

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

Предмет: **Оцена урађене докторске дисертације Катарине Милојевић**

Одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Пољопривредног факултета бр. 33/5-4.7. од 27.01.2016. именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације дипл. инж. Катарине Милојевић, истраживача сарадника Универзитета у Београду-Пољопривредног факултета, под насловом: „**Биолошка и молекуларна карактеризација вируса мозаика краставца (*Cucumber mosaic virus*) у Србији**“. Комисија у саставу др Бранка Крстић, ред. проф., др Ивана Станковић, доц., др Александра Булајић, ред. проф., др Смиља Теодоровић, ванр. проф. Криминалистичко-полицијске академије у Београду и др Ференц Баги, ванр. проф. Универзитета у Новом Саду-Пољопривредни факултет, на основу прегледа докторске дисертације, подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Катарине Милојевић, написана је на 202 стране текста и укључује 16 табела, 83 оригиналне фотографије, једну мапу и две шеме. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи 8 основних поглавља, и то: Увод (стр. 1-2), Преглед литературе (стр. 3-27), Циљеви истраживања (стр. 28-29), Материјал и методе (стр. 30-56), Резултати (стр. 57-137), Дискусија (стр. 138-167), Закључак (стр. 168-171) и Литература (стр. 172-189). На крају текста дисертације налази се Биографија кандидата и Прилог (10 страна). Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводу је указано на значај вируса мозаика краставца (*Cucumber mosaic virus*, CMV) у производњи повртарских, индустријских и украсних биљака. Изнети су основни подаци о таксономији, распрострањености и варијабилности CMV, као и подаци о кругу домаћина овог вируса. Иако је присуство и распрострањеност CMV проучавана у Србији у уводу је указано да постоји веома мало података о генетичкој структури природне популације и факторима који обликују популацију овог вируса у нашој земљи.

Преглед литературе. У поглављу *Преглед литературе* (12 потпоглавља) изнети су доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. У првом потпоглављу *Таксономски статус* наводи се да је CMV типичан представник рода *Cucumovirus*, фам. *Bromoviridae*. У потпоглављу *Распрострањеност* описује се географска распрострањеност овог вируса у свету, са освртом на доминантну распрострањеност различитих подгрупа CMV. Потпоглавље *Присуство CMV у Србији* односи се на претходна проучавања овог вируса у нашој земљи која се углавном односе на проучавање присуства и распрострањености CMV. У четвртном потпоглављу

Економски значај наведене су економске штете које проузрокује у производњи паприке, парадајза, дувана, врежастих култура, украсних биљака, легуминоза и других домаћина. У потпоглављу *Домаћини* наводи се да је CMV један од вируса са најширим кругом домаћина и да је инфективан за више од 1300 врста и наведени су најважнији природни домаћини. У потпоглављу *Идентификација и карактеризација CMV на основу биотеста* указује се на значај проучавања биолошких карактеристика. У потпоглављу *Морфологија вирусних честица и организација генома* изнети су подаци о величини, грађи вирусних честица и организацији генома. У осмом потпоглављу *Функције протеина* изнети су подаци о вишеструкој функцији свих пет протеина кодираних геномом CMV. У потпоглављу *Симптоматологија* приказани су симптоми које вирус мозаика краставца изазива на најважнијим природним домаћинима, а у потпоглављу *Епидемиологија* указује се на начине преношења и одржавања CMV у природи. У *Варијабилност и еволуција* изнети су литературни подаци који указују на изворе варијабилности вируса и генетички диверзитет популације и значај као идеалног модела за проучавање еволуције. Дванаесто потпоглавље *Контрола* односи се на примену основних стратегија и мера сузбијања.

Циљеви истраживања. Основни циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације је утврђивање структуре и генетичког диверзитета популације CMV пореклом са различитих домаћина, различитог географског распрострањења и изолованих у различитим годинама у Србији. Овако сложен задатак једино је остварив кроз примену широког спектра метода: анализа нуклеотидних секвенци свих пет гена троделног генома вируса, анализа полиморфизма рестрикционих фрагмената, филогенетска анализа, анализа рекомбинаната коришћењем одређених софтвера и утврђивање утицаја селекционог притиска. Циљ дисертације је да се на овај начин, коришћењем принципа молекуларне популационе генетике, добије увид у структуру популације CMV у нашој земљи, да се расветле потенцијални фактори који утичу на обликовање популације. На овај начин добијене информације биће корисне за разумевање епидемиолошких аспеката који омогућавају његову распрострањеност и штетност, а све у циљу изналажења и примене ефикаснијих стратегија контроле обољења које овај вирус изазива. С обзиром на све израженије симптоме и штете које CMV изазива на својим домаћинима последњих година, један од циљева докторске дисертације је и утврђивање присуства сателитне РНК (satRNA), њена идентификација и молекуларна карактеризација.

Материјал и методе. У 11 потпоглавља обухваћене су методе примењене за испитивања спроведена у стакленику и лабораторији. Као почетни материјал коришћене су заражене биљке 97 различитих врста, њихових варијетета или сорти са симптомима вирусних зараза прикупљене прегледом 130 локалитета у Србији током четири године (2010-2013) (*Преглед терена и сакупљање узорака*). Детекција присуства вируса у сакупљеним узорцима обављена је применом DAS-ELISA методе, коришћењем комерцијалног поликлоналног антисерума специфичног за детекцију вируса мозаика краставца (*Серолошка испитивања*). Осим узорака сакупљених у периоду од 2010. до 2013. године у истраживања су укључени узорци из колекције биљних вируса лабораторије за вирусологију и микологију (Катедра за фитопатологију, Институт за фитомедицину, Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет) сакупљени у периоду 2007-2009. године. Тако су изолати за проучавање генетичке структуре популације CMV добијени из 44 узорака 18 различитих биљних врста (*Cucurbita pepo* 'Olinka', *C. pepo* 'Tosca', *C. pepo* 'Genovese', *C. pepo* 'Beogradska', *C. pepo*-nepoznate sorte, *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus*, *Citrullus lanatus*, *Cucumis melo*,

Lagenaria siceraria, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum*, *Peperomia tuisana*, *Phaseolus vulgaris*, *Wisteria sinensis*, *Tulipa* sp. i *Stenactis annua*) сакупљених на 30 различитих локалитета. За молекуларну карактеризацију на основу анализе CP гена одабрана су 44 изолата, на основу анализе MP, 2a и 2b гена 19 изолата и на основу анализе 1a гена 15 изолата (*Одабир изолата за молекуларне анализе*). Амплификација генских региона одабраних изолата објашњена је у потпоглављу *Реверзна транскрипција праћене ланчаном реакцијом полимеразе (RT-PCR)*. Амплификацији је претходила екстракција укупних РНК из узорака заражених биљака помоћу RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). За умножавање циљних секвенци пет генских региона CMV примењен је „One-step“ RT-PCR Kit (Qiagen). За амплификацију CP гена дизајнирани су прајмери који умножавају цео CP ген као и 5' и 3' NTR или су коришћени специфични прајмери преузети из литературе код изолата који нису могли да буду амплификовани претходно коришћеним прајмерима. За амплификацију MP, 2b и 1a гена дизајнирано је шест различитих парова прајмера који умножавају део MP, односно део 2a гена, цео 2b и 3' NTR, односно део 1a гена, док су за амплификацију 2a гена коришћени специфични прајмери преузети из литературе који умножавају део 2a гена. Анализа PCR продуката обављена је електрофоретским раздвајањем нуклеинских киселина у 1% агарозном гелу у 1x TBE пуферу у апарату за хоризонталну електрофорезу (BlueMarine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK). Реакције секвенцирања урађене су у MACROGEN Inc. (Јужна Кореја). Након секвенцирања и обраде у секвенци у програму FinchTV Version 1.4.0., молекуларна идентификација изолата CMV, на основу свих пет генских региона, обављена је BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) анализом, а међусобно поређење добијених секвенци и секвенци одговарајућих гена изолата CMV које се налазе у GenBank бази података обављено је у CLUSTAL W програму (*Секвенцирање генских региона одабраних изолата*). *Филогенетске анализе*, обављене су реконструкцијом филогенетских стабала на основу секвенци информативних за пет генских региона CMV, као и на основу комбинације секвенци MP и CP гена (сегмент РНК 3), комбинације секвенци 2a и 2b гена (сегмент РНК 2) и комбинације секвенци свих пет генских региона (РНК 1, 2 и 3) секвенцираних изолата из Србије и одабраних изолата из других делова света доступних у GenBank бази података. Реконструкција филогенетских стабала обављена је коришћењем Maximum parsimony методе за секвенце CP, MP, 2a, 2b и 1a ген, као и секвенце РНК 2 и 3 сегмента, односно UPGMA методом за комбинацију секвенци свих пет генских региона коришћењем MEGA 5.0 софтвера и „bootstrap“ анализе са 1000 понављања. Виртуелном „in silico“ RFLP анализом ДНК секвенци коришћењем pDRAW32 DNA analysis софтвера извршен је одабир рестрикционих ензима који врше дигестију умножених ДНК фрагмената тако да дају различит број фрагмената или фрагменте различитих величина у зависности од припадности подгрупама CMV, док је „in situ“ RFLP анализа обављена након дигестије одабраних секвенци специфичним рестрикционих ензима одговарајућих за сваки од пет тестираних гена (*Полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената*). Анализа рекомбинације обављена је применом RDP v4.36 софтвера. За ову анализу коришћене су секвенце РНК 2 и 3 сегмента. Утврђивање утицаја селекције на популацију CMV обављено је применом „codon-based“ Z-теста селекције имплентираног у MEGA 5.0 програму. У потпоглављу *Биолошка идентификација и карактеризација одабраних изолата CMV* описан је поступак механичких инокулација примењен у циљу провере могућности идентификације и карактеризације изолата различитих подгрупа CMV на основу реакција тест биљака. Детекција сателитне РНК (satRNA), као и молекуларна идентификација и карактеризација детектованих изолата satRNA описана је у потпоглављу 11.

Резултати. Резултати истраживања приказани су јасно, уз концизна текстуална тумачења, прегледне табеле и слике које илуструју делове истраживања у оквиру 10 потпоглавља. У потпоглављу *Присуство и релативна учесталост CMV* дат је преглед биљних врста, њихових варијетета или сорти у којима је доказано присуство CMV по година у периоду од 2010. до 2013. године. Присуство вируса доказано је у 409 (29,68%) узорака, 32 биљне врсте, њихових варијетета или сорти сакупљених на 74 локалитета у Србији. Локалитети у којима је детектовано присуство CMV у току четворогодишњих испитивања приказани су помоћу мапе. У потпоглављу *Симптоми на биљкама у пољу и одабир изолата за даља истраживања* дат је детаљан опис симптома на биљкама у којима је доказан CMV. Описани симптоми документовани су бројним оригиналним фотографијама. Табеларно и текстуално приказан је одабир за даља истраживања 44 изолата пореклом из 18 различитих биљака домаћина скупљених на 30 локалитета током различитих година. У циљу проучавања структуре природне популације CMV извршена је амплификација свих пет генских региона (CP, MP, 2a, 2b и 1a) одабраних изолата пореклом из Србије (потпоглавље *Амплификација генских региона*) коришћењем девет различитих парова прајмера, од којих је седам дизајнирано у току израде ове докторске дисертације, док су два претходно описана у литератури. *Молекуларна идентификација одабраних изолата* (четврто потпоглавље) обављена је BLAST анализом и прорачуном генетичке сличности добијених секвенци CMV за сваки од пет генских региона. Ове анализе су прве указале на варијабилност у оквиру природне популације CMV у Србији. На основу генетичке сличности изолата CMV из Србије су се груписали у две групе на основу секвенци CP, MP и 2b гена, односно у три групе на основу секвенци 1a гена, док се на основу 2a гена сви изолати из наше земље групишу унутар једне групе. У потпоглављу *Филогенетске анализе изолата CMV* реконструисана филогенетска стабла показала су груписање популације овог вируса у три подгрупе (IA, IB и II) на основу секвенци свих пет генских региона. Изолати CMV из наше земље су се на основу филогенетских анализа CP, MP и 2b гена груписали у оквиру подгрупа IA и II, на основу анализа 2a гена у оквиру подгрупе IA, док су се на основу анализа 1a гена груписали у оквиру подгрупа IA, IB и II. Филогенетске анализе засноване на секвенцама појединих гена, указале су да у оквиру 19 испитиваних изолата постоје рекомбинантни изолати: 581-11 пореклом из *Capsicum annuum*, 101-08 из *Solanum lycopersicum*, 1-12 из *Peperomia tuisana* са хаплотипом: II; IA-II; II-II и изолат 540-10 из *Wisteria sinensis* са хаплотипом: IA; IA-IA; IA-II, затим псеудорекомбинантни изолати: 723-10 пореклом из *Capsicum annuum*-хаплотип: IB; IA-IA; IA-IA и изолат 79-13 из *Tulipa* sp. са хаплотипом: II; IA-IA; II-II). Код изолата 267-13 (хаплотип: IB; IA-II; IA-IA) из *Phaseolus vulgaris* дошло је и до рекомбинације и псеудорекомбинације. Реконструисана филогенетска стабла на основу сегмената РНК 2 и РНК 3, такође, су показала издвајање главних молекуларних подгрупа, али и издвајање рекомбинантне подгрупе. Рекомбинантну подгрупу на основу анализа РНК 3 чини само изолат 540-10, а на основу анализе РНК 2 сегмента у рекомбинантну групу сврстала су се четири изолата (101-08, 581-11, 1-12 и 267-13, а на основу анализа РНК 3 сегмента изолат 540-10. Филогенетске анализе изолата CMV на основу комбинације секвенци РНК 1, 2 и 3 сегмента показују да се највећи број изолата CMV из Србије груписао у оквиру подгрупе IA, док су се остали српски изолати издвојили у оквиру две рекомбинантне подгрупе. У прву рекомбинантну подгрупу сврстало се седам изолата од којих су пет пореклом из Србије (изолати 101-08, 540-10, 581-11, 1-12 и 79-13), један из Јапана и један из Кине, док се у другу рекомбинантну подгрупу сврстало такође седам изолата од којих су два пореклом из наше земље (изолати 723-10 и 267-13), два пореклом из Јапана и по један изолат пореклом из Кине, Кореје и Мађарске. У шестом

потпоглављу (*RFLP анализа „in silico“ и „in situ“*) након што су *RFLP* анализом „*in silico*“ одабрани рестрикциони ензими којима се подгрупе *CMV* могу разликовати, обављена је и „*in situ*“ *RFLP* анализа испитиваних изолата. Рестрикциони профили су документовани фотографијама и упоређени са профилима „*in silico*“ *RFLP*. Резултати ове анализе потврдили су постојање рекомбинантних и псеудорекомбинантних изолата у природној популацији *CMV*. Идентични резултати пет независних понављања „*in situ*“ *RFLP* анализа за сваки генски регион показује да припадност одређених изолата различитим подгрупама *CMV* није настала као последица мешаних инфекција између изолата који припадају различитим подгрупама овог вируса, већ да је дошло до измене генетичког материјала. Постојање рекомбинација код испитиваних изолата *CMV* пореклом из Србије потврђена је *RDP* анализом РНК 2 и 3 сегмената добијених спајањем секвенци 2a и 2b гена, односно МР и СР гена. Анализа РНК 3 сегмента потврдила је постојање рекомбинације код изолата 540-10 при чему је овај изолат природни рекомбинант између IA (МР ген) и II (СР ген) подгрупе *CMV*, док је анализа РНК 2 сегмента показала измену генетичког материјала код четири изолата *CMV* (101-08, 581-11, 1-12 и 267-13) пореклом из Србије који представљају природне рекомбинанте између IA (2a ген) и II (2b ген) подгрупе овог вируса. Утврђена је почетна и крајња тачка рекомбинације, дужина измењеног сегмента, као и секвенце главног и споредног родитеља (потпоглавље *RDP анализа*). Потпоглавље *Утицај селекције на секвенце изолата и генске регионе CMV* приказује резултате добијене применом „*codon-based*“ *Z* теста. Добијене укупне просечне вредности d_N/d_S и p вредности за сваки од пет генских региона *CMV* указале су да на све тестиране регионе овог вируса делује негативна селекција. Резултати добијени тестирањем сваког пара секвенци код свих анализираних гена показали су да све тестиране групе секвенци подлежу негативној селекцији. Једини изузетак примећен је када су међусобно тестиране секвенце изолата 115-08 и 471-09, на основу анализа секвенци СР гена, на који утиче слаба позитивна селекција. У деветом потпоглављу (*Биолошка идентификација и карактеризација CMV*) приказана је биолошка карактеризација девет одабраних изолата *CMV*, од којих пет на основу анализа СР гена припадају IA, а три припадају II подгрупи. Одабрани изолати *CMV* су на основу типа симптома и круга домаћина испољили приличну фенотипску варијабилност популације *CMV* у Србији. Додатним тестирањем одабраних изолата *CMV* из Србије детектовано је присуство сателитне РНК код изолата 101-08 и AP1-12 пореклом из парадајза и изолата 1-12 пореклом из *Peperomia tuisana* коришћењем специфичних прајмера. Молекуларна идентификација и карактеризација детектованих изолата *satRNA CMV* обављена је *BLAST* анализом, прорачуном генетичке сличности добијених секвенци и реконструкцијом филогенетског стабла. Филогенетска анализа показала је да се изолати 101-08 и AP1-12 групишу заједно са изолатима некрогеног („*necrogenic*“) соја, док се изолат 1-12 групише са изолатима обичног („*non necrogenic*“) соја (потпоглавље *Молекуларна детекција, идентификација и карактеризација satRNA*). Захваљујући широко планирам експериментима, који су укључили: скупљање изолата *CMV* прегледом великог броја о локалитета и биљака домаћина, серолошку и молекуларну детекцију и идентификацију, анализу секвенци различитих делова генома вируса филогенетским анализама, *RFLP*, анализу рекомбинације, утврђивање утицаја селекционог притиска на обликовање популације, као и биолошку карактеризацију одабраних изолата, добијени су вредни подаци генетичкој структури природне популације *CMV* у Србији.

Дискусија. Добијени резултати дискутовани су у оквиру девет потпоглавља уз концизна тумачења. У потпоглављу *Симптоми CMV на природно зараженим биљкама*

истакнуто је да су уочене разноврсне морфолошке и хроматске промене на листовима и плодовима биљака заражених са CMV, као и промене у општем изгледу биљака. У току ових истраживања први пут су као нови домаћини вируса у Србији утврђене две украсне биљке, *Peperomia tuisana* и *Tulipa* sp. Утврђено је присуство овог вируса на украсном багрему (*Wisteria sinensis*) и коровској биљци красолика (*Stenactis annua*), као новим домаћинима у свету, чиме је проширен круг домаћина овог вируса. У потпоглављу *Амплификација изолата CMV* објашњена је потреба дизајнирања седам нових парова прајмера чиме је омогућена успешна амплификација парцијалних или целих генских региона изолата CMV, што је било неопходно за даља истраживања и детаљну карактеризацију овог вируса. У потпоглављу *Молекуларна идентификација изолата CMV* наведено је да су сви изолати, на основу степена нуклеотидне сличности, идентификовани као CMV, да је степен нуклеотидне хомологије варирао у зависности од генског региона и да је на основу раније утврђених критеријума, низак степен сличности секвенци CP гена испитиваних изолата био први показатељ варијабилности у оквиру природне популације CMV у нашој земљи. Међутим, утврђен је, као и у многим другим истраживањима, низак генетички диверзитет у оквиру одређене подгрупе вируса што указује на сопствену локалну динамику у погледу настајања и насумичних реколонизација из локалних или удаљених извора заразе. Висока хомологија секвенци изолата одређених подгрупа указала је да не постоји јасна географска повезаност, као ни повезаност са биљком домаћином. У потпоглављу *Филогенетске анализе CMV* истакнуто је да су формиране раније описане подгрупе вируса и да су се изолати пореклом из Србије груписали различито у зависности на основу ког гена су спровођене анализе. Реконструисана филогенетска стабла на основу РНК 2 и 3 сегмента, као и на основу комбинације секвенци различитих сегмената (РНК 1, 2 и 3) потврдила су груписање изолата по појединачним генима, при чему су се издвојиле рекомбинантне групе. Ови резултати показују да се филогенетске анализе могу ефикасно користити за карактеризацију популације и за утврђивање постојања рекомбинације. Резултати филогенетских анализа показали су присуство шест различитих хаплотипова у природној популацији CMV. Највећи број изолата CMV пореклом из Србије по свим генским регионима припада IA подгрупи, где се налази већина светских изолата овог вируса. Удео рекомбинантних и псеудорекомбинантних изолата у природној популацији био је мали, што је најчешће био случај и у природним популацијама CMV широм света. У потпоглављу *Карактеризација одабраних изолата применом RFLP методе* дискутовани су резултати добијени у „*in silico*“ и „*in situ*“ RFLP анализи и истакнуто да су одабрани рестрикциони ензими омогућили разликовање изолата IA, IB и II подгрупе CMV код свих генских региона овог вируса. Такође, анализе су потврдиле присуство рекомбинантних и псеудорекомбинантних изолата, али и искључиле присуство мешане инфекције код ових изолата. У овом потпоглављу приказана је предност ове методе у односу на друге молекуларне методе, при чему је наведено да за ову методу није неопходно претходно секвенцирање и да се њоме могу детектовати грешке настале приликом секвенцирања. Примењена метода показала се веома корисном и исплативом када се анализира велики број узорака, при чему је поузданост методе постигнута коришћењем више од једног рестрикционог ензима. *RDP анализа рекомбинације* потврдила је измену генетичког материјала у природној популацији CMV у Србији у оквиру РНК 2 и 3 сегмента. Резултати ових истраживања указали су на већу заступљеност рекомбинација између изолата I и II подгрупе у односу на измену генетичког материјала између IA и IB чије је присуство чешће у природним популацијама CMV у свету. Као разлог за већу заступљеност измене генетичког материјала између изолата I и II подгрупе наводе се климатски услови, јер се Србија налази у региону са умереном климом која погодује изолатима II

подгрупе CMV чиме су створени услови за овакав тип измене генетичког материјала. У седмом потпоглављу се наводи да негативна („purifying“) селекција утиче на све тестиране гене и парове секвенци CMV. Једини изузетак установљен је између једног пара секвенци, на основу CP гена, на који утиче слаба позитивна селекција. Иако је утврђено да негативна селекција преовлађује током еволуције CMV, неки аутори наводе да су у оквиру одређених генских региона детектована места која подлежу позитивној селекцији. Током ових истраживања утврђене су извесне фенотипске разлике између испитиваних изолата CMV по кругу домаћина, по типу и времену испољавања симптома. Без обзира на детаљну молекуларну карактеризацију није било могуће повезати биолошке особине са генотипским разликама између различитих подгрупа испитиваних изолата CMV, а за разлог овако добијених резултата наведено је да се геном CMV састоји од пет гена који кодирају протеине који су мулти-функционални, као и присуство рекомбинација и псеудорекомбинација у одабраним изолатима. На основу секвенцираних делова satRNA изолати пореклом из Србије показали су мањи степен хомологије секвенци, што је и потврђено филогенетским анализама у којем су се изолати груписали у две групе. Испитивањима у оквиру ове дисертације први пут је детектовано присуство сателитних РНК, пратиоца CMV у Србији. Иако утицај satRNA на репликацију, патогеност, као и на експресију симптома у највећој мери зависи од биљке домаћина и соја CMV, њено присуство најчешће доводи до већих штета у пољопривредним усевама.

Закључци. Закључци су правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата. Спроведена испитивања су потврдила присуство CMV у 20,68% сакупљених узорака пореклом из 32 биљне врсте, варијетета или сорти различитих повртарских, индустријских, украсних и коровских биљака. У оквиру ових истраживања *Tulipa* sp. и *Peperomia tuisana* први пут су откривене као домаћини у Србији, а *Wisteria sinensis* и *Stenactis annua* су откривене као нови домаћини CMV не само код нас, већ и у свету. Сакупљене биљке, у којима је доказан CMV испољиле су различите типове симптома, у зависности од врсте домаћина и времена инфекције. Амплификација генских региона одабраних изолата обављена је дизајнираним прајмерима или специфичним прајмерима описаним у литератури и РТ-PCR методом. Молекуларна идентификација свих пет генских региона CMV обављена је анализом нуклеотидне и аминокиселинске сличности секвенцираних изолата и указала је на варијабилност природне популације овог вируса у нашој земљи. Филогенетске анализе на основу секвенци парцијалних MP и CP гена и целог 2b показале су да се српски изолати групишу у подгрупе IA и II, на основу секвенци парцијалног 1a гена изолати CMV су груписани у оквиру подгрупа IA, IB и II, док се на основу парцијалног 2a гена налазе у оквиру IA подгрупе. Филогенетска стабла на основу секвенци РНК 2 и 3 показале су јасно издвајање раније описаних молекуларних подгрупа, али и издвајање рекомбинантних подгрупа. У рекомбинантну подгрупу на основу анализа секвенци РНК 3 сегмента сврстао се један изолат, док се у рекомбинантну подгрупу на основу анализа секвенци РНК 2 сегмента налазе четири изолата. Филогенетско стабло на основу секвенци различитих сегмената (РНК 1, 2 и 3) CMV, као и она реконструисана на основу секвенци појединих гена, указало је на присуство псеудорекомбинантних и рекомбинантних изолата у природној популацији овог вируса у нашој земљи издвајањем поменутих изолата из постојећих подгрупа и груписањем у оквиру две рекомбинантне подгрупе. У природној популацији CMV у Србији идентификовано је више различитих хаплотипова. Највећи број изолата CMV пореклом из Србије по свим генским регионима припада IA подгрупи. Рекомбинације су утврђене код четири изолата, од којих три изолата имају хаплотип I; IA-II; II-II, док један изолат има хаплотип IA; IA-IA; IA-II. Псеудорекомбинације су

утврђене код два izolata којима одговарају хаплотипови IB; IA-IA; IA-IA, односно II; IA-IA; II-II, док су рекомбинације и псеудорекомбинације утврђене код једног izolata коме одговара хаплотип IB; IA-II; IA-IA. Груписање izolata у одговарајуће подгрупе и присуство рекомбинација и псеудорекомбинација у природној популацији CMV у Србији потврдиле су и RFLP анализе коришћењем одговарајућих рестрикционих ензима, при чему је овим анализама искључено присуство мешаних инфекција. Измена генетичког материјала у виду рекомбинација код пет izolata пореклом из Србије потврђена је и применом RDP софтвера. Анализа природне селекције показала је да на све тестиране генске регионе CMV делује негативна („purifying“) селекција, која ограничава велике промене диверзитета и води ка генетичкој униформности популације. Биолошка карактеризација указала је на приличну фенотипску варијабилност популације CMV у Србији. Међутим, није било могуће повезати фенотипске особине са генотипским разликама између испитиваних izolata, при чему се ни једна коришћена тест биљка није показала погодном за разликовање izolata подгрупа овог вируса. Први пут је доказано присуство satRNA у Србији, при чему су се детектоване satRNA на основу филогенетских анализа груписале у две групе („necrogenic“ и „non necrogenic“).

Литература. У дисертацији је наведено 290 референци (43 домаћих и 247 страних аутора). Избор референци је актуелан и одговара проучаваној проблематици.

Прилози. У прилозима су приказани допунски материјали који су од значаја за боље разумевање овог рада: табеле процената сличности нуклеотидних и изведених аминокиселинских секвенци свих испитиваних izolata из Србије за пет испитиваних генских региона CMV (Прилози 1-5) и резултати анализа „codon-based“ Z теста позитивне селекције за сваки пар испитиваних секвенци свих тестираних генских региона CMV (Прилози 6-10).

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Катарине Милојевић, дипл. инж., под насловом: „Биолошка и молекуларна карактеризација вируса мозаика краставца (*Cucumber mosaic virus*) у Србији“ представља оригиналан научни рад са практичним и фундаменталним значајем и у потпуности је у сагласности са прихваћеним планом пријаве дисертације. Тема и садржај ове дисертације су актуелни и значајни имајући у виду распрострањеност и штете које вирус мозаика краставца (CMV) причињава у Србији и свету. Дисертација представља комплексну студију о структури природне популације CMV. Резултати ове дисертације дали су прва прецизна сазнања о структури популације и генетичком диверзитету CMV у Србији, као и прве статистичке податке генетичке структуре популације овог вируса у нашој земљи преко параметара популационе генетике. Такође, у истраживањима је примењено више различитих метода карактеризације вируса мозаика краставца, чиме су добијени поуздани резултати о присуству одређених подгрупа CMV, као и о присуству рекомбинантних и псеудорекомбинантних izolata CMV у Србији и извршена је детекција извора генетичког варирања што је од практичног значаја за изналажење и примену ефикаснијих стратегија контроле обољења које овај вирус изазива. Допринос ове докторске дисертације се огледа и у утврђивању нових биљака домаћина CMV, као и присуства сателитних РНК и њиховој карактеризацији. Унапређене су молекуларне методе детекције дизајнирањем прајмера за амплификацију различитих генских региона. Развијена је и прилагођена изолатима CMV пореклом из Србије брза и ефикасна RFLP анализа коришћењем одговарајућих рестрикционих ензима за

разликовање подгрупа овог вируса. Ова дисертација може послужити као модел систем за проучавање популација других фитопатогених вируса у нашој земљи на начелима молекуларне популационе генетике.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Катарине Милојевић, дипл. инж. под насловом: „Биолошка и молекуларна карактеризација вируса мозаика краставца (*Cucumber mosaic virus*) у Србији“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидату да пред истом Комисијом јавно брани докторску дисертацију.

Чланови Комисије:

др Бранка Крстић, редовни професор
(област Фитопатологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет

др Ивана Станковић, доцент
(област Фитопатологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет

др Александра Булајић, редовни професор
(област Фитопатологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет

др Смиља Теодоровић, ванредни професор
(област Биолошко инжењерство)
Криминалистичко-полицијска академија, Београд

др Ференц Баги, ванредни професор
(област Фитопатологија)
Универзитет у Новом Саду-Пољопривредни факултет

Београд, 07.03.2016.

Прилог:

Сепарат објављеног рада дипл. инж. Катарине Милојевић у научном часопису на SCI листи

Aleksandra R. Bulajić, Ivana M. Stanković, Ana B. Vučurović, Danijela T. Ristić, **Katarina N. Milojević**, Mirko S. Ivanović, Branka B. Krstić (2014): *Tomato Spotted Wilt Virus*-Potato Cultivar Susceptibility and Tuber Transmission. *American Journal of Potato Research*, 91: 186-194.