приложена библиографија, односно квалитет часописа у којим су радови публиковани.

Имајући у виду научну вредност резултата, као и начин на који су изложени и интерпретирани, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидату **Љиљани С. Брбаклић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Молекуларна и асоцијативна анализа својстава класа пшенице (*Triticum aestivum* L.)“.

КОМИСИЈА:

др Светлана Радовић, редовни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Анкица Кондић-Шпика, научни саветник,
Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад

др Весна Максимовић, научни саветник,
Универзитет у Београду, Институт за молекуларну
генетику и генетичко инжењерство

У Београду, 08.05.2015. године