

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

Предмет: Оцена урађене докторске дисертације Душана Николића, дипл. инжењера

Одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Пољопривредног факултета бр. 33/6-7.5. од 27.03.2018. именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације дипл. инж. Душана Николића, истраживача сарадника Универзитета у Београду-Пољопривредног факултета, под насловом: „**Диверзитет и карактеризација вируса парадајза у Србији**“. Комисија у саставу др Бранка Крстић, редовни професор, др Ивана Станковић, ванредни професор, др Горан Делибашић, редовни професор, др Ђорђе Моравчевић, ванредни професор и др Данијела Ристић, научни сарадник Института за заштиту биља и животну средину, на основу прегледа докторске дисертације, подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Душана Николића, дипл. инж., написана је на 175 страна текста и укључује 20 табела, 7 графикана и 32 оригиналне фотографије. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи 8 основних поглавља, и то: Увод (стр. 1-3), Преглед литературе (стр. 4-46), Циљеви истраживања (стр. 47-48), Материјал и методе (стр. 49-66), Резултати (стр. 67-113), Дискусија (стр. 114-136), Закључци (стр. 137-139) и Литература (стр. 140-170). На крају текста дисертације налази се Биографија кандидата (стр. 171-172). Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводу је указано на површине, приносе и привредни значај гајења парадајза у свету и нашој земљи, као и значај проучавања болести изазваних фитопатогеним вирусима. Фитопатогени вируси представљају групу патогена који сваке године односе део рода парадајза, а често проузрокују и значајне економске штете. Међутим, иако подаци у свету, указују на чињеницу да вируси изазивају бројна и веома деструктивна обољења парадајза, мало је података о њиховој појави и раширености, као и генетичкој структури популације вируса парадајза присутних у Србији. Указано је на потребу свеобухватнијег проучавања и сагледавања утицаја вируса у производњи ове економски веома значајне културе у нашој земљи у циљу унапређења мера контроле обољења које изазивају.

Преглед литературе. У *Прегледу литературе*, које има шест потпоглавља, изнети су доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. Прво потпоглавље *Парадајз као гајена биљка* описује порекло, назив и поделу парадајза, основне морфолошке карактеристике, гајење, употребу, као значај и перспективе гајења и коришћења парадајза у свету и код нас. У оквиру другог

потпоглавља, *Болести и штеточине парадајза*, наведени су најштетнији и економски најзначајнији проузроковачи болести и штеточине парадајза. У потпоглављу *Вируси парадајза и њихов значај* наведени су економски најзначајнији вируси парадајза као и њихов значај. У потпоглављу *Проучавање вирусних обољења парадајза у свету* наведени су подаци о бројности и распрострањености вируса парадајза у свету, као и економске штете које они проузрокују у производњи парадајза широм света. У потпоглављу *Проучавање вирусних обољења парадајза у Србији* наведени су литературни подаци о проучености вируса у нашој земљи. У шестом потпоглављу *Основне карактеристике најзначајнијих вируса парадајза* обрађени су литературни подаци који се односе на таксономско место, домаћине, распрострањеност, економски значај, особине и организацију генома, варијабилност, симптоматологију, начине преношења и одржавања и основне мере контроле обољења које изазивају вирус мозаика краставца (*Cucumber mosaic virus, CMV*), Y вирус кромпира (*Potato virus Y, PVY*), вирус бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt orthotospovirus, TSWV*), вирус мозаика луцерке (*Alfalfa mosaic virus, AMV*), вирус мозаика дувана (*Tobacco mosaic virus, TMV*) и вирус мозаика парадајза (*Tomato mosaic virus, ToMV*).

Циљеви истраживања. Како су вируси значајни, а недовољно проучени патогени парадајза у Србији, основни циљеви ове докторске дисертације обухватили су: утврђивање присуства и распрострањености економски значајних вируса парадајза за нашу земљу, али и вируса парадајза који су присутни у земљама у окружењу од којих се неки налазе на карантинским листама штетних организама Србије, као и утврђивање присуства неких вируса инфективних за парадајз за које је утврђено да су присутни на другим гајеним биљкама домаћинима и који су у експанзији у нашој земљи применом DAS-ELISA теста. Циљ ове дисертације је био и утврђивање присуства CMV satRNA као могућег проузроковача леталне некрозе и наглог пропадања биљака парадајза, затим утврђивање присуства вируса у семену различитих сорти и хибрида парадајза комерцијално доступних на нашем тржишту, молекуларна детекција и идентификација присутних вируса парадајза применом RT-PCR методе, као и молекуларна карактеризација реконструкцијом филогенетских стабала најраспрострањенијих вируса парадајза у Србији у циљу поређења изолата пореклом из Србије са одговарајућим изолатима вируса из других делова света и утврђивања генетичке варијабилности изолата пореклом из наше земље.

Детаљна испитивања присутних вируса парадајза код нас, као и примена најсавременијих молекуларних техника имала су за циљ да унапреде методе детекције и идентификације и допринесу инвентаризацији вируса парадајза у Србији и разумевању њиховог порекла и еволутивне повезаности са другим изолатима широм света, као и могућем ширењу у нашој земљи. Добијени подаци о вирусима парадајза, нарочито информације о структури популације превалентних врста, имају огроман значај у оплемењивачком раду на селекцији генотипова са повишеним нивоом отпорности, а све у циљу развијања правилних стратегија контроле и спровођења адекватних мера сузбијања.

Материјал и методе рада. У пет потпоглавља обухваћене су методе примењене за испитивања спроведена у пољу и лабораторији.

Као почетни материјал коришћене су биљке парадајза гајене како на отвореном пољу, тако и у заштићеном простору, са симптомима који су указивали на присуство вируса. Узорци биљака су прикупљени у периоду од 2011. до 2015. године. Прегледано је 136 локалитета из 22 административна округа Србије (потпоглавље *Преглед терена и сакупљање узорака оболелих биљака*). Детекција присуства вируса у сакупљеним узорцима обављена је применом DAS-ELISA методе, коришћењем поликлоналних

антисерума за детекцију десет економски најзначајнијих вируса парадајза: CMV, PVY, TSWV, AMV, TMV, ToMV, вирус мозаика кромпира (*Potato virus X*, PVX), вирус мозаика пепина (*Pepino mosaic virus*, PepMV), вирус жуте увијености листа парадајза (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) и вирус прстенасте пегавости парадајза (*Tomato ringspot virus*, ToRSV). DAS-ELISA метода примењена је и за утврђивање присуства четири вируса: AMV, ToMV, TMV и PepMV у 10 комерцијално доступних узорака семена различитих сорти и хибрида парадајза у нашој земљи (*Серолошка испитивања*). Молекуларна детекција обављена је применом методе реверзне транскрипције праћене ланчаном реакцијом полимеразе (RT-PCR) уз коришћење различитих прајмера специфичних за поједине делове генома испитиваних вируса парадајза. Екстракција укупних RNA из узорака заражених биљака парадајза, обављена је коришћењем cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) методе, док је за умножавање циљних секвенци коришћен „One-step“ RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany). За детекцију CMV коришћени су прајмери CMVCPfwd/CMVCPrev који омогућавају умножавање комплетног гена за протеин омотача (CP гена), за изолате PVY прајмери PVYc/PVYd који омогућавају умножавање P1 протеина, за изолате TSWV прајмери TSWVCP-f/TSWVCP-r који омогућавају умножавање дела гена за нуклеокапсид (N гена), док су за изолате AMV коришћени прајмери CP AMV1/CP AMV2 који омогућавају умножавање дела CP гена. Молекуларна детекција TMV и ToMV обављена је коришћењем прајмера TobUni1/TMVspec, односно TobUni1/ToMVspec који омогућавају умножавање комплетног CP гена, а детекција CMV satRNA коришћењем прајмера CMVsat-fwd/CMVsat-rev који омогућавају умножавање целог генома satRNA. Након молекуларне детекције и успешне амплификације одређених, циљаних делова генома карактеристичних за поједине вирусе, а у циљу даље карактеризације изолата најзначајнијих вируса присутних у усеву парадајза у нашој земљи, одабрани изолати послати су на услужно пречишћавање и секвенцирање (Macrogen Europe, Holandija) у оба смера коришћењем истих прајмера као у RT-PCR реакцији. Након секвенцирања, молекуларна идентификација изолата CMV, PVY, TSWV, AMV, TMV, ToMV и CMV satRNA обављена је BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) анализом. Добијене секвенце су обрађене у програму FinchTV Version 1.4.0., а међусобно поређење добијених секвенци и секвенци одговарајућег региона вируса из GenBank базе који су показали највећу сличност са изолатима из Србије применом BLAST анализе коришћењем MEGA5 софтвера (*Молекуларна идентификација*). Филогенетске анализе, односно проучавање еволутивне повезаности изолата одређеног вируса, обављене су реконструкцијом филогенетских стабала секвенцираних изолата CMV, PVY, TSWV и CMV satRNA пореклом из Србије и одабраних изолата из других делова света доступних у GenBank бази. Реконструкција филогенетских стабала обављена је коришћењем *neighbour-joining* методе за PVY и CMV satRNA, односно *maximum parsimony* методе за CMV и TSWV коришћењем MEGA5 софтвера и *bootstrap* анализе са 1000 понављања (*Молекуларна карактеризација*).

Резултати. Резултати истраживања обрађени су у оквиру 6 потпоглавља. Приказани су јасно, уз концизна текстуална тумачења, прегледне табеле, графиконе и слике које илуструју делове истраживања. У потпоглављу *Симптоми забележени у пољу и учесталост обољења* дат је детаљан опис симптома забележених током прегледа усева парадајза у различитим локалитетима гајења у Србији током периода од 2011. до 2015. године. Описани симптоми документовани су оригиналним фотографијама, а на сваком прегледаном локалитету визуелно је процењена и учесталост обољења. На основу резултата DAS-ELISA теста (*Серолошко доказивање вируса у сакупљеним узорцима парадајза*) у усеву парадајза у Србији детектовано је присуство шест вируса: CMV, PVY, TSWV, AMV, TMV и ToMV у појединачној или мешаној инфекцији. Ни у

једној години испитивања није утврђено присуство PVX, PerMV, TYLCV и ToRSV. Резултати су приказани прегледно за све године испитивања помоћу табела, мапа прегледаних локалитета и графички. Најзаступљенији вирус током 2011. и 2015. је био CMV, док је PVY био превалентни вирус у 2012., 2013. и 2014. години. Иако су били најзаступљенији, нису у свим годинама били и најраспрострањенији вируси. Најраспрострањенији вирус у 2011. години био је CMV, док је у 2012., 2014. и 2015. години најраспрострањенији био PVY. У 2013. години, најраспрострањенији вирус је био ToMV, иако је био други по заступљености. Укупно посматрано, током свих пет година истраживања, превалентни вируси су били CMV и PVY, који су доказани у великом броју узорака и округа обухваћених испитивањима. Осим њих, у свим годинама истраживања доказано је и присуство TSWV. Присуство AMV није доказано 2015. године, TMV 2014. године, а ToMV 2011. и 2014. године. У свим годинама истраживања највише су биле заступљене појединачне инфекције, са изузетком 2013. године када су биле заступљеније мешане инфекције. Од мешаних инфекција најзаступљеније су биле двоструке инфекције и то мешана инфекција два превалентна вируса, CMV и PVY. Током ових истраживања присуство TMV, ToMV, AMV и PerMV у семену различитих сорти и хибрида парадајза, комерцијално доступних на нашем тржишту, није утврђено (*Серолошка детекција TMV, ToMV, AMV и PerMV у семену парадајза*). У циљу молекуларне детекције свих шест вируса парадајза присутних у нашој земљи (*Детекција вируса парадајза применом RT-PCR методе*) прво је испитана погодност прајмера специфичних за одређени вирус за рутинску детекцију и даљу молекуларну карактеризацију изолата наведених вируса. Осим тога, RT-PCR метода је коришћена и за детекцију CMV satRNA. Молекуларна идентификација вируса парадајза и CMV satRNA обављена је након секвенцирања одговарајућег региона карактеристичног за сваки вирус и прорачуна генетичке сличности одабраних изолата са изолатима одговарајућег вируса пореклом из других делова света и дата је у потпоглављу *Молекуларна идентификација изолата вируса парадајза присутних у Србији*. Молекуларна карактеризација два најраспрострањенија вируса парадајза CMV и PVY, као и TSWV и CMV satRNA обављена је реконструкцијом филогенетских стабала и проучавањем еволутивне повезаности секвенци добијених током ових истраживања са секвенцама одговарајућег вируса преузетих из GenBank базе података (*Филогенетске анализе*). Молекуларна карактеризација изолата CMV показала је хетерогеност популације овог вируса пореклом из парадајза из Србије. Филогенетско стабло на основу секвенце CP гена показало је груписање изолата CMV у две подгрупе I и II, од којих се подгрупа I даље дели на IA и IB подгрупу. Седам изолата CMV пореклом из парадајза из Србије груписали су се у подгрупу IA, док су се преостала три изолата груписала у подгрупу II. Филогенетско стабло на основу секвенце P1 гена је указало на груписање изолата PVY у три главна кластера на основу њихове припадности одговарајућем соју. У оквиру некротичних сојева издвајају се два субкластера од којих први чине изолати некротичних сојева пореклом из Европе, у који су се сврстали и испитивани изолати PVY пореклом из парадајза из Србије, док други субкластер чине северноамерички некротични изолати. Стабло реконструисано на основу секвенце N гена изолата TSWV, указало је на груписање изолата на основу географског порекла у четири главна кластера: Европски, Бразилски, Северно Амерички и Азијски. У кластер са изолатима пореклом из Европе сврстали су се и испитивани изолати TSWV пореклом из парадајза из Србије, али у две одвојене географске субпопулације овог кластера. Филогенетске анализе одабраних изолата CMV satRNA указале су на груписање у две групе, некрогена и ненекрогена. Два изолата CMV satRNA пореклом из парадајза из Србије груписала су се у оквиру

некрogene групе али у две одвојене подгрупе, док се преосталих пет груписало у ненекрogene изолате.

Дискусија. Добијени резултати дискутовани су у оквиру шест потпоглавља уз концизна тумачења. У потпоглављу *Симптоми у пољу забележени на биљкама парадајза* истакнуто је да се није могла уочити повезаност између типа симптома и вируса чак ни када су вируси били присутни у појединачним заразама. Такође, на везу између симптома и детектованог вируса није утицао ни хибрид, односно сорта парадајза. На основу симптома на парадајзу могуће је само донети закључак да се ради о вирусној инфекцији, не и о томе који вирус је проузроковач, што указује да симптоми немају дијагностички значај. У другом потпоглављу *Учесталост обољења* продискутовани су разлике у учесталости биљака са симптомима по годинама истраживања. Просечна вредност учесталости обољења се мењала од године до године, и кретала се од 10% (2014. године) до 80% (2011. и 2015. године). Овакве разлике у појединим годинама истраживања, поред доступних извора инокулума, односно заразе и различите ефикасности преношења појединих вектора, највероватније су последица различитих метеоролошко-климатолошких услова који су карактерисали поједине године испитивања. У потпоглављу *Идентификација вируса парадајза применом DAS-ELISA теста* објашњени су појава и распрострањеност вируса у односу на ранија испитивања спроведена у нашој земљи и свету. Резултати петогодишњег праћења вируса парадајза у Србији, потврдила су присуство CMV, PVY, TSWV, AMV, TMV и ToMV у појединачним и мешаним инфекцијама, а заступљеност вируса значајно је варијирала и зависила од године испитивања, округа, локалитета, као и типа инфекције. Најзаступљенији вируси у овим испитивањима били су CMV и PVY који су доказани у великом броју узорака и округа обухваћених испитивањима, а најчешће детектовани тип заразе била је појединачна зараза. У потпоглављу *Распрострањеност вируса* истакнуто је да су најраспрострањенији вируси у усеву парадајза у Србији били PVY и CMV. Присуство PVY је доказано у више од 70%, а CMV у 50% тестираних округа. Ова да вируса су и најчешћи вируси на парадајзу у Европи. У петом потпоглављу (*Преношење TMV, ToMV, AMV и ПерMV семеном парадајза*) продискутовани су резултати серолошке анализе семена сорти и хибрида, који су комерцијно доступни на нашем тржишту и истакнуто да је промена праксе коришћења сопственог семена за производњу расада парадајза и прелазак на коришћење комерцијално доступног семена највероватнији разлог мање заступљености вируса који се преносе семеном, нарочито ToMV и TMV. У потпоглављу *Молекуларне анализе* дискутује се испитивање погодности одређених прајмера за успешну детекцију и идентификацију изолата шест вируса парадајза пореклом из Србије и CMV satRNA, чиме су унапређене методе детекције и идентификације вируса парадајза, као и дијагноза обољења. Осим тога у оквиру овог поглавља продискутовани су и резултати генетичке идентичности изолата вируса пореклом из Србије са изолатима вируса из других делова света, као и молекуларна карактеризација испитиваних вируса. Изолати CMV из Србије на основу секвенце CP гена показали су висок ниво варијабилности и у филогенетском стаблу груписали су се у оквиру две подгрупе: IA и II. Филогенетска анализа на основу секвенци гена за Р1 протеин, показала је груписање изолата PVY у кластере који одговарају описаним сојевима овог вируса, а изолата из Србије груписали су се у кластер са осталим европским изолатима некротичних сојева. На основу секвенце N гена изолати TSWV из парадајза из Србије показали су међусобно висок ниво нуклеотидне сличности и груписали су се заједно са већином изолата из Европе, али у две одвојене географске субпопулације европског кластера. Филогенетске анализе изолата CMV satRNA указале су на груписање изолата у две главне групе: некрогена и ненекрогена група. Два изолата CMV satRNA из Србије груписала су се у оквиру

некрogene групе, док се преосталих пет груписало у оквиру ненекрогене групе. Филогенетска проучавања дала су увид у могуће путеве интродукције у нашу земљу, диверзитет и варијабилност популације и омогућиће даље утврђивање основних извора заразе.

Закључци. Закључци су правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата. Испитивањима вирусних обољења парадајза установљено је стално присуство и висок интензитет заразе у усевама парадајза у Србији гајеним како на отвореном пољу, тако и у заштићеном простору. Прегледом усева у различитим локалитетима гајења забележена је појава разноврсних симптома од промена општег изгледа биљака, преко хроматских и морфолошких промена лишћа, до промена у обојености, некрозе и деформације плодова. Серолошким анализама укупно 3486 узорака сакупљених на 136 локалитета гајења у оквиру 22 административна округа Србије утврђено је присуство шест вируса: CMV, PVY, TSWV, AMV, TMV и ToMV, са доминантним присуством CMV и PVY. Није утврђено присуство вируса у семену различитих сорти и хибрида комерцијално доступних на нашем тржишту. Свих шест вируса присутних на парадајзу у Србији детектовани су до нивоа врсте коришћењем одговарајућих специфичних прајмера и RT-PCR методе, а молекуларна идентификација обављена је прорачуном генетичке сличности одабраних изолата са изолатима одговарајућег вируса пореклом из других делова света. Анализом секвенци CP гена изолата CMV и одређивањем стопе генетичког диверзитета између испитиваних изолата утврђена је хетерогеност популације, односно висока варијабилност у оквиру популације овог вируса пореклом са парадајза у Србији. На основу филогенетских анализа испитивани изолати припадају двама веома удаљеним подгрупама, IA и II, указујући на више независних интродукција и успешно ширење изолата из подгрупе II у нашој земљи. На основу високог степена нуклеотидне сличности сви изолати PVY пореклом из парадајза припадају истом соју. Филогенетска анализа, на основу секвенци гена за P1 протеин, показала је да изолати припадају некротичном соју и да воде порекло из Европе. Иако су испитивани изолати TSWV показали висок степен хомологије секвенце N гена, филогенетска анализа је показала да припадају двама различитим географским популацијама, што говори о две независне интродукције овог вируса у нашу земљу. Као нова опасност за производњу парадајза у нашој земљи утврђено је присуство некротичних satRNA у изолатима CMV који изазивају леталну некрозу. Први пут је испитана природна популација CMV satRNA пореклом из парадајза и утврђена је њена хетерогеност. Филогенетске анализе указале су да су у Србији присутни и некротични, али и ненекротични изолати CMV satRNA.

Литература. У дисертацији је наведено 335 референци, од чега 66 домаћих и 269 страних аутора. Избор референци је актуелан, одговара проучаваној проблематици, а цитиране су на умешан и правилан начин.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертације Душана Николића, дипл. инж., под насловом: „Диверзитет и карактеризација вируса парадајза у Србији“ представља оригинални научни рад са фундаменталним и практичним значајем. Дисертација представља успешно спроведен самостални експериментално-истраживачки научни рад кандидата, а спроведена истраживања су у сагласности са планом који је прихваћен при пријави дисертације. Дисертација представља свеобухватну и комплексну студију о вирусним обољењима парадајза у Србији, чији се допринос огледа у утврђивању диверзитета и превалентних

вируса инфективних за парадајз. Такође, допринос ове докторске дисертације се огледа и у томе што доноси нова сазнања о генетичкој структури природне популације најзаступљенијих вируса парадајза у нашој земљи. Осим редефинисања статуса учесталости и распрострањености раније присутних вируса парадајза у нашој земљи, разјашњена је етиологија леталне некрозе, која се појавила у производњи парадајза на отвореном пољу, утврђивањем присуства некрогених изолата CMV satRNA. Осим тога, ова истраживања омогућила су и први увид у генетичку структуру популације CMV satRNA пореклом са парадајза у Србији. Допринос ове докторске дисертације се огледа и у унапређивању молекуларне детекције и идентификације вируса инфективних за парадајз, чиме је омогућена брза молекуларна дијагностика обољења и молекуларна карактеризација вируса парадајза присутних у Србији.

Поред доприноса у инвентаризацији вируса парадајза кроз петогодишња истраживања, одређивања најзаступљенијих и најраспрострањенијих вируса, ова докторска дисертација представља основ за развој и усмеравање стратегија контроле и имплементацију мера сузбијања према превалентним вирусима парадајза у Србији.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Душана Николића, дипл. инж. под насловом: „Диверзитет и карактеризација вируса парадајза 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
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област Фитопатологија)

др Ивана Станковић, ванредни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област Фитопатологија)

др Горан Делибашић, редовни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област Фитопатологија)

др Ђорђе Моравчевић, ванредни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област Повртарство)

др Данијела Ристић, научни сарадник
Институт за заштиту биља и животну средину
(ужа научна област Фитопатологија)

Београд, 02.04.2018.

Прилог:

Сепарат објављеног рада Душана Николића у научном часопису на SCI листи

Nikolić D., Vučurović A., Stanković I., Radović N., Zečević K., Bulajić A., Krstić B. (2018): Viruses affecting tomato crops in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*. DOI: 10.1007/s10658-018-1467-y