

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 290/2-7.4.
Датум: 26.11.2014.

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

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

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

Кандидат **СЛАЂАН (Јован) АЏИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Пољопривредне науке, модул Ратарство и повртарство, пријавио је докторску дисертацију под називом: «РЕГУЛАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА ЦВЕТАЊА ПРИМЕНОМ ВЕРНАЛИЗАЦИЈЕ КОД КУПУСА (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)», из научне области Ратарство и повртарство.

Универзитет је дана 06.07.2011. године, својим актом број 06-6256/26 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «РЕГУЛАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА ЦВЕТАЊА ПРИМЕНОМ ВЕРНАЛИЗАЦИЈЕ КОД КУПУСА (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 25.06.2014. године, одлуком Факултета број 277/9-5.1. у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Славен Продановић, редовни професор, Оплемењивање биљака, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Јасмина Здравковић, научни саветник, Генетика и оплемењивање биљака, Институт за повртарство у Смедеревској Паланци,
3. др Вера Ракоњац, редовни професор, Генетика биљака, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
4. др Томислав Живановић, редовни професор, Генетика биљака, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
5. др Мира Милисављевић, научни сарадник, Молекуларна генетика, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 26.11.2014. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА
Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 290/2-7.4.
Датум: 26.11.2014. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 123. Закона о високом образовању и члана 24. Правилника о последипломским студијама и докторату наука, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 26.11.2014. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднео **СЛАЂАН АЦИЋ, дипл. инж.** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **"РЕГУЛАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА ЦВЕТАЊА ПРИМЕНОМ ВЕРНАЛИЗАЦИЈЕ КОД КУПУСА (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)"**.

II Универзитет је дана 06.07.2011. године својим актом број 06-6256/26 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Pavlović S., Adžić S., Cvikić D., Zdravković J., Zdravković M., (2012): In vitro culture as a part of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. breeding. Genetika, Vol. 44 No. 3, pp. 611 618.

**П Р Е Д С Е Д Н И К
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
Д Е К А Н**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору др Славену Продановићу, редовном професору, Институту за ратарство и повртарство, Студентској служби и архиви.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Предмет: Оцена урађене докторске дисертације Слађана Аџића, дипл.инж.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду бр. 277/9-5.1. од 25.06.2014. године, именована је Комисија у саставу: др Славен Продановић, ред. проф. Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Вера Ракоњац, ред. проф. Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Јасмина Здравковић, научни саветник Института за повртарство д.о.о. из Смедеревске Паланке, др Томислав Живановић, ред. проф. Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Мира Милисављевић, научни сарадник ИМГГИ Универзитета у Београду, за оцену и одбрану урађене докторске дисертације Слађана Аџића, дипл.инж., истраживача-сарадника Института за повртарство д.о.о. из Смедеревске Паланке, под насловом: „Регулација експресије гена цветања применом вернализације код купуса (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)“. Именована Комисија прегледала је и оценила ову докторску дисертацију и о томе подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Слађана Аџића, дипл. инж., написана је на 202 стране куцаног текста. У оквиру ове докторске дисертације приказане су 73 табеле, 47 графикона и 29 слика. Приликом израде ове докторске дисертације проучено је и цитирано 186 извора литературе. Испред основног текста дисертације налази се Сажетак дисертације на српском и енглеском језику са кључним речима и Садржај докторске дисертације.

Докторска дисертација садржи седам основних поглавља: 1. Увод (стр. 1–3), 2. Значај, циљ и основне хипотезе истраживања (стр. 4–7), 3. Преглед литературе (стр. 8 – 13), 4. Материјал и метод рада (стр. 14-27), 5. Резултати истраживања и дискусија (стр. 28- 163), 6. Закључак (стр. 164-168), 7. Литература (стр. 169-185), 8. Прилози (стр. 186 – 188), 9. Биографија (стр. 189).

Поглавља: Значај, циљ и основне хипотезе истраживања, Материјал и метода рада и Резултати истраживања и дискусија садрже више подпоглавља.

2. Приказ и анализа докторске дисертације

У поглављу „Увод“ докторске дисертације, кандидат Слађан Аџић, дипл.инж., приступа овој студији кроз општи преглед стања које се односи на истраживања процеса вернализације код купуса главичара (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.).

Кандидат на почетку увода даје објашњење о генетичкој дивергентности врсте *Brassica oleracea* L. која је разврстана на неколико варијетета. Ова врста има у диплоидном стању 18 хромозома ($2n = 18$), а садржи неколико варијетета који се могу међусобно укрштати. Економски најважнији варијетет је купус главичар *Brassica oleracea* var. *capitata* L. са своја два субваријетета: subvar. *alba* (без пигмента антоцијана) и subvar. *rubra* (са пигментом антоцијаном). Ради се о двогодишњој биљци.

У наставку увода описан је биохемијски потенцијал купусњача у сумпорним глукозинолатима и наведено је да имају широку и лековиту примену, односно да испољавају антиканцерогена, антибиотска, имунолошка и антиоксидативна деловања.

Када је реч о географском пореклу купусњача (центру диверзитетета) кандидат наводи Медитеран, Азију и простор око Балтичког мора, у коме се највероватније од дивље лиснате форме купуса развио главичасти купус. Ово порекло купуса одредило је услове који су у генетичком смислу неопходни да би купус започео цветање. Купус је двогодишња биљка која мора да прође кроз период деловања ниских температура да би започела цветање. Купус се може производити као конзумни (за главице) или као семенски (за семе). Код семенског купуса јако је битно одредити оптималну биолошку зрелост биљке која улази у период ниских температура на пољу, јер од тога зависи проценат презимљавања и проценат процветалих биљака. У нашим условима, селекционари имају озбиљних проблема да произведу семе купуса, те се оно доста увози. Постоји потреба да се унапреди процес добијања семена купуса, а са практичне стране то је могуће подешавањем времена сетве у зависности од сорте купуса, као и применом хормона цветања.

У Уводу дисертације извршена је подела представника фамилије *Brassicaceae* у зависности од модела (начина) на који се код њих може изазвати цветање. Први модел за изазивања појаве цветања је коришћењем услова за вернализацију (један од могућих путева цветања, тзв вернализациони пут), а који представља излагање биљке одговарајућим температурним условима. У сврху упознавања проблематике вернализационог пута на молекуларном нивоу коришћена је биљка *Arabidopsis thaliana* L., која је из исте фамилије као купус и прва је биљка са секвенцираним геномом у целости. На овој биљци су вршени први експерименти у циљу испитивања експресије гена цветања вернализационим путем. Други модел (начин) за изазивање цветања је истраживан на купусу главичару, а односи се на могућност експресије гена цветања без формирања главице као кључне етапе органогенезе у пољопривредном смислу. Формирање главице код купуса, која је неотпорна на зиму, а у циљу производње семена, је непожељна.

Код купусњача, наводи се у дисертацији, време цветања екотипова је условљено алелном варијацијом локуса, *Flowering locus C (FLC)* и *Frigida (FRI)*, када се жели изазвати ефекат цветања применом вернализације или вернализационог пута цветања. *FLC* је представљен као главни регулатор цветања на кога директно утичу светлост и температура. Регулација цветања заснована је на репресији или онемогућавању вегетативног меристема да се трансформише у репродуктивни и тиме омогући морфогенезу репродуктивних органа. Поред светлости и температуре, кандидат наводи користећи се литературним изворима, да је неопходно за купус главичар да се достигне и изванредан ниво вегетативног развоја да би биљка могла да „прође“ вернализациони пут цветања, за разлику од, на пример, карфиола који може да „вернализује“ и у стадијуму семена.

У Уводу се наводи да гиберелинска киселина (GA_3), као хормон цветања, може да индукује цветање чак иако биљка не пролази кроз хладан третман и да постоји и посебан пут цветања индукован ендогеним гиберелином – Гиберелински пут, па је у циљу истраживања могућег утицаја на производњу семена код испитиваних генотипова укључена и примена екзогеног гиберелина.

У поглављу „Значај, циљ и основне хипотезе истраживања“ кандидат, као есенцијални проблем производње семена купуса у континенталним условима наводи „биеналност“ или двогодишњи животни циклус врсте. Проучавање производње семена „из јаровизације“, односно коришћење вернализационог процеса цветања или регулације експресије гена цветања применом вернализације у практичном

(агрономском) смислу у *in vivo* условима на пољу, има велики значај за оплемењивање купуса и семенарство у смислу побољшања квалитета (клијавости семена) и квантитета (приноса семена).

Основни циљ истраживања јесте правилно сагледавање фактора који утичу на процес вернализације а то су пре свега абиотички – климатски услови. Селекционаре и семенаре купуса занима како сезона (година) утиче на експресију гена цветања и принос семена. Потребно је да се проучи какав утицај на принос и квалитет семена имају сезоне у којима се јавља позитивно одступање (повећане температуре у односу на вишегодишњи просек) или негативно одступање (смањене температуре у односу на вишегодишњи просек).

Кандидат је поставио хипотезу да ће реакција на спољне услове зависити од генотипа. У циљу истраживања утицаја генотипа на процес практичног регулисања експресије гена цветања одбрани су генотипови дивергентни по географском пореклу и дужини вегетационог периода (односи се на прву годину живота биљке). Са одабраним генотиповима, пре почетка трогодишњих пољских истраживања извршена су диалелна укрштања и добијено је хибридно потомство F_1 генерације.

Досадашња агрономска пракса није дала потпуни одговор о оптималној старости биљке, која ће ући у хладни период зиме, у циљу постизање најбољег ефекта у смислу најуспешнијег презимљавања и процента процветалих биљака. Кандидат је поставио хипотезу да се временом сетве купуса може регулисати старост биљке и њихова вегетативна маса. Истраживање ове проблематике спроведено је сејањем биљака у три сетвена рока (15. августа, 1. септембра и 15. септембра), тако да су биљке различите старости биле расађиване на пољу. Ове биљке су, дакле, са различитом вегетативном масом, пролазиле хладни период зиме и биле предмет анализе по бројним особинама особинама, а пре свега по приносу и квалитету семена.

Наука је потврдила синтезу ендеогеног гиберелина биљкама током развоја биљака и сазнала да он може да изврши индукцију цветања. Кандидат је поставио хипотезу да егзогени третман може да утиче на време појаве и интензитет цветања биљака купуса. У раду је спроведен егзогени третман гиберелином, два пута у току зиме, у циљу проучавања његових корисних и деструктивних ефеката, пре свега утицај на време цветања, принос семена и квалитет.

Кандидат такође заснива дисертацију на томе да је праћење квалитативног и квантитативног садржаја *FLC* транскрипта могуће уз промену *RT-PCR* методе. Ова метода преводи транскрипт који је по природи *m-RNA*, посебним ензимом реверзибилна транскриптаза, у дволанчани молекул *DNA* који је подесан за примену класичне ланчане реакције полимеразе - *PCR*. Класичном *PCR* методом утврђује се квалитативан садржај транскрипта (његово присуство), док *Real-Time* апаратуром одређује се његов квалитативан садржај (његова концентрација).

У поглављу „Преглед литературе“, кандидат наводи истраживања домаћих и страних аутора које се односе на изучавање генетичких основа процеса вернализације.

Квалитет семена по бројним ауторима представља квантитативну особину у коју је укључен велики број гена и њихових интеракција, а због високог комерцијалног лимита квалитета семена његова производња представља изазов како истраживачима тако и произвођачима семена. Време цветања, представљено је као квантитативна особина, а као модел за проучавање његовог варијабилитета наводи се *Arabidopsis thaliana* L. По наведеним ауторима, време цветања код представника рода *Brassica* је један од кључних показатеља диверзитетa рода и врсте (на нивоу генотипа). Изучавање времена цветања код рода *Brassica*, савремена је и актуелна тема. По многим ауторима, нарочито последњих година изучавано, најодговорнији локус за одређивање времена цветања је *FLC* локус, који делује као репресор на експресију гена цветања (*LFY*, *CAL*,

FUL, AP1, AP2, AP3, PI, AG) и не дозвољава, својим репресорним механизмом, трансформацију вегетативног меристема у репродуктивни меристем. У истраживањима код других аутора утврђено је да је висока концентрација *FLC* транскрипта код генотипа одговорна за касније цветање, а такође да је његова транскрипција смањена код генотипова који цветају и без периода ниских температура. Према актуелним, савременим научним изворима утврђено је и изоловано четири алела локуса *FLC* код врсте *Brassica oleracea* L.: *BoFLC1*, *BoFLC2*, *BoFLC3* и *BoFLC5*. Алел *BoFLC2* најзначајнији је за процес контроле цветања, док остали нису показали утицај на репресију цветања.

Да би се процес вернализације на генетичком и физиолошком нивоу манифестовао код биљака из рода *Brassica*, према ауторима, неопходно је излагање биљке у дужем временском року ниским позитивним температурама од 5°C у трајању од 8 недеља.

Према ауторима наведеним у овом поглављу гибберелинска киселина GA_3 јавља се у биљкама као одговор на хладну индукцију и утиче на промену величине меристемског региона у коме ћелије почињу процес деобе и трансформацију свог вегетативног карактера у зачетке репродуктивних примордија које ће се манифестовати на биљци при појави одговарајућих абиотичких (климатских) услова у смислу појаве репродуктивних органа. Произвођачима семена врло је значајно да се утврди могућност њене практичне примене. Интеракција егзогене GA_3 са факторима спољне средине, према бројним ауторима, утицала је на промену вредности код многих репродуктивних особина: жетвени индекс, број љуски по биљци, број семена по љусци као и на ранију појаву цветоносних стабала и првог цвета.

Корелативни односи међу особинама кључни су, према ауторима које наводи кандидат, за усмеравање процеса селекције као и за разумевање плејотропних или везаних гена. Изучавањем генотипских и фенотипских корелација код купусњача утврђене су сигнификантне корелативне везе између висине биљке и броја семена по љусци као и броја фертилних љуски са укупним бојем љуски по биљци.

Кандидат наводи и литературу која се односи на примену молекуларних метода, с обзиром да је неке од њих користио у овом раду за оцену експресије гена цветања код купуса. Навео је могућности традиционалне *PCR* методе у одређивању присуства транскрипта и *Real-Time* методе у одређивању концентрације транскрипта.

У поглављу „Материјал и метод рада”, кандидат Слађан Ацић је дао приказ одабраног генетичког материјала који је користио у истраживању. Ради се о три родитељска генотипа (*Scs*, *N*, *B*) купуса главичара који су дивергентни по географском пореклу и дужини трајања вегетативне фазе, а од којих је диалелним укрштањем добијено три F_1 хибрида: *Scs* x *N*, *Scs* x *B* и *B* x *N*. Први родитељски генотип *Scs* је селекционисан у Србији, у институту за повртарство у Смедеревској Паланци, други родитељ *N* је пореклом из европског дела Русије, а трећи родитељ *B* је пореклом из Семберије.

Оглед са 6 генотипова, који су посејани у три рока сетве (15. август, 1. септембар, 15. септембар), постављен је у 4 понављања, и то у две варијанте (третмана): са применом гибберелинске киселине GA_3 у концентрацији од 300 ppm-а и без примене GA_3 (контролна варијанта). Укупно је у огледу било испитивано 1440 биљака купуса. Оглед је извођен током три температурно различите сезоне: прва (2010/2011) – просечно хладна сезона, друга (2011/12) – хладна сезона и трећа (2012/13) – топла сезона.

На целокупном материјалу је извршена оцена морфолошких (фенолошких) карактеристика вегетативне фазе генотипова према *UPOV* дескриптору. Да би се проценили ефекти примењених фактора / третмана и могућности регулације експресије

цветања на принос семена и квалитет семена купуса, праћене су следеће особине биљака: презимљавање (%), степен јаровизације (%), маса биљке (*kg*), маса семена по биљци (*g*), број љуски по биљци, дужина љуски (*cm*), број семена по љусци, принос семена (*kg/ha*), концентрација укупних шећера након периода презимљавања (%), апсолутна маса семена (*g*), енергија клијавости (%), фертилноста полена (%) и особине морфогенезе репродуктивне фазе: време појаве првог цвета и време жетве.

Добијене вредности анализиране су статистички. Урађена је анализа варијансе (*ANOVA*) за четворофакторијелни оглед, групне разлике између извора варирања оцењене су применом *F*-теста, а индивидуалне између рокова сетве и третмана гиберелином применом *LSD* теста. Урађена је дескриптивна статистика кроз израчунавање средњих вредности (*M*) особина на годишњем нивоу и коефицијента варијације (*Cv*). Такође је у раду примењена корелациона анализа, израчунавањем простих коефицијената корелације (*r*), а у циљу испитивања корелационих веза између особина посебно за први, други и трећи рок сетве за све генотипове и све испитиване године (сезоне) у третману са гиберелином и у контролној варијанти. *AMMI* анализом (*Additive Main Effect and Multiplicative Interaction*) је утврђен степен адаптивности генотипова у зависности од сезоне гајења. На основу *AMMI* анализе закључено је који генотипови слично реагују у различитим условима и које средине имају сличан утицај на испитиване генотипове. Израчунат је проценат хетерозиса код *F*₁ хибрида за најзначајније особине у односу на средњу вредност бољег родитеља. Такође је утврђен и начин наслеђивања времена цветања код *F*₁ хибрида.

Кандидат је извршио изолацију *RNA* из биљног ткива као и њено квалитативно и квантитативно одређивање. За изоловање *RNA* из листова купуса, коришћен је “*GeneJET RNA Purification Kit*” (*ThermoScientific*), по упутству произвођача. Елуција *RNA* вршена је са 40 μ *l* *RNAse-free* воде и квалитет и концентрација су одређени спектрофотометријски (*NanoVue* спектрофотометар *GE Health care Life Sciences*). Уклањање *gDNA* из *RNA* изолата вршена је помоћу “*DNA-free DNase Treatment and Removal kit*” (*Ambion*, према упутству произвођача). За синтезу првог ланца *cDNA*, 1 μ *g* тоталне *RNA* је инкубиран са 0.2 μ *g* *Random hexamer primers* (*ThermoScientific*) 5 мин. на 65°C у финалној запремини од 12 μ *l*. Прајмери коришћени у *PCR* реакцијама су дизајнирани у програму *Primer3Plus* (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), на основу парцијалне *cDNA* секвенце *BoFLC2* из базе података (*Acc. No. DQ222850*) и гена за 26S рибозомалну *RNA*. Све *PCR* реакције су рађене у трипликату и са контролом која није задржавала матрицу. Акумулација *PCR* продуката је детектована у реалном времену и анализирана у оквиру *7500 System Software* (*Applied Biosystems*) у оквиру кога су одређене и ефикасности коришћених прајмера, као и стандардне грешке. Релативна експресија је приказана као 2^{-dCt}, *dCt* (*Thresholdcycle*) - разлика таргет гена (*BoFLC2*) и ендогене контроле (ген за 26S*RNA*).

У поглављу „**Резултати истраживања и дискусија**“ кандидат је на прегледан начин, кроз табеле и графиконе, приказао најбитније резултате до којих је дошао у својим истраживањима, а затим је дискутовао добијене резултате, односно коментарисао их и упоредио са постојећим сазнањима из праксе и резултатима других аутора. Ово поглавље подељено је на потпоглавља: 1) Дескрипција одабраног материјала (родитељских генотипова и *F*₁ хибрида) у вегетативној фази развоја по *UPOV*-у, 2) Средње вредности, варијабилност и хетерозис испитиваних особина, 3) Корелационе везе између особина, 4) Анализа интеракције генотипова и спољне средине за испитиване особине по *AMMI* моделу, 5) анализа експресије *BoFLC2* репресора цветања.

У првом подпоглављу „Дескрипција одабраног материјала“ кандидат је на основу *UPOV* дескриптора представио најзначајније морфолошке карактеристике генотипова и F_1 хибрида насталих диалелним укрштањем.

Изрчунао је и релативни и апсолутни хетерозис масе главице F_1 хибрида. Највиша вредност релативног хетерозиса (149%) израчуната је код F_1 хибрида $Scc \times N$.

У другом подпоглављу „Средње вредности, варијабилност и хетерозис особина“ кандидат је анализирао средње вредности, варијабилност и хетерозис испитиваних особина. Анализом варијансе утврдио је статистичку значајност (** $p < 0,01$) ефеката свих испитиваних фактора (година – сезона, генотип, рок сетве и третман гиберелином) на испитиване особине. Коришћењем *LSD* теста, кандидат је одредио статистички значајне разлике између родитељских и хибридних генотипова, као и између рокова сетве и третмана гиберелинском киселином у оквиру појединих генотипова.

Највиши проценат презимљавања (100%) утврђен је код хибрида $Scc \times N$ у топлој сезони (2012/13) у трећем року сетве. Утицај гиберелина се негативно одразио на проценат презимљавања код свих генотипова купуса, осим код хибрида $Scc \times B$, код кога је примена егзогеног гиберелина допринела повећању процента презимелих биљака у другом року сетве друге (2011/12) и треће (2012/13) сезоне.

Највећи проценат вернализације (82,5%) забележен је код хибрида $Scc \times B$. Процент вернализације код раног генотипа N имао је више вредности у свим сезонама у најкаснијем року сетве – 15. септембар. Процент вернализације код генотипа B имао је стабилне и високе вредности у раном року сетве (15. август) у температурно топлијим сезонама (2010/11 и 2012/13), док се у хладној сезони (2011/12) показао као нестабилан. Генотип Scc у првој и другој сезони (2010/11 / 2011/12) показао је статистички значајно веће вредности за проценат вернализације у другом року сетве у односу на остале рокове, док је у трећој, топлој, сезони (2012/13) имао значајно веће вредности процента вернализације (75%) у првом року сетве у односу на други и трећи рок сетве. Процент вернализације код хибрида $B \times N$, посматран кроз рокове сетве, показао је тенденције које су биле испољене код родитеља N у првој (2010/11) и трећој (2012/13) сезони, и код родитеља B у другој хладној сезони (2011/12). Процент вернализације код хибрида $Scc \times N$, поређен кроз рокове сетве *LSD* тестом, у првој (2010/11) и другој (2011/12) сезони имао је исте тенденције као код родитеља Scc . Третман гиберелином је смањивао вредност процента вернализације, осим у појединим случајевима: а) у првој сезони (2010/11) код генотипа Scc у трећем року сетве у односу на контролу на nižем нивоу значајности, б) код генотипа B у првој (2010/11) и трећој сезони (2012/13) у другом и трећем року сетве и в) код хибридне комбинације $B \times N$ у трећој сезони (2012/13) у првом року сетве.

У погледу варијабилности масе биљке, хибридне комбинације у већини година показују изванредан степен стабилности по роковима сетве, док родитељски генотипови показују (на основу *LSD* теста) статистички значајна одступања вредности ове особине у зависности од година и рокова сетве. Посматрано по свим сезонама и за све генотипове укупно највише је статистички значајних реакција на третман GA_3 било у другој сезони (2011/12) и то укупно 10, од којих је било три врло статистички значајних одступања у негативном смислу, тј. на смањење биомасе биљке у односу на контролу. Негативни ефекат гиберелина одразио се код хибридних комбинација $Scc \times B$, у трећем року сетве, као и код $Scc \times N$ у првом и трећем року сетве, друге сезоне (2011/12) огледа када су и временски услови били екстремно хладни.

Кандидат је анализом варијансе утврдио да за висину приноса семена није статистички значајна интеракција генотипа и рока сетве, нити третмана GA_3 и рока сетве, већ само године и рока сетве ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$). Кандидат је утврдио да је

висина приноса највише зависна од од рокова сетве, међутим ова зависност је специфична код различитих генотипова. Тако на пример генотип *Scs* је образовао највећи принос семена у другом року сетве, генотип *B* у првом року, а генотип *N* у трећем року сетве. Генотип *B* у другом року сетве хладне (2011/12) ни у једном понављању није успео да произведе семе. Највишу вредност релативног хетерозиса (*Hr*) у погледу приноса семана (189,27%) испољио је хибрид *Scs x B*.

Кандидат Слађан Ацић је упоређивао просечне вредности садржаја шећера у биљкама по роковима и утврдио да су највеће вредности биле у другом року сетве – средње раном (1. септембар), када су били и највиши просечни проценти презимљавања, те је констатовано да шећери имају врло важну улогу у заштити од измрзавања.

На основу анализе средњих вредности масе 1000 семена, констатовано је да у раним роковима сетве (15. август) су остварене највише вредности у највећем броју случајева (45%).

Клијавост семена је лимитирајући фактор тржишности, а минималне вредности клијавости су прописане законски. Није довољно имати висок принос семена купуса, ако је оно слабог квалитета, тј. нема високу клијавост. Зато клијавост семена поред оствареног приноса, представља најзначајнији моменат у семенској производњи. Кандидат наводи у дисертацији да је у првој сезони (просечно хладној – 2010/11) независно од генотипа и рока сетве обезбеђена одговарајућа тржишна клијавост семена од 75%. Друга година (2011/12) је била неповољна за презимљавање усева, али била је добар показатељ утицаја третмана гиберелинском киселином у циљу остваривања квалитета у погледу клијавости, што се нарочито одразило код хибридних биљака у ранијим роковима сетве. У трећој (топлој години – 2012/13) код родитељских биљака комерцијална клијавост је обезбеђивана у првом року сетве, док је утицај гиберелина обезбедио квалитет семена трећег рока сетве код касног родитеља *B*. Све хибридне комбинације, осим *B x N*, су у свим роковима треће године постигле комерцијални минимум клијавости док је поменути хибрид био само позитиван у трећем року сетве, а код њега је забележен и најмањи хетерозис.

Највиши просечен проценат фертилности полена кандидат је уочио је код генотипа *N* (63%), а најнижи код генотипа *B* (10%). Третман гиберелином је код свих генотипова снизио проценат фертилног полена осим код хибрида *B x N*, код кога је дошло до повећања вредности фертилности полена за 33%.

Морфогенеза репродуктивне фазе (појаву првог цвета и време сазревање семена) праћена је кроз два временска момента: 1) од почетка сетве и 2) од 1. јануара. Варијабилност времена појаве првог цвета била је статистички значајна посматрано кроз оба временска момента у свим сезонама истраживања и свим роковима сетве код свих генотипова. Третман гиберелином је скратио време до појаве првог цвета (број дана) код свих генотипова. Утврђен је и начин наслеђивања времена цветања код F_1 хибрида: код хибрида *Scs x N* и *B x N* ради се о интермедијарном наслеђивању, а код хибрида *Scs x B* ради се о доминацији *B* генотипа.

У трећем подпоглављу „Корелационе везе између особина“ кандидат је анализирао статистичку значајност корелационих коефицијената између особина, кроз рокове сетве за све сезоне и све генотипове, одвојивши третман гиберелином од контроле. Кандидат је утврдио статистички значајну корелативну приноса са: процентом презимелих биљака, процентом јаровизације у свим роковима сетве и у контроли и у третману, као и процента клијавости семена са приносом у трећем року сетве.

У четвртном подпоглављу „Анализа интеракције по АММИ моделу“ кандидат је АММИ анализом утврдио степен адаптивности генотипова у зависности од сезоне

гајења, рокова сетве и третмана гиберелином за најзначајније особине. Највишу стабилност на основу *ASV* вредности код процента презимљавња, процента јаровизације, приноса семена и времена цветања показао је F_1 хибрид $B \times N$. У погледу стабилности квалитета семена (клијавости) најстабилнији је био F_1 хибрид $Scc \times B$. Најнестабилнији генотип се показао F_1 хибрид $Scc \times N$ и то у три врло значајне особине: проценту презимљавања, клијавости семена и приносу семена. F_1 хибрид $Scc \times B$ био је најнестабилнији у времену цветања, док је генотип B био најнестабилнији у проценту јаровизације.

У петом подпоглављу „Анализа експресије *BoFLC2* репресора цветања“ кандидат је извршио анализу експресије *BoFLC* транскрипта. Утврђено је квалитативним *PCR*-ом на *cDNA* да су само пар прајмера за *BoFLC2* локус дали одговарајући транскрипт од 150 базних парова (бп), док прајмери за остале локусе: *BoFLC* 1, 3 и 5, нису синтетисали одговарајући умножак, чиме су се и потврдила истраживања других аутора о значају само *BoFLC2* локуса на време цветања. Касни генотип B има нижи ниво експресије у односу на N и Scc . Код хибрида касних родитеља ($B \times Scc$) ниво експресије *BoFLC2* је између нивоа експресије гена код родитеља, док код потомства раног родитеља N ($N \times B$ и $N \times Scc$), ниво експресије *BoFLC2* гена је виши него код родитеља. Овај патерн експресије се одржава и током и након вернализације. На основу *AMMI* биplot анализе, кандидат је утврдио да просечно време до почетка цветања за генотип B има мању вредност у односу на остале генотипове, као и да су генотипови Scc и N по својим вредностима за ову особину међусобно слични, а то је потврдила и анализа експресије овог гена. Кандидат закључује да је нижи ниво експресије *FLC* у корелацији са краћим временом цветања и обратно. Кандидат је потврдио тезу да се концентрација транскрипта локуса *BoFLC2* опада током периода презимљавања нарочито код генотипова који су са наших географских ширина (средња дужина дана) и то су генотипови Scc , B и њихов заједнички F_1 хибрид $Scc \times B$.

У поглављу „Закључак“ кандидат Слађан Аџић, дипл. инж. је у кратким цртама изнео најважније чињенице до којих је дошао у својим трогодишњим истраживањима. Сумирани су резултати и дискусија и указано је на значај који могу имати примењене процедуре у овом раду за унапређење пољопривредних научних дисциплина и семенарске пољопривредне праксе. Кандидат предлаже одређивање релативног нивоа *BoFLC* као маркер гена (молекуларни маркер) у циљу постизања подударачућег времена цветања које би се користило у производњи хибридног семена (слично време цветања код родитеља) и производњи семена у синтетичкој смеси (слично време цветања код свих генотипова посејаних у циљу добијања нове гермплазме). Резултати ове дисертације заправо помажу агрономима и оплемењивачима биља при одабиру и селекцији материјала у циљу превазилажења баријера економичности семенске производње купуса као и одабиру материјала за селекцију који ће на генетичком нивоу отклонити основне недостатке у производњи семена.

Поглавље „Литература“ садржи 186 ауторских референци које су коришћене приликом писања докторске дисертације. Све референце су наведене у основном тексту рада. Сложене су по абecedном реду и написане правилно, у складу са прихваћеним стандардима за навођење литературе.

3. Закључак и предлог

Докторска дисертација Слађана Аџића, дипл. инж. под насловом: „Регулација експресије гена цветања применом вернализације код купуса (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)“ представља оригиналан научни рад из области пољопривредних

(агрономских) наука, модул ратарство и повртарство. У ужем смислу кандидат се бавио истраживањима из генетике, оплемењивања биља и семенарства.

Истраживања у овој докторској дисертацији обављена су у потпуности према плану и програму рада предвиђеним у Пријави дисертације кандидата.

За предмет истраживања узет је процес вернализације и активација процеса цветања код купуса главичара без формирања главице (вернализациони пут цветања) у циљу економичне производње семена. Ово је битно за продају семена домаћих сорти и хибрида купуса, односно за производњу довољне количине семена доброг квалитета.

У дисертацији су као почетни материјал за рад одабрана три родитељска генотипа (два из поднебља средње дугог дана и један са поднебља дугог дана) и са њима су извршена диалелна укрштања. На тај начин су добијена три хибрида, па су огледи постављени са укупно 6 генотипова (3+3).

Кандидат је поставио трогодишње пољске огледе са одабраним материјалом на огледним парцелама Института за повртарство д.о.о., из Смедеревске Паланке, током којих је пратио следеће особине биљака: проценат презимљавања биљака, проценат јаровизације, маса биљке, маса семена по биљци, број љуски по биљци, дужина љуски, број семена по љусци, принос семена, концентрација укупних шећера након периода презимљавања, апсолутна маса семена, енергија клијавости, фертилноост полена, морфогенеза репродуктивне фазе (време појаве првог цвета и време жетве).

Кандидат је одредио средње вредности праћених особина сваког генотипа, по свим роковима сетве, при контроли и при третману гиберелином, у свакој сезони истраживања, њихову варијабилност (Cv) и значајност разлика на основу LSD теста. Кандидат је применио и бројне статистичке (биометријске) методе које су му омогућиле да одреди утицај испитиваних фактора на особине ($ANOVA$), корелацију особина, хетерозис најзначајнијих особина, као и начин наслеђивања времена цветања код F_1 хибрида. Одредио је најадаптибилније генотипове и хибридне комбинације, на основу ASV коефицијената, примењујући $AMMI$ анализу.

Кандидат је извршио анализу експресије гена репресора цветања изолацијом RNA из биљног ткива, применивши одговарајуће прајмере за транскрипт и поступак $RT-PCR$ и $Real Time$. Кандидат је утврдио ниво експресије локуса у три пресека. На основу резултата, кандидат је констатовао да је нижи ниво експресије FLC у корелацији са краћим временом цветања и обратно. Предложио је конкретне мере за унапређење производње семена купуса, као и то да се у семенској производњи врши одређивање релативног нивоа $BoFLC$ као маркер гена (молекуларни маркер).

Резултати добијени у овој дисертацији имају осим теоријског и практичан значај у оплемењивању и гајењу купуса главичара са претпоставком да се истраживање може умногоме применити и на уљаној репици. На основу добијених резултата могуће је унапредити процес оплемењивања, селекције у циљу стабилизације семенске производње купуса главичара.

Резултати у дисертацији Слађана Ацића су приказани јасно, уз бројне слике, табеле и графиконе и исправно су тумачени и анализирани, коришћењем јасног и концизног језика, кроз поређења са резултатима истраживања других аутора. Посебно треба истаћи да резултати до којих је кандидат дошао у својим истраживањима представљају оригинална решења и драгоцену искуство за даље проучавање производње семена купуса главичара коришћењем процеса вернализације. Кандидат је својом темом показао да је изучавање регулације експресије гена цветања могућ и у практичном, агрономском смислу на отвореном пољу *in vivo* а не само лабораторијским строго контролисаним у словима у коме је регулација експресије гена сведена на многе константе.

Узимајући у обзир све наведено, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Слађана Ацића, дипл. инж., под насловом: „**Регулација експресије гена цветања применом вернализације код купуса (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)**“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета и Београду да ову оцену усвоји, чиме би се пружила могућност кандидату да приступи јавној одбрани ове докторске дисертације.

У Београду,
12. 09. 2014. године

Чланови Комисије:

Др Славен Продановић, редовни професор,
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
(Опемењивање биљака)

Др Јасмина Здравковић, научни саветник
Институт за повртарство, Смедеревска Паланка
(Генетика и опемењивање биљака)

Др Вера Ракоњац, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(Генетика биљака)

Др Томислав Живановић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(Генетика биљака)

Др Мира Милисављевић, научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за молекуларну
генетику и генетичко инжењерство
(Молекуларна генетика)

Прилог: Рад кандидата објављен у часопису који је на SCI листи:

Pavlović S., **Adžić S.**, Cvikić D., Zdravković J., Zdravković M., (2012): In vitro culture as a part of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. breeding. Genetika, Vol. 44 No. 3, pp. 611–618.