

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

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 10.6.2016. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Светлана Радовић о урађеној докторској дисертацији магистра наука Наташе Ж. Ђурчић, под насловом „**Наслеђивање и експресија гена укључених у отпорност сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) према пламењачи**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

др Светлана Радовић, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Весна Максимовић, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација мр Наташе Ђурчић под насловом „**Наслеђивање и експресија гена укључених у отпорност сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) према пламењачи**“, написана је према Упутствима за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду. Дисертација обухвата 7 уобичајених поглавља: Увод, Циљеви рада, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Дисертација је написана на 105 нумерисаних страна. Садржи 24 слике, 12 табела и 120 литературних навода.

Експериментални део рада везан за испитивање наслеђивања гена *Pl* укључених у отпорност сунцокрета према патогену *Plasmopara halstedii*, проузроковачу пламењаче, урађен је у Лабораторији за молекуларне маркере и физиологију стреса, Одељења за уљане културе, Института за ратарство и повртарство, из Новог Сада. Део експерименталног рада који се односи на процену отпорности/осетљивости биљака према патотипу 730 пламењаче урађен је у Фитопатолошкој лабораторији Института за ратарство и повртарство. Други део експерименталног рада који се односи на испитивање експресије гена *Pl* као и гена који су важни у одговору биљака на биотички стрес урађен је у биотехнолошкој лабораторији Abiotech у Сремској Каменици и у лабораторији Факултета заштите животне средине Универзитета Едуконс у Сремској Каменици.

Анализа докторске дисертације:

Предмет докторске дисертације је испитивање наслеђивања и експресије гена укључених у отпорност сунцокрета према патотипу пламењаче 730, који је преобладајући патотип у Србији. Докторска дисертација кандидаткиње мр Наташе Турчић има интердисциплинарно подручје истраживања-молекуларна генетика биљака, молекуларна физиологија биљака и фитопатологија.

У **уводном делу** обрађена су општа и савремена сазнања везана за уже научне области које су биле предмет истраживања. У уводном делу се говори о сунцокрету као једној од најважнијих уљаних култура чија производња је угрожена постојањем великог броја патогена. Детаљно је описана пламењача сунцокрета као једна од најдеструктивнијих болести гајеног сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) која је од изузетног економског значаја у производњи ове уљане културе јер доводи до драстичног смањења приноса и квалитета сунцокрета. Детаљно су описани симптоми који се манифестују на биљкама инфицираним овим патогеном и наводи се интернационална номенклатура патотипова пламењаче. Описани су гени (оначени као *Pl* гени) за отпорност на пламењачу, са нагласком на чињеницу да је до сада откривено више од 20 *Pl* гена, али ипак појава нових патотипова пламењаче намеће потребу за истраживањем нових гена за отпорност. Наредно потпоглавље описује мапиране *Pl* гене на „линкејд“ групама генома сунцокрета, где се наводи да су три главне групе *Pl* гена LG1, LG8 и LG13, на којима је до сада мапирано 11 *Pl* гена. У следећем потпоглављу говори се о CAPS маркерима и о њиховим предностима у односу на друге молекуларне маркере. Даље се описују *R* гени и аналози гена за отпорност (RGA). У последњем потпоглављу говори се о одговору биљака на инфекцију узрочником пламењаче. Као одговор на абиотички и биотички стрес биљке акумулирају фенолна једињења. Инфекција биљака патогеном *Plasmopara halstedii* доводи до оксидативног стреса и до активације антиоксидативног одговора. За време интеракције биљка-патоген код отпорних биљака долази до хиперсензитивне реакције. Ћелије биљке домаћина које окружују паразита одумиру тј. јавља се програмирана смрт ћелија које окружују паразита. Хиперсензитивни одговор је праћен многобројним физиолошким и молекуларним променама, нпр. деполаризацијом плазмине мембране, променама у брзини респирације, оксидативним стресом, продукцијом азот монооксида (NO), производњом PR (енг. Pathogenesis-Related) протеина. Хиперсензитивна реакција индукује SAR. Отпорне биљке продукцијом својих метаболита (токсини, полифеноли, салицилна киселина итд.) спречавају даљи раст патогена. На почетку хиперсензитивне реакције долази и до транскрипционе активности гена одбране, који кодирају ензиме за биосинтезу фитоалексина и лигнина. Многи од ових гена, као што су Pal (Phenylalanine Ammonia-Lyase) и хитиназа кодирају ензиме укључене у синтезу продуката који успоравају или инхибирају инвазију патогена.

После увода формулисани су **научни циљеви** докторске дисертације који су обухватили:

- испитивање начина наслеђивања гена отпорности према пламењачи у неколико мапирајућих популација, насталих укрштањем различитих линија сунцокрета које се разликују по отпорности према патотипу 730 пламењаче. У оквиру овог циља, начин наслеђивања гена отпорности према пламењачи биће процењен на основу теста отпорности (примарна инфекција клијанаца сунцокрета суспензијом спора *Plasmopara*

halstedii), као и на молекуларном нивоу користећи PCR маркере који су лоцирани у региону *Pl6* локуса.

- утврђивање распореда RGA на линкејд мапама *Pl6* региона сунцокрета у три популације које су коришћене за мапирање, да би се проценила употребљивост добијених PCR маркера у маркер асистираној селекцији за отпорност сунцокрета према проузроковачу пламењаче.
- испитивање експресије десет гена: гена отпорности *Pl6*, гена за сигнализацију (HaEDS1 и HaEDR1), гена укључених у синтезу H₂O₂ (Hасаох и Наохох), гена укључених у антиоксидативни одговор (HaSODc и HaSODp) и гена везаних за одговор на патогене (Hachi, PAL, HaPR5), да би се добили подаци који би требало да допринесу разјашњењу функције гена *Pl* и механизма отпорности сунцокрета према пламењачи.

У поглављу **Материјал и методе** описане су методе које су коришћене у реализацији постављених циљева. Детаљно је описан биљни материјал коришћен у оцени наслеђивања отпорности и мапирање гена за отпорност према пламењачи. У овом поглављу су описани и услови гајења биљака у климатизованим коморама при контролисаним условима температуре, влажности ваздуха и интензитета светлости у циљу успешног извођења инфекције биљака суспензијом спора *Plasmopara halstedii*. Детаљно су описане методе примарне инфекције клијанаца сунцокрета, односно инфекција биљака у фази првог пара листова у случају секундарне инфекције сунцокрета пламењачом. Велики број узорака (укупно преко 200 F₃ фамилија, 37 рекомбинантних инбред линија, преко 300 појединачних биљака, 24 групна узорка коришћена за испитивање експресије гена) је анализирано да би се реализовали постављени циљеви. Отпорност наведеног биљног материјала на пламењачу је анализиран како на нивоу процене отпорности тако и на молекуларном нивоу. Геномска ДНК из свих испитиваних узорака је екстрахована према методу Permingeat и сар. и детаљно је описана у Прилогу 1. Из групних узорака биљног материјала који је коришћен за испитивање експресије гена важних у одговору биљака на биотички стрес екстрахована је РНК. Протокол за екстракцију РНК је детаљно описан у Прилогу 2. Одређивање концентрације и квалитета екстраховане ДНК и РНК је урађено спектрофотометријски у UV области. Квалитет екстраховане ДНК и РНК је проверен и електрофорезом на агарозном гелу. У овом поглављу су описани и услови умножавања фрагмената ДНК применом методе PCR. Приказане су и секвенце прајмера који су коришћени за амплификацију маркера на *Pl6* локусу. Сlike гелова су снимљене са Bio-Print system (Vilber Lourmat, France), а величина умножених фрагмената је одређена користећи програм BIO-CAPT V. 97 (Vilber Lourmat, France). У наредном потпоглављу кандидаткиња мр Наташа Ђурчић описује поступак дигестије продуката PCR реакције рестрикционим ензимима у циљу откривања кододоминантних CAPS маркера. Доминантни хаплотипови откривени после амплификације са коришћеним прајмерима (HaP1, HaP2 и HaP3), као и CAPS маркери су мапирани на линкејд мапе које су конструисане помоћу програма MAPMAKER Version 2.0 (Lander и сар. 1987). Процент рекомбинација је преведен у центиморгане (cM) преко мапирајуће функције према Kosambi (1944). У последњем потпоглављу дат је приказ гена који су важни у одговору биљака на биотички стрес. Екстрахована РНК је уз помоћ реверзне транскриптазе (Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) преведена у cDNK која је служила за анализу транскрипата гена важних у одговору биљака на биотички стрес.

У поглављу **Резултати** на прегледан начин су приказани добијени резултати који су груписани у 6 потпоглавља. У складу са наведеним циљевима рада резултати су подељени у две целине. Експериментални резултати су приказани у виду табела, графика и слика агарозних гелова. У првом делу рада је испитано наслеђивање гена за отпорност сунцокрета према патотипу 730 пламењаче у три мапирајуће популације, које су претходно произведене у Институту за ратарство и повртарство у Новом Саду, а настале су укрштањем линија сунцокрета које се разликују по присуству *Pl* гена. Инбред линија сунцокрета Na26S, која је осетљива на патотип пламењаче 730, је укрштена са линијама JM8, Na338 и Na26R које су донори гена *Pl* за отпорност према пламењачи. Након укрштања (Na26SxJM8) произведене су 73 F₃ фамилије које су у овом испитивању коришћене као прва популација на којој је испитан начин наслеђивања отпорности према патотипу 730 пламењаче. Другу популацију чини 75 F₃ фамилија које су добијене из укрштања (Na26SxNa338), а трећу популацију чине 73 F₃ фамилије добијене из укрштања (Na26SxNa26R). Отпорност линија и њиховог F₃ потомства на пламењачу су оцењене на нивоу процене отпорности користећи технику инокулације целог семена (примарна инфекција), као и на молекуларном нивоу.

Све биљке на којима није дошло до спорулације оцењене су као отпорне. У првој популацији, од свих оцењених F₃ фамилија 52 фамилије су биле отпорне, док је 21 фамилија била осетљива. Резултати теста отпорности у другој популацији показали су да је од свих оцењених F₃ фамилија, 56 фамилија било отпорно, а 19 фамилија су осетљиве према патотипу 730 пламењаче. У трећој популацији 54 F₃ фамилије оцењене су као отпорне, а 19 као осетљиве. Резултати χ^2 теста су потврдили да однос раздвајања отпорних и осетљивих F₃ фамилија одговара односу 3 : 1 у свим испитиваним популацијама. На основу добијених резултата потврђено је да је отпорност на патотип пламењаче 730 контролисана једним геном.

У следећем потпоглављу приказани су резултати добијени анализом gDNK из F₃ фамилија применом неколико PCR прајмера за аналоге гена отпорности (Resistance Gene Analogues). Начин наслеђивања, тј однос раздвајања за добијене RGA хаплотипове и CAPS маркере, у три испитиване популације сунцокрета је тестиран је χ^2 тестом. Тестирана је хипотеза да је однос RGA хаплотива у наслеђивању доминантно рецесиван, односно да је однос добијених фенотипова 3:1. Према добијеним резултатима ова хипотеза је прихватљива за све хаплотипове RGA осим за NaP1R и то само у случају популације у којој је коришћена JM8 линија сунцокрета као донор гена *Pl6*. У све три испитиване популације сви остали хаплотипови се уклапају у доминантно – рецесиви тип наслеђивања, односно раздвајали су се у односу 3:1, без обзира на родитељске линије које су биле извори гена *Pl*. Маркери CAPS су се увек раздвајали у односу 1:2:1, односно наслеђују се кодоминантно.

Један од циљева овог рада је био да се утврди распоред хаплотипова RGA и CAPS маркера на линкејџ мапама *Pl6* локуса сунцокрета у популацијама сунцокрета које су коришћене за мапирање. Показано је да су испитивани маркери распоређени на генетичкој дистанци од ~5 до ~12 cM. Упркос разликама које постоје, показано је да су распоред локуса и "линкејџ" раздаљине анализираних маркера добро одржаване између мапа добијених за три различите мапирајуће популације. На основу добијених резултата закључено је да кодоминантни CAPS маркери за отпорност сунцокрета према патотипу пламењаче 730 могу бити коришћени у маркер асистираној селекцији за ову особину, без обзира на родитељске линије које су коришћене као извори гена за отпорност.

У следећем потпоглављу су приказани резултати добијени у испитивању популације сунцокрета састављене од 37 RIL (Recombinant Inbred Lines). Резултати указују на то да се у *Pl6* геномском региону ипак јављају промене чак и у касним генерацијама самооплодне у току стварања биљака отпорних на пламењачу. У раду је показано да употреба једног доминантног и кододоминантних CAPS маркера ипак обезбеђује ефикасну идентификацију биљака отпорних на патотип пламењаче 730, без обзира на родитељске линије које се у почетном укрштању користе као извори или примаоци *Pl* гена.

У другом делу рада приказани су резултати добијени испитивањем експресије гена кандидата за отпорност испитиваног у првом делу, као и гена (Насаох, Наохох, HaSODc, HaSODp, HaSOD1, Nachi, HaPR5, HaEDS1, HaEDR1) који су важни у одговору биљке на биотички стрес проузрокован инфекцијом гљивом *Plasmopara halstedii*. У листовима младих биљака две линије сунцокрета, од којих је једна отпорна а друга осетљива према патотипу 730 пламењаче, испитана је експресија ових гена, у периоду 2-96 сати након секундарне инфекције спорама *P. halstedii*, односно након прскања водом у случају контролних биљака. Резултати добијени са Ha26R и Ha26S линијама сунцокрета указују да TIR-NBS-LRR ген кандидат за отпорност који је проучаван у овом раду, има конститутивну експресију и у контролном и у третману инокулисаним суспензијом спора *P. halstedii*. Након анализе рестрикционим ензимима показано је да у отпорној линији сунцокрета Ha26R, поред фрагмента који је конститутивно присутан код обе линије сунцокрета (~800bp), постоји још један додатни фрагмент који је исте величине, али му се секвенца разликује у неколико SNP-ова (Single Nucleotide Polymorphism) у односу на конститутивно присутан фрагмент. Претпостављено је да овај додатни фрагмент који је присутан само у отпорној линији Ha26R, обезбеђује овој линији отпорност на патотип 730 пламењаче.

У последњем потпоглављу су приказани резултати добијени анализом експресије гена Насаох, Наохох, HaSODc, HaSODp, HaSOD1, Nachi, HaPR5, HaEDS1 и HaEDR1. Показано је да је већина испитиваних гена имала конститутивну експресију која је израженија у отпорној линији сунцокрета. HaEDS1 сигнални ген је имао повећану експресију 2h након инфекције, што указује на активност салицилног пута сигнализације. У истој тачки је повећана и експресија гена за одговор на патогене: хитиназе и гена HaPR5. Експресија осталих гена: HaSODp, Насаох и Наохох се повећава од 4 до 48 h након инфекције у отпорној линији. Добијени резултати показују да је највећа квантитативна разлика у експресији гена између отпорне и осетљиве линије сунцокрета након инфекције суспензијом спора *P. halstedii*, индукција експресије HaPR5 гена у раним фазама након инфекције код отпорне линије. Добијени резултати показују да рани одговор биљака након секундарне инфекције узрочником пламењаче, одговара хиперсензитивном одговору.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња успешно повезује у целине добијене резултате и проналази њихову примену и значај у оквиру испитиване проблематике. Потврђени су резултати познати из литературе да је отпорност на патотип пламењаче 730 контролисана једним геном и доминантно-рецесивним типом наслеђивања. Резултати који се односе на утврђивање распореда доминантних RGA и кододоминантних CAPS маркера на линкејд мапама *Pl6* локуса сунцокрета у популацијама сунцокрета које су коришћене за мапирање поређени су са резултатима других аутора који су радили на истој проблематици. У последњем потпоглављу дискутовани су резултати који се односе на

испитивање експресије гена који су важни у одговору биљака на биотички стрес и упоређивани са резултатима других аутора који су радили на истој или сличној проблематици.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња износи више појединачних закључака о наслеђивању и експресији гена укључених у отпорност сунцокрета према пламењачи. Приказани закључци су произашли из резултата приказаних у докторској дисертацији и испуњавају задате циљеве.

Поглавље **Литература** садржи 120 библиографских јединица. Литературни изводи су адекватно цитирани на одговарајућим местима у тексту докторске дисертације. Избор релевантне литературе показује да је кандидаткиња студиозно приступила истраживању и успешно испунила задате циљеве.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Panković D., N. **Radovanović**, S. Jocić, Z. Satovic and D. Škorić, 2007: Development of Co-Dominant Amplified Polymorphic Sequence Markers for Resistance to Sunflower Downy Mildew Race 730. Plant Breeding, 126 (4), 440-444. ISSN 0179-9541 DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01376.x IF 1.09 (M22)
2. **Nataša Ž. Ćurčić**, Ljiljana Prokić and Dejana M. Panković, 2016: Early response of defense related genes to secondary downy mildew infection in sunflower line with *Pl6* gene. Helia, doi: 10.1515/helia-2016-0009 (M24)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Dejana Saftić-Panković, Zlatko Satovic, **Nataša Radovanović**, Siniša Jocić, Vladimir Miklič, 2008: Positioning of CAPS markers for resistance to downy mildew on linkage maps as determined in three sunflower mapping populations. Proceedings of the 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture, Opatija 18-21 February. 2008., Hrvatska, 357-361. ISBN 978-953-6135-68-4 (M33)
2. Dejana Saftić-Panković, **Nataša Radovanović**, Vladimir Miklič, Siniša Jocić (2008) Evaluation of molecular markers for downy mildew resistance in sunflower. Proceedings of the International Conference "Conventional and molecular breeding of field and vegetable crops", Novi Sad 24-27 November 2008., 311-314. ISSN broj 978-86-80417-20-2(M33)
3. Saftić-Panković Dejana, **Radovanović Nataša**, 2009: Expression of defense related genes in sunflower leaves after infection with spores of *Plasmopara halstedii* 2009. Book of Abstracts, XVIII Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Vršac, 25-27 May 2009, 63. ISBN/ISSN 978-86-912591-0-5
4. **Radovanović N.**, Jocić S., Miklič V., Saftić-Panković D. 2009: Changes in the *Pl6* genomic region for the resistance to downy mildew in recombinant sunflower inbred lines. Proceedings of the IV Congress of Serbian genetic Society, Tara, 1-5 june, 269. ISBN 978-86-87109-03-2
5. **Ćurčić Nataša**, Prokić Ljiljana, Jocić Siniša, Škorić Dragan, Panković Dejana, 2015: Expression of *Pl6* gene in leaves of two NILs after infection with spores of

- Plasmopara halstedii*. Workshop: Latest technologies for crop improvement. 22-27 February 2015, Antalya, Turkey, 36. (M34)
6. **Nataša Ćurčić**, Dragan Škorić, Dejana Panković 2016: Expression of defense related genes in leaves of two sunflower lines after infection with spores of *Plasmopara halstedii*. 19th International sunflower conference 29 may-3 june, Edirne, Turkey (M34)

Мишљење и предлог комисије

Значај и актуелност теме, као и адекватни и савремени приступ у анализи наслеђивања и експресије гена који су укључени у отпорност сунцокрета према инфекцији патогеном *Plasmopara halstedii*, проузроковачем пламењаче, испуњавају научне захтеве докторске дисертације. По свом садржају, оригиналности, интерпретацији и дискутовању добијених резултата, поднети текст има све одлике докторске дисертације. Добијени резултати имају и теоријски и практични значај. Од свих испитиваних гена у одговору на инфекцију узрочником пламењаче само је ген *NaPR5* био индукован већ два сата после инфекције у линији сунцокрета која има и ген *Pl6*. Добијени резултати указују да је експресија гена *Pl6* комплексна, да постоји повезаност отпорности са експресијом гена *NaPR5* и да у том правцу треба наставити будућа истраживања у овој области. Посебно треба нагласити да резултати приказани у овом раду, односно добијени CAPS маркери имају и практичну примену у маркер асистираној селекцији за отпорност сунцокрета према пламењачи.

На основу свега наведеног, сматрамо да је мр Наташа Ћурчић успешно остварила постављене циљеве докторске дисертације и предлажемо Наставно-научном већу Универзитета у Београду-Биолошког факултета да прихвати овај извештај и одобри мр **Наташи Ћурчић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Наслеђивање и експресија гена укључених у отпорност сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) према пламењачи**“.

У Београду 25. 07. 2016. године

Комисија за преглед и оцену докторске дисертације
др Светлана Радовић, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Весна Максимовић, научни саветник
Универзитет у Београду-Институт за молекуларну
генетику и генетичко инжењерство
