

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

Датум: 06.03.2016.

Предмет: Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације Николе Грчића

Одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Пољопривредног факултета од 24. 02. 2016 године, именована је Комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације Николе Грчића, истраживача сарадника у Институту за кукуруз “Земун Поље” под насловом: “Генетичка анализа наслеђивања квантитативних особина кукуруза применом метода диалела и генерацијских просека”. Комисија у саставу: др Гордана Шурлан Момировић, редовни професор у пензији Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Славен Продановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Ненад Делић, виши научни сарадник Института за кукуруз „Земун Поље“, Др Миле Сечански, научни сарадник Института за кукуруз “Земун Поље“ и Др Јован Павлов, научни сарадник Института за кукуруз “Земун Поље“, прегледала је и оценила докторску дисертацију и подноси Већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Николе Грчића написана је на 133 стране куцаног текста и садржи 59 табеле и 4 слике. У дисертацији је цитирано 156 извора литературе.

Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику; Информације о ментору и члановима комисије; Захвалницу; Резиме на српском и енглеском језику; Садржај; Текст по поглављима: Увод (стр. 1 - 3), Циљ истраживања (стр. 4), Преглед литературе (стр. 5 - 26), Радна хипотеза (стр. 27), Материјал и метод рада (стр. 28 – 46), Резултати и дискусија (стр. 47 – 113), Закључак (стр. 114 - 116) и Литература (117 - 133), Биографију аутора; Изјаву о ауторству; Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

2. Приказ и анализа докторске дисертације

У поглављу **Увод** кандидат Никола Грчић указује на брз пут кукуруза од првобитне интродукције на неко подручје до његовог сврставања у економски најзначајније гајене културе тог подручја. У докторској дисертацији је представљен историјски осврт оплемењивања кукуруза методом масовне селекције којим су добијене бројне локалне популације прилагођене за гајење на одређеном подручју. Кандидат указује на чињеницу да је услед непознавања научне основе механизма наслеђивања важних агрономских особина кукуруза, поступак масовне селекције имао ограничен успех у добијању супериорних генотипова кукуруза и то пре свега у случају особина под контролом адитивних гена. Коначно, кандидат истиче да једино мултидисциплинарни приступ може дати жељени резултат у производњи супериорних генотипова кукуруза.

У поглављу **Циљ истраживања** кандидат наводи да је основни циљ да се примене различити биометријски модели у циљу анализе наслеђивања квалитативних особина кукуруза и да се изврши евалуација ЗП инбред линија кукуруза. Специфични циљеви истраживања су одређивање општих комбинационих способности (ОКС) испитиваних инбред линија и посебних комбинационих способности (ПКС) њиховог F_1 потомства и утврђивање компонената генетичке варијансе важних агрономских особина кукуруза. Такође је циљ да се у анализи просека шест генерација применити адитивно-доминантни модел и потом тестира његова адекватност како би се утврдило присуство епистатичног ефекта у наслеђивању одређених особина кукуруза. Један од циљева је да се применом молекуларних маркера испита генетичка варијабилност и упоредити са фенотипском варијабилношћу агрономских особина.

У поглављу **Преглед литературе** Никола Грчић цитира различите литературне изворе који су релевантни и значајни за област истраживања у овој дисертацији. Указује се на значај кукуруза у исхрани домаћих животиња и људи и његов значај као сировине за идустријску прераду. Приказани су релевантни подаци о производњи кукуруза у свету и нашој земљи. Приказан је значај открића хетерозиса и начина наслеђивања квантитативних особина за производњу супериорних генотипова кукуруза и начин на који су та научна сазнања практично примењена у оплемењивању кукуруза. Такође је представљен опис концепта општих и посебних комбинационих способности кукуруза, њиховог значаја и примене у оплемењивању кукуруза. Изабрани научни радови указују да је већина битних агрономских особина кукуруза под утицајем полигена, са малим доприносом појединачних гена и да је велики утицај еколошких услова на фенотипску експресију тих особина. Наслеђивање и експресија особина кукуруза зависи како од експресије појединачних гена тако и од могуће интеракције алела истог локуса, али и алела на различитим локусима (епистазе). Посебан акценат у овом поглављу стављен је на опис методе генерацијских просека који се користи за утврђивање генских ефеката и заснива се на поређењу просечних вредности посматраних особина различитих генерација насталих од родитељског пара инбред линија P_1 и P_2 . За испитивање најједноставнијег случаја, двогенске епистазе, потребно је испитати најмање шест генерација једног хибрида: P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , BC_1 и BC_2 . Наводе се предности и недостаци овог биометријског метода у односу на остале. Коначно, наводи се и могућност примене молекуларних метода у истраживањима генских ефеката.

У поглављу **Радна хипотеза** кандидат наводи да се претпоставља да постоје разлике у вредностима општих и посебних комбинационих способности код испитиваних инбред линија. Очекује се најинтезивније испољавање хетерозиса код F_1 комбинација добијеним укрштањем генетички најудаљенијих инбред линија што ће се доказати применом одговарајућих молекуларних маркера. Такође се очекује да ће анализа генетичке варијансе доказати да доминантни гени имају значајнију улогу у односу на адитивне у наслеђивању већине испитиваних агрономских особина кукуруза. Очекује се да ће анализа просека генерација проценити адекватност адитивно-доминантног модела за испитиване квалитативне особине и указати на постојање епистазе.

На почетку поглавља **Материјал и метод истраживања** кандидат наводи да је за диалелну анализу изабрано шест елитних инбред линија (ЗПЛ1, ЗПЛ2, ЗПЛ3, ЗПЛ4, ЗПЛ5 и ЗПЛ6) кукуруза које су међусобно укрштене према методу диалелних укрштања без реципрочних комбинација чиме је добијено 15 хибридни комбинација. Од тих хибрида су одабрана три са

једном заједничком родитељском компонентом за анализу просека генерација при чему је умножено шест различитих генерација потребних за испитивање двогенске епистазе. Оглед је био постављен на три локације: Земун Поље, Панчево и Бечеј у трајању од две године (2011. и 2012.) Проучене су следеће особине: принос зрна по хектару (t/ha), принос зрна по биљци (g), висина биљке (cm), висина клипа (cm), укупан број листова, број листова изнад клипа, дужина клипа (cm), број редова зрна и број зрна у реду.

У овом поглављу дат је опис примењених биометријских поступака за анализу комбинационих способности (*Griffing*, 1956. Метод 2, математички модел I, без реципрочних укрштања), компонената генетичке варијансе и генских ефеката у анализи просека генерација (*Haymann*, 1954). Коришћен је однос ОКС/ПКС да пружи информацију о значају адитивног, односно неадитивног деловања гена у наслеђивању испитиваних особина. Пошто се анализа просека генерације у овој дисертацији ограничава на случајеве двогенске епистазе, било је неопходно умножити шест различитих генерација: родитељске P_1 и P_2 , F_1 генерацију, две генерације повратног укрштања BC_1 и BC_2 и F_2 генерацију (*Mather* и *Jinks*, 1971, 1982). Кандидат је за сваку особину приказао вредности генских ефеката: просека (m), адитивности (d) и доминације (h), а у оквиру њега и резултате појединачних *scalling* тестова A , B и C , којима се тестира адекватност адитивно-доминатног модела. У случају одбацивања адитивно-доминатног модела постављен је интеракцијски модел који осим основних генских ефеката приказује и ефекте двогенске епистазе као резултат интералелне интеракције: адитивни x адитивни (i), адитивни x доминатни (j) и доминатни x доминатни (l).

Од молекуларних анализа урађени су *SSR* маркери за утврђивање сродности и варијабилности експерименталног материјала. За обраду ових резултата коришћен је *NTSYS pc 2.1* статистички програмски пакет. Геномска ДНК је изолована из семена а екстракција ДНК је урађена према протоколу *Rogers* и *Bendich* (1988). Маркер анализа је урађена по методи *Edwards* и *cap*. (1991) коришћењем 21 пара *SSR* прајмера. Информације о позицији на хромозому (*bin*), дужини поновака и секвенцама преузете су из базе података, *Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB)*. Статистички програм *PowerMarker v.3,25* (*Liu* и *Muse*, 2005) употребљен је за израчунавање броја алела, очекиване хетерозиготности и вредности *PIC*-а за сваки *SSR* маркер на основу података о величини умножених секвенци.

У поглављу **Резултати и дискусија** кандидат је представио резултате свог истраживања које је поткрепио доступним литературним подацима других аутора који су истраживали исту или сличну тематику и приказани у пет потпоглавља.

У потпоглављу *Диалелне анализе кукуруза*, кандидат приказује средње вредности испитиваних линија и хибрида из диалелне анализе за испитиване агрономске особине по локацијама и годинама испитивања. Приказани су резултати трофакторијалне анализе варијансе са вредностима значајности разлика сваког појединачног фактора (генотипа, локације и године) и њихових интеракција на варирање испитиваних особина. Добијени резултати *ANOVA*-е указују на значајност свих фактора на испитиване особине, са изузетком броја редова зрна на чије варирање локација није имала утицај у другој години испитивања. Разлике између појединачних третмана су утврђене помоћу теста најмање значајне разлике (*lsd*), а генотипови између којих нема значајне разлике су обележени истим словом.

Прегледом средњих вредности приноса зрна потврђују се резултати анализе варијансе који су потврдили значајан утицај фактора на ову испитивану особину. У неповољној и сушној 2012. години принос зрна је био у просеку нижи у односу на перформансу истог генотипа у 2011. години. Најприноснија линија на свим локацијама, осим у Земун Пољу у 2012. години, била је ЗПЛ6 са просечним приносом на свим локацијама од 4,448 *t/ha* и максималним од 7,369 *t/ha* у Бечеју у 2011. години. Једино у Земун Пољу у 2012. години је ЗПЛ1 била најприноснија линија са 2,696 *t/ha*. ЗПЛ1 се показала најтолерантнијом на сушом јер је просечно имала најмање процента смањена приноса у 2012, у односу на 2011. годину.

Као најприноснији хибриди истакли су се ЗПЛ4 x ЗПЛ6, ЗПЛ1 x ЗПЛ5 и ЗПЛ2 x ЗПЛ6. Њихови просечни приноси били су врло уједначени и износили су 9,660 *t/ha*, 9,659 *t/ha* и 9,652 *t/ha*. Посматрано по локацијама, највише приносе имао је хибрид ЗПЛ2 x ЗПЛ6: 15,376 *t/ha* у Бечеју у 2012. и 12,149 *t/ha* у Панчеву исте 2011. године. С друге стране у сушној 2012. години највише приносе остварио је хибрид ЗПЛ3 x ЗПЛ5 на две локације: Панчево и Бечеј и ти приноси су износили 8,685 *t/ha* и 8,785 *t/ha*.

У потпоглављу **Комбинационе способности самооплодних линија кукуруза** израчунате су ОКС и ПКС за сваку годину испитивања понаособ на основу просека средњих вредности локација за сваки генотип. Анализа варијансе је потврдила високо значајне вредности ОКС и ПКС за сваку од осам испитиваних особина у обе године испитивања. Однос ОКС/ПКС био је нижи од јединице за принос зрна (0,09 у 2011. години и 0,14 у 2012. години), висину биљке (0,47 у 2011. години и 0,56 у 2012. години) и висину горњег клипа (0,44 у 2011. години и 0,56 у 2012. години), указују на преовлађујући утицај гена са неадитивним деловањем на наслеђивање ових особина, док је за остале испитиване особине, однос ОКС/ПКС био значајно виши од јединице, а нарочито број редова зрна (32,27 у 2011. години и 4,97 у 2012. години) што показује да је њихово наслеђивање под контролом адитивних гена.

Кандидат је приказао вредности ОКС за сваку линију посебно чиме се илуструје њихов допринос у потомству за испитиване особине. Линије ЗПЛ5 и ЗПЛ6 су се у обе године показале као добри општи комбинатори за висину биљке, дужину клипа. С друге стране ЗПЛ2, ЗПЛ3 и ЗПЛ4 су добри комбинатори за број редова зрна. Приказане су и вредности ПКС за хибридне комбинације. Кандидат је доказао да се високе позитивне вредности ПКС могу добити и у хибридној комбинацији у којој учествује линија са негативном вредношћу ОКС за испитивану особину, и обрнуто. Овај закључак је у сагласности са резултатима других истраживача.

У потпоглављу **Анализа генетичке варијансе кукуруза**, кандидат приказује резултате анализе генетичке варијансе по методи *Hayman* (1954) и *Jinks* (1954) које пореди са резултатима других аутора. Параметри анализе генетичке варијансе су приказани за сваку годину истраживања посебно, а приказане су и вредности херитабилности за испитиване особине. Доминантне компоненте генетичке варијансе ($H1$ и $H2$) су у обе године испитивања биле вишеструко виших вредности од адитивне (D) за све испитиване особине, осим броја редова зрна у обе године и броја листова изнад клипа у другој години испитивања, што указује на преовлађујући утицај гена са доминантним и епистатичним ефектом у наслеђивању тих особина. Просечан степен доминације ($\sqrt{H1/D}$) је за већину особина био изнад јединице указујући на супердоминацију. За све испитиване особине осим броја редова зрна су добијене ниске вредности херитабилности у ужем смислу и кретале су се од 0,051 за принос зрна до 0,981 за број редова

зрна током 2011. године и од 0,178 за принос зрна до 0,684 за број листова изнад горњег клипа током 2012. године.

Потпоглавље *Анализа просека генерација кукуруза* је посвећено анализи генерацијских просека. Кандидат прво приказује средње вредности испитиване особине за сваки хибрид по генерацији, локацији и години. Средње вредности приноса зрна различитих испитиваних генерација у две године и на три локације су показале да су високе температуре и суша у 2012. години утицале на смањење приноса зрна за 45 до 55% у просеку. Хибрид *H1* (ЗПЛ 2 x ЗПЛ6) је био најприноснији у обе године са максималним приносом од 238,38 g по биљци у Бечеју 2011. године и 132,01 g по биљци на истој локацији у 2012. години. Посматрајући испитиване генерације, најмање родне биле су родитељске генерације P_1 и P_2 које су генетички чисте инбред линије, а по висини приноса следи F_2 генерација, затим и генерације повратних укрштања хибрида са родитељима BC_1 и BC_2 између којих није било значајних разлика. Очекивано, најприносније је било F_1 потомство са максималним вредностима испољеног хетерозиса. Посматрајући локације, просечно највиши приноси зрна у обе године испитивања остварени су на локацији Бечеј, док између локација Земун Поље и Панчево није било већих разлика.

Високо значајне вредности епистазе како комплементарног, тако и дупликатног типа су утврђене за највећи број особина, а међу њима и за принос зрна. Адитивно-доминатни модел се показао као адекватан за особину број редова зрна што је у сагласности са резултатима других аутора.

Потпоглавље *Генетичка дивергентност самооплодних линија кукуруза* кандидат посвећује резултатима генетичке анализе методом *SSR* маркера самооплодних линија коришћених у диалелној анализи. Генетички полиморфизан шест испитиваних линија је утврђен применом *SSR* маркера. Коришћено је 21 *SSR* маркера који су идентификовали укупно 92 алела. У просеку су била 4,38 алела по маркеру, од тога 87 полиморфних алела, односно 4,14 по маркеру.

Резултати испитивања генетичке дистанце (ГД) самооплодних линија кукурузасу показали да је највећа сродност између линија ЗПЛ2 и ЗПЛ 3 које су гентички најмање удаљене и имају вредност дистанце од 0,11. Такав резултат је у сагласности са пореклом те две линије. Линија ЗПЛ3 је изведена од линије ЗПЛ2 и са њом дели велики проценат гермплазме. Линије ЗПЛ2 и ЗПЛ3 показују сродност и са трећом линијом ЗПЛ 4 која припада *BSSS* хетеротичној групи, а њихова ГД износи 0,256 у случају ЗПЛ2, односно 0,220 у случају линије ЗПЛ3. Мала вредност ГД (0,354) је утврђена и између две линије у испитивању које припадају *Lancaster* хетеротичној групи: ЗПЛ5 и ЗПЛ6. ЗПЛ1 је просечно била најудаљенија од свих осталих линија, а посебно линија *Lancaster* групе ЗПЛ5 и ЗПЛ 6.

У поглављу **Закључак**, кандидат износи у сажетом и прегледном облику најважније закључке до којих је дошао на основу резултата свог истраживања. Кандидат наводи да су сви фактори у огледу утицали значајно на варирање испитиваних особина, а посебно фактор година која је утицала да приноси у неповољнијој 2012. години за производњу кукуруза буду и до 50% нижи од оних у првој години испитивања.

Приказ општих и посебних комбинационих способности за испитиване особине кукуруза су добијене проценом о деловању гена за те особине. Принос зрна, висина биљке и висина горњег клипа су према тим резултатима били под контролом гена са неадитивним деловањем, док су укупан и број листова изнад горњег клипа, дужина клипа, број редова зрна и зрна у реду под

контролом адитивних гена. Линија ЗПЛ6 имала високо значајне ОКС вредности за већину испитиваних особина у обе године испитивања и може се користити као донор пожељних алела у програмима селекције, посебно што вредности ОКС за непожељну висину клипа код ове линије нису значајне.

ЗПЛ1 се наводи као најбољи општи комбинатор за принос зрна у сушној 2012. години иако су њене вредности ОКС за исту особину у 2011. години биле без значајности. С тим у вези, може се оценити да је ЗПЛ1 носилац гена за толеранцију на сушу. Иако су линије ЗПЛ2 и посебно ЗПЛ3 имале значајне и негативне вредности за највећи број испитиваних особина у обе године, кандидат указује на то да су њихови хибриди са ЗПЛ5 и ЗПЛ6 показали високе вредности ПКС за те исте особине. Кандидат истиче да то доказује да је у укрштању једног родитеља са високим и другог са ниским вредностима ОКС могуће и даље добити супериорно потомство.

Анализом просека генерације кандидат је утврдио неадекватност адитивно-доминатног модела генских ефеката за већину испитиваних особина и тиме доказао постојање епистазе за те особине. Ниже вредности дупликатне епистазе између доминатних гена (*l*) и постојање епистазе комплементарног типа између адитивних гена (*i*) су разлог због којег је хибрид *H1* приноснији у односу на друга два испитивана хибрида.

Карактеризацијом на нивоу ДНК применом *SSR* маркера добијени су резултат који су у сагласности са пореклом испитиваних линија. Раздвојене су линије *Lancaster* хетеротичне припадности од осталих линија из *BSSS* и независне хетеротичне групе у два главна различита субкластера. Подаци о генетичкој сродности испитиваних линија били су поуздани показатељ у предикцији хетерозиса и перформанси хибрида насталих њиховим укрштањем.

У поглављу **Литература** наведен је списак од 156 референци које су у докторској дисертацији коришћене као основ за примењене методе истраживања и за поређење добијених резултата са другим истраживањима. Референце су сложене по абecedном реду и написане правилно, у складу са прихваћеним стандардима за навођење.

3. Закључак и предлог

Докторска дисертација дипл. инг. Николе Грчић под насловом „Генетичка анализа наслеђивања квантитативних особина кукуруза применом метода диалела и генерацијских просека“ представља оригинални, самостални научни рад из агрономских наука, област: ратарство, ужа област генетика и оплемењивање биљака.

Дисертација је написана у складу са пријавом. Циљ дисертације је била са једне стране примена различитих биометријских модела у циљу утврђивања начина наслеђивања важних агрономских особина кукуруза, а са друге евалуација инбред линија кукуруза у диалелној анализи на комбинационе способности и поређење тако добијених података са резултатима примене генетичких маркера.

Упоредна процена начина наслеђивања важних особина кукуруза помоћу биометријских метода диалелне анализе, анализе генетичке варијансе и методе генерацијских просека пружила је релевантан увид у могућности оплемењивања кукуруза. Анализа генерацијских просека је приказала природу наслеђивања испитиваних квантитативних особина, укључујући процену основних генских ефеката и ефеката епистазе.

Диалелном методом утврђене су вредности комбинационих способности за испитиване особине чиме су добијене информације о доприносу и употребљивости сваке од испитиване ЗП

линије у програмима оплемењивања кукуруза. Посебна вредност ове дисертације јесте што је кандидат осим већ поменутих класичних пољских, применио и савремене лабораториске молекуларне методе, односно анализирао испитиване генотипове и применом *SSR* маркера. Генетичка дистанца процењена на основу молекуларних маркера је омогућила да се предвиди успех и оцене перформансе испитиваних хибридних комбинација.

На основу свега наведеног, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију дипл. инг. Николе Грчић под насловом „Генетичка анализа наслеђивања квантитативних особина кукуруза применом метода диалела и генерацијских просека“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета да усвоји ову позитивни оцену и омогући кандидату јавну одбрану.

Чланови Комисије:

Др Гордана Шурлан Момировић, редовни професор у пензији Пољопривредног факултет у Београду (ужа научна област генетика)

Др Славен Продановић, редовни професор Пољопривредног факултета у Београду (ужа научна област оплемењивање биљака)

Др Ненад Делић, виши научни сарадник Института за кукуруз “Земун Поље” (ужа научна област оплемењивање биљака)

Др Миле Сечански, научни сарадник Института за кукуруз “Земун Поље“ (ужа научна област оплемењивање биљака)

Др Јован Павлов, научни сарадник Институт аза кукуруз “Земун Поље“ (ужа научна област оплемењивање биљака)

Рад објављен SCI на листи:

Jelena Vancetovic, Dragana Ignjatovic-Micic, Sofija Bozinovic, Milosav Babic, Milomir Filipovic, Nikola Grcic and Violeta Andjelkovic (2014): Grain quality of drought tolerant accessions within the MRI Zemun Polje maize germplasm collection, Spanish Journal of Agricultural Research, Vol. 12 Num 1,186-194p