

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На II редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 15.11.2019. године, на основу молбе ментора др Младена Вујошевића, научног саветника у пензији Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, Универзитета у Београду и др Драгане Цветковић, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Иване В. Будински**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, под насловом: „**Генетичка структура популација средоземног потковичара *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 у Србији и филогеографија ове врсте на Балканском полуострву**“, у саставу:

- др Младен Вујошевић, научни саветник у пензији, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
- др Драгана Цветковић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет
- др Јелена Благојевић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Иване В. Будински** под насловом: „**Генетичка структура популација средоземног потковичара *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 у Србији и филогеографија ове врсте на Балканском полуострву**“ је урађена у Одељењу за генетичка истраживања Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду, а у оквиру пројекта „Генетичка и фенетичка разноврсност у природним популацијама у различитим срединама – допринос полиморфизма Б хромозома“, којим је руководио др Младен Вујошевић. Дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Стране са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област, Ужа научна област и УДК број), Садржај, Текст рада по поглављима, Биографију аутора и попуњене и потписане изјаве (Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и

електронске верзије докторског рада, Изјава о коришћењу)

Докторска дисертација је написана на 96 страна и садржи 12 табела (3 у поглављу Материјал и методе, 6 у поглављу Резултати и 3 у поглављу Прилози) и 20 слика (3 у поглављу Увод, 2 у поглављу Материјал и методе и 15 у поглављу Резултати). Поглавље Литература садржи 150 библиографских јединица. Пагинирани текст подељен је у 8 поглавља: **Увод** (20 страна), **Циљеви** (2 стране), **Материјал и методе** (14 страна), **Резултати** (24 стране), **Дискусија** (13 страна), **Закључци** (2 стране), **Литература** (12 страна), **Прилози** (8 страна).

Јединке средоземног потковичара, *Rhinolophus euryale*, коришћене у овом раду, су из природних популација, а пошто се врста налази на листи строго заштићених, хватање животиња и узимање узорака за генетичке анализе је вршено на основу дозвола издатих од стране надлежних институција у државама где су вршена истраживања (Србија: 353-01-3031/2012-03, 353-01-685/2013-08, 353-01-2660/2013-08, 353-01-1994/2014-17, 353-01-2503/2015-17, 353-01-2671/2016-17; Босна и Херцеговина 08-3-28-2225-5/16; Црна Гора 02-УПІ-959/4; Словенија ARSO 35601-35/2010-6).

## Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације је испитивање генетичке структуре популација средоземног потковичара *Rhinolophus euryale* и филогеографска анализа ове врсте на подручју централног Балкана. Анализирана је генетичка варијабилност и степен сродства међу јединкама у 12 популација средоземног потковичара применом нуклеарних микросателита, а секвенце митохондријске Д-петље су коришћене за анализу генетичке варијабилности, демографске историје и филогеографије. Тестиран је ISSR-PCR метод за брзо и поуздано разликовање ове врсте од друге, морфолошки сличне врсте потковичара. На основу свих до сада прикупљених података детаљно је урађен преглед дистрибуције и евалуација популационих трендова ове врсте у Србији.

Кандидаткиња је поглавље **УВОД** поделила на четири целине у којима је образложена заснованост ових истраживања на основу расположиве литературе, као и оправданост метода које су коришћене у анализи. У првој целини кандидаткиња представља опште карактеристике слепих мишева и истиче њихове специфичности као што су: морфологија крила, од које зависи миграторно понашање, одабир склоништа и социјална структура, односно груписање у колоније. У другој целини даје преглед мера генетичке варијабилности у природним популацијама, као и преглед молекуларних метода које се користе да би се одговорило на различита таксономска, филогенетска и еколошка питања. Трећа целина посвећена је прегледу ефеката ледених доба у Европи на генетички диверзитет и његову дистрибуцију и преглед рефугијалних подручја за многе врсте животиња, укључујући и слепе мишеве. У четвртој целини овог поглавља, кандидаткиња се фокусира на предмет истраживања, на средоземног потковичара, и даје опис биологије ове врсте, систематично наводећи литературу и преглед свих досадашњих истраживања. Врста је распрострањена у ширем подручју око Средоземног мора, где током године јединке формирају колоније, углавном у подземним склоништима. Јединке између зимских и летњих склоништа прелазе мале дистанце. Код нас је средоземни потковичар распрострањен у кречњачким пределима у западној и источној Србији, а јединке оба пола показују приврженост склоништима. До сада је ове врсте само два пута била предмет филогеографских истраживања применом митохондријских маркера, и то на подручју Ирана и Турске (Анадолија), док друга

генетичка истраживања ове врсте нису раније публикована.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ** јасно су дефинисани циљеви студије. Први циљ је био обједињавање свих доступних података о дистрибуцији средоземног потковичара у Србији и евалуација популационих трендова, с обзиром на то да је дошло до опадања бројности популација ове врсте у многим деловима ареала. Следећи циљ је био тестирање ISSR-PCR као методе за разликовање врста *Rhinolophus euryale* и *Rhinolophus blasii*. Секвенце митохондријске ДНК су коришћене за анализе демографске историје и филогеографије средоземног потковичара, а све у циљу тестирања претпоставке да је Балканско полуострво представљало глацијални рефугијум ове врсте. Следећи циљ је био испитивање генетичког диверзитета у популацијама ове врсте на подручју централног Балкана применом микросателитских маркера. Седентарна природа и обрасци дистрибуције, као и целокупна биологија врсте указују на могућност изолованости путем дистанце између популација источне и западне Србије, те је циљ био тестирање ове претпоставке. Такође, циљ је био и утврђивање степена сродства између јединки унутар различитих типова колонија.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** детаљно је описан процес прикупљања података и материјала за генетичке анализе, и дат је детаљан преглед свих коришћених метода, софтвера и процедура урађених анализа. У овом делу је издвојено шест целина. У оквиру првог потпоглавља су наведени начини прикупљања података о дистрибуцији врсте, док су у другом наведене процедуре за прикупљање узорака за генетичке анализе. Даље су наведени протоколи за изолацију и амплификацију ДНК. У четвртном делу је описан протокол за ISSR-PCR. У петом и шестом потпоглављу су дати спискови локалитета и описане процедуре амплификације микросателитских локуса односно секвенци митохондријске Д-петље, и детаљно описане све анализе, наведени сви коришћени софтвери и описана подешавања за анализе у тим софтверима.

Кандидаткиња је поглавље **РЕЗУЛТАТИ** организовала у четири потпоглавља у којима систематично излаже добијене резултате истраживања. У првом потпоглављу су приказани резултати везани за дистрибуцију средоземног потковичара у Србији. Дат је преглед налаза познатих из литературе заједно са новим налазима ове врсте. Од 26 локалитета на којима је средоземни потковичар забележен приликом истраживања у оквиру ове тезе, на 11 локалитета је био забележен по први пут. Такође је дата карактеризација типа евидентираних склоништа са бројношћу присутних колонија. У другом делу су приказани резултати тестирања молекуларне методе која је први пут примењена у идентификацији врста средњих потковичара. Дефинисане су специјес-специфичне маркер траке за анализиране врсте потковичара. У трећој целини су приказани резултати анализе секвенци митохондријске ДНК из целокупног ареала врсте. Методама филогенетске реконструкције и конструисања мреже хаплотипова су се издвојила три јасно дефинисана кластера, од којих су два представљена узорцима из Ирана (секвенце преузете из Банке гена), а трећу групу чине сви узорци анализирани у овој тези заједно са узорцима из Турске (Анадолија), Француске и северне Африке који су преузети из Банке гена. Кандидаткиња је квантификовала степен генетичких разлика између ових група, и датирала када је дошло до њиховог раздвајања. Такође су приказани резултати анализе демографске историје кластера коме припадају овде анализирани узорци, који подржавају сценарио популационе експанзије. У четвртном потпоглављу су приказани резултати генетичке анализе популација применом микросателита. Забележен је умерен ниво генетичке диференцијације између анализираних популација, значајна изолација путем дистанце и висок ниво адмиксије. На анализираним узорцима су се издвојила три генетичка кластера: источна Србија и Црна Гора, западна Србија и Словенија. Просечан степен сродности између јединки

унутар колонија је био врло низак, и није забележена значајна разлика у степену сродности између чланова колонија различитог типа.

У оквиру поглавља **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња је добијене резултате упоредила и критички разматрала у светлу досадашњих литературних података из области истраживања. Пре свега, ова теза представља прву студију овог типа код слепих мишева са подручја централног Балкана уопште, па тако и прву популационо-генетичку анализу средоземног потковичара употребом молекуларних маркера на анализираном подручју.

Анализом дистрибуције средоземног потковичара у Србији је потврђен литофилни карактер ове врсте, пошто је већина налаза била у подземним склоништима као што су пећине и напуштени рудници, и скоро сви локалитети се налазе у кречњачким пределима. Забележена је само једна колонија у грађевини, што представља први и једини налаз ове врсте у надземном склоништу у Србији. Такође је веома значајан налаз две летње колоније мужјака, јер тај тип колонија раније није био познат из литературе. Иако је врста претходних година претрпела значајан пад бројности у популацијама широм ареала, у Србији такав тренд није забележен. За време истраживања нису забележени значајни фактори угрожавања ни осцилације бројности, те се сматра да је популациони тренд ове врсте у Србији стабилан.

У другој целини је истакнут апликативни значај постојања поузданог метода за разликовање морфолошки сличних врста средњих потковичара. Иако постоје дефинисани морфолошки карактери за разликовање средоземног и јужног потковичара, често се могу наћи јединке са интермедијарним карактерима што може довести до погрешне идентификације, а самим тим и погрешних закључака о дистрибуцији и бројности ових врста.

На основу анализа секвенци митохондријске ДНК је уочено постојање три монофилетске кладе, које су раније забележене применом других маркера. Занимљиво је да сви узорци из Европе, северне Африке и Анадолије чине једну кладу. На Балканском полуострву је забележен велики диверзитет хаплотипова, а мали нуклеотидни диверзитет. Такође, мрежа хаплотипова има звездасту структуру, што наводи на закључак да је највероватније дошло до експанзије популација са Балканског полуострва које је врло вероватно било глацијални рефугијум ове врсте у Европи. Кандидаткиња је у овом делу детаљно образложила уочен образац дистрибуције генетичког диверзитета у светлу прошлих догађаја и у поређењу са сличним обрасцима генетичког варирања забележеним код других врста слепих мишева.

У послењем потпоглављу кандидаткиња дискутује резултате добијене анализом 12 популација средоземног потковичара на подручју централног Балкана. Добијена је очекивана значајна изолација путем дистанце, али много мања диференцираност између популација него што је било очекивано с обзиром на ограничене миграторне способности и изражену филопатрију код ове врсте. Иако је забележен велики степен адмиксије, уочена је значајна диференцираност међу популацијама из источне и западне Србије. Нечекивано, популација из Црне Горе показала је већу генетичку сличност са популацијама из источне Србије. Кандидаткиња то објашњава могућим постојањем колонија између ова два региона, чиме би био омогућен већи проток гена. Такође, популација из Црне Горе се значајно разликује од популација из западне Србије од којих је много мање удаљена, до чега је највероватније дошло због физичких баријера (планински масив) који ограничавају проток гена. Супротно очекивању, анализе сродства нису показале да постоје разлике у степену сродности између јединки у различитим типовима колонија, и претпоставља се да сродност није фактор који доводи до груписања животиња у колоније. Кандидаткиња дискутује који су други могући разлози који доводе до формирања и одржавања социјаних група код ове врсте.

Кандидаткиња је у поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** сумирала најважније резултате и изнела следеће закључке:

1. Дистрибуција средоземног потковичара у Србији се поклапа са кречњачким подручјима, где је присуство ове врсте забележено на 73 локалитета. Сва склоништа осим једног се налазе у подземним објектима као што су пећине, јаме и напуштени рудници.
2. Популације средоземног потковичара у Србији имају стабилан тренд и нису забележени значајни фактори угрожавања ове врсте.
3. Могуће је брзо и поуздано разликовање морфолошких сличних врста средоземни потковичар *Rhinolophus euryale* и јужни потковичар *Rhinolophus blasii* применом ISSR-PCR методе.
4. Генетичким анализама секвенци Д-петље митохондријске ДНК је установљен велики диверзитет хаплотипова. Ове анализе указују на релативно скору и брзу популациону експанзију, а процењено је да је до експанзије дошло пре око 23000 година.
5. Добијени резултати подржавају хипотезу да је Балканско полуострво представљало један од глацијаних рефугијума ове врсте током Плеистоцена.
6. Анализама микросателитских маркера је такође забележен велики генетички диверзитет, умерен ниво диференцијације између географских региона и значајна изолација путем дистанце.
7. Диференцираност између популација у западној и источној Србији је мала, али значајна, што се објашњава седентарном природом врсте и приврженошћу склоништима.
8. Популација из Црне Горе је генетички слична популацијама из источне Србије, што индиректно указује на потенцијално постојање колонија између тих региона, вероватно ван кречњачких подручја.
9. Сродност јединки није главни фактор који доводи до груписања јединки у колоније. До тога највероватније долази због размене информација о склоништима и ловним територијама, као и због користи од групне терморегулације.
10. Балканске популације средоземног потковичара се сматрају највећим и најстабилнијим, и у њима је садржан велики део генетичног диверзитета врсте, и очување тих популација представља значајан фактор за опстанак врсте.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 150 библиографских јединица релевантних за области истраживања од значаја за докторску дисертацију. Наведена литература доприноси бољем разумевању добијених резултата и њиховом дискутовању у ширем контексту истраживања.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

Радови у часописима међународног значаја

- **Budinski I**, Blagojević J, Jovanović VM, Pejić B, Adnađević T, Paunović M, Vujošević M (2019) Population genetic structure of the Mediterranean horseshoe bat *Rhinolophus euryale* in the central Balkans. PLOS ONE 14(1): e0210321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210321>. **M21**
- **Budinski I**, Jovanović VM, Pejić B, Blagojević J, Rajičić M, Paunović M, Presetnik P, Vujošević M (2019) Mitochondrial phylogeography of the

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

- **Budinski I**, Rajičić M, Jovanović V, Adnađević T, Bugarski-Stanojević V, Vujošević M (2014) Rapid identification of two medium-sized horseshoe bats *Rhinolophus blasii* and *Rhinolophus euryale* using ISSR-PCR method. Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 12-13.7.2014, Istanbul, Turkey. Book of Abstracts p. 33. **M34**
- **Budinski I**, Blagojević J, Jovanović V, Pejić B, Rajičić M, Paunović M, Vujošević M (2017) Population genetic structure of the Mediterranean horseshoe bat, *Rhinolophus euryale* in Serbia. XIV European Bat Research Symposium, 1-5.8.2017, Donostia, The Basque Country. Book of abstracts p. 66. **M34**
- **Budinski I**, Jovanović VM, Pejić B, Blagojević J, Rajičić M, Paunović M, Presetnik P, Vujošević M (2019) Was the Balkan peninsula a glacial refugium for the Mediterranean horseshoe bat, *Rhinolophus euryale* (Blasius, 1853). VI Congress of the Serbian Genetic Society, 13-17.10.2019. Vrnjačka Banja, Serbia. Book of abstracts p. 151. **M34**

### Провера оригиналности докторске дисертације

Коришћењем програма iThenticate извршена је провера оригиналности докторске дисертације Иване В. Будински. Извештај је показао индекс подударност од 4%. Увидом у Извештај утврђена су подударања са 55 примарних извора. Подударање са свим изворима је било мање од 1% и односило се на генералне појмове, као што су: називи врста, држава, институција, уобичајене скраћенице, опште фразе, стручни термини, и сл. Увидом у Извештај потврђена је оригиналност резултата докторске дисертације кандидата Иване В. Будински, под насловом „Генетичка структура популација средоземног потковичара *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 у Србији и филогеографија ове врсте на Балканском полуострву”.

### Мишљење и предлог Комисије

На основу претходно изнетог, као и на основу непосредног увида у рад кандидаткиње током израде ове тезе, сматрамо да докторска дисертација **Иване В. Будински** под насловом: „Генетичка структура популација средоземног потковичара *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 у Србији и филогеографија ове врсте на Балканском полуострву“ представља оригиналан научни рад. У овој докторској дисертацији коришћене су савремене молекуларно-генетичке методе, а истраживања су обављена сходно критеријумима добре научно-истраживачке праксе. Значајно је истаћи да је ово прва популационо-генетичка студија на некој врсти слепих мишева на подручју Балкана.

Ова докторска дисертација представља оригиналан допринос разумевању генетичке варијабилности и демографске историје популација средоземног потковичара, *Rhinolophus euryale*. Резултати рада имају шири научни допринос у разумевању биолошког диверзитета и, осим фундаменталног аспекта, имају пратичну примену у конзервацији и програмима заштите средоземног потковичара.

Ивана Будински је током рада на докторској дисертацији показала изузетне способности за теренска и лабораторијска истраживања, самосталност и снажљивост у раду. Теренски рад са слепим мишевима је изузетно захтеван, јер се обавља ноћу у пећинама и јамама и изискује вештину и обученост за рад са животињама. Истраживања су временски ограничена и везана за годишњи циклус врсте. Исте квалитете показала је и у лабораторијском раду, овладала бројним методама и алатима за анализу добијених података. Ивана Будински је редак ентузијаста, посвећени истраживач и одличан познавалац биологије слепих мишева. Све ово, уз усвајање знања из литературе и критички однос према добијеним резултатима резултовало је квалитетним публикацијама и изузетном докторском дисертацијом.

На основу свега изнетог, имајући у виду значај и научну вредност резултата, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и утврди предлог да се кандидаткињи **Ивани В. Будински** одобри јавна одбрана докторске дисертације у складу са важећим прописима.

#### КОМИСИЈА:

У Београду, 15.11.2019.

---

др Младен Вујошевић, научни саветник у пензији  
Универзитет у Београду –  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

---

др Драгана Цветковић, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Јелена Благојевић, научни саветник  
Универзитет у Београду –  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“