

Предмет: Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације Ирене Радиновић, дипл. биолога

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду бр. 461/2-5.1. од 23. новембра 2016. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: „**Варијабилност генотипова црвене детелине на основу агрономских особина, морфолошких и микросателитских маркера**“, кандидата Ирене Радиновић, дипл. биолога, па пошто смо проучили завршену докторску дисертацију, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Ирене Радиновић је написана на 103 стране куцаног текста и садржи 15 табела, 12 графика и 3 слике. У дисертацији су цитирана 149 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; Поглавља: 1. Увод (стр. 1-3); 2. Циљ истраживања (стр. 4); 3. Преглед литературе (стр. 5-21); 4. Радна хипотеза (стр. 22); 5. Материјал и методе рада (стр. 23-40) са седам потпоглавља-5.1. Биљни материјал (стр. 23-24), 5.2. План огледа (стр. 24), 5.3. Агроеколошки услови на испитиваним локалитетима (стр. 25-28), 5.4. Испитиване морфолошке и агрономске особине генотипова црвене детелине (стр. 28-30), 5.5. Молекуларна анализа генотипова црвене детелине (стр. 30-34), 5.6. Хемијске анализе (стр. 34-37), 5.7. Статистичка анализа података (стр. 37-40); 6. Резултати и дискусија (стр. 41-83) са осам потпоглавља-6.1. Морфолошки маркери генотипова црвене детелине (стр. 41-53), 6.2. Агрономске особине генотипова црвене детелине (стр. 53-59), 6.3. Хемијске особине генотипова црвене детелине (стр. 59-61), 6.4. Корелације између агрономских особина, и између агрономских и хемијских особина црвене детелине (стр. 61-65), 6.5. Анализа главних компоненти (РСА) агрономских и хемијских особина црвене детелине (стр. 65-70), 6.6. Кластер анализа агрономских и хемијских особина црвене детелине (стр. 70-73), 6.7. Генетичка варијабилност микросателитских (SSR) молекуларних маркера за генотипове црвене детелине (стр. 73-81), 6.8. Сагласност резултата добијених на основу морфолошких, агрономских, хемијских и SSR молекуларних података (стр. 81-82); 7. Закључак (стр. 83-85), 8. Литература (стр. 86-99); Прилог (стр. 100-103); Биографију аутора; Изјаву о ауторству; Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

У **Уводном** поглављу кандидаткиња је истакла значај гајења црвене детелине (*Trifolium pratense* L.), која се користи као чист усељивац или у травно-легуминозним смешама. Црвена детелина је у 2014 години у Србији гајена на 116059 ha са оствареним просечним приносом од 3,3 t ha⁻¹. Описано је да је црвена детелина странооплодна врста са гаметофитским системом инкомпатибилности, и да су популације црвене детелине хетерогене, сачињене од хетерозиготних генотипова. Услед тога су високи нивои генетичких варијација унутар и између популација. Напоменуто је да морфолошка карактеризација представља дескрипцију узорака на основу морфолошких маркера или дескриптора, који могу бити праћени у различитим фазама животног циклуса биљке. Дескриптори који се користе у карактеризацији узорака гермплазме обухватају морфолошке/ботаничке особине,

које су често моногене или олигогене, које имају високу херитабилност, а чија експресија не зависи од фактора спољашње средине. Наведено је да су агрономски дескриптори углавном квантитативне особине, детерминисане полигенима чије је дејство подложно модификацијама под утицајем еколошких чинилаца. Из тога произилази да је евалуација агрономских особина, због њихове континуиране варијабилности, често комплекснија и тежа у односу на морфолошке дескрипторе, који омогућују брзу класификацију и дискриминацију узорака. Дескриптор листа одређене врсте представља колекцију свих особина, тј. маркера или дескриптора, који су међународно признати и стандардизовани, и који се користе у карактеризацији и евалуацији одређене врсте. Кандидаткиња је истакла да молекуларна карактеризација представља дескрипцију узорака на основу молекуларних маркера, који представљају одређене сегменте ДНК који се могу детектовати помоћу проба или специфичних прајмера, на основу којих се могу установити полиморфизми нуклеотидних секвенци различитих индивидуа. Од интереса за ово истраживање су нарочито били микросателити или SSR маркери (*Simple Sequence Repeats*), који су засновани на PCR (*Polymerase Chain Reaction*) техници, и са великом су заступљеношћу у еукариотским геномима, а одликује их кодоминантно наслеђивање, висока варијабилност и алелна дивергентност, једноставност процене величине фрагмента, и добра поновљивост резултата.

Као **Циљ истраживања** је приказано: 1. фенотипско оцењивање сорти и популација црвене детелине коришћењем UPOV (*International Union for the Protection of New Varieties of Plants*) дескриптора, карактеризација морфолошких особина и евалуација агрономских особина; 2. процена параметара квалитета генотипова црвене детелине, садржаја сирових протеина, садржаја влакана нерастворљивих у киселом детергенту (ADF), и садржаја влакана нерастворљивих у неутралном детергенту (NDF); 3. молекуларно-генетичка анализа сорти и популација црвене детелине применом микросателитских маркера; 4. процена генетичке сличности и међусобних односа генотипова црвене детелине на основу алелне дивергентности; 5. идентификација потенцијалних хетеротичних група сорти и популација црвене детелине; 6. класификација генотипова према резултатима фенотипске оцено, оцено квалитета и молекуларно-генетичке анализе.

У **Прегледу литературе**, кандидаткиња је навела најважније чињенице и резултате истраживања који се односе на: порекло црвене детелине, центре доместификације (Taylor и Quesenberry, 1996), цитогенетске карактеристике (Vizantin и сар., 2006), ботаничку класификацију (Mousset-Declas, 1992), поделу на примарни и секундарни генетички пул црвене детелине (Morris и Greene, 2001; Morris и сар., 2009), значај генетичких ресурса и сржне колекције (*core collection*) у оплемењивању црвене детелине (Guarino и сар., 2002), концепт дескриптор листи, унутар- и међу-популациону варијабилност морфолошких и агрономских особина црвене детелине (Boller и сар., 2003; Rosso и Pagano, 2005; Tucak и сар., 2009; Asci, 2011; Zhang и сар., 2012), примену молекуларних маркера у анализи унутар-групне и међу-групне генетичке варијабилности и анализи генетичких дистанци (Greene и сар., 2004; Herrmann и сар., 2005; Vieira и сар., 2007), оплемењивање крмних лекумина на бољи квалитет повећањем садржаја протеина и смањењем садржаја влакана нерастворљивих у киселом детергенту ADF (*Acid Detergent Fibres*) и влакана нерастворљивих у неутралном детергенту NDF (*Neutral Detergent Fibres*) (Ђорђевић и сар., 2007).

У **Радној хипотези** кандидаткиња је пошла од претпоставке да су одабрани генотипови црвене детелине довољно дивергентни у погледу броја алела на већем броју локуса. Очекује се да ће информације добијене фенотипском евалуацијом, помоћу морфолошких дескриптора и анализом агрономски значајних особина, послужити за сагледавање дивергентности генотипова на фенотипском нивоу. Претпоставља се да су морфолошки и микросателитски маркери довољно полиморфни за дискриминацију одабраног биљног материјала по изабраним особинама. Очекује се високи ниво полиморфности у анализираним локусима, као и да ће груписање генотипова црвене детелине бити у сагласности са њиховим пореклом. Претпоставка је да ће резултати истраживања указати на ефикасност примене морфолошких и микросателитских маркера у

описи и диференцијацији проучаваних генотипова црвене детелине, процени диверзитета, и у избору најперспективнијих генотипова ради даљег оплемењивања.

У оквиру поглавља **Материјал и методе рада**, приказан је биљни материјал коришћен у истраживању, сачињен од 46 генотипова црвене детелине, из колекције Института за ратарство и повртарство у Новом Саду, пореклом из 17 различитих земаља света. Генотипови су се разликовали по статусу (сорта или популација) и нивоу плоидности (диплоиди и тетраплоиди), као и за важне агрономске и морфолошке особине. Фенотипска карактеризација одабраног биљног материјала је извршена на основу огледа који је постављен почетком априла 2011. године по потпуно случајном блок систему у три понављања (анализирано је 10 биљака по понављању). Током јула и августа извршена је детаљна евалуација и карактеризација следећих особина: време цветања (фенолошка особина); форма раста, маљавост стабљике, боја листа, интензитет обојености пеге на листу (морфолошке особине-описија је извршена на основу UPOV дескриптора (2001) за извођење DUS (*Distinctness Uniformity Stability*) тестова за црвену детелину); број интернодија, број грана, дужина стабљике, дебљина стабљике, дужина централне лиске, ширина централне лиске, принос зелене масе и принос суве материје (агрономске особине). У току 2012. године, на преживелим биљкама матичњака из 2011. године, настављено је праћење и мерење агрономских особина (број интернодија, дужина стабљике, принос зелене масе и принос суве материје). Изолација ДНК је извршена коришћењем СТАВ (*Cetyltrimethylammonium bromide*) (Rogers и Bendrich 1988) екстракционе процедуре, која је омогућила да се изолује пречишћена ДНК високе молекулске масе (>50 kb). За молекуларну карактеризацију 46 генотипова црвене детелине изабран је сет од 15 микросателитских маркера, при чему је кандидаткиња водила рачуна да се одаберу маркери присутни на различитим хромозомима ради покривености читавог генома. Након умножавања ДНК фрагмената PCR техником, анализа фрагмената је извршена као мулти-тест, анализирајући по два маркера, који су били обележени различитим ABI-бојама истовремено. Узорци који су садржавали 0.5-1 µl PCR продукта сваког маркера, 1 µl стандарда и 9 µl Hi-Di формамида су раздвојени капиларном електрофорезом. Алели су детектовани помоћу GeneScan/Genotyper® софтверског пакета (Applied Biosystems). Одређивање укупног азота, на основу којег је одређена концентрација протеина, вршено је семимикро Кјелдаловом методом (Bremner, 1996). Одређивање садржаја влакана нерастворљивих у киселом детерџенту (ADF) је извршено према методи коју је навео Van Soest (1963). Одређивање садржаја влакана нерастворљивих у неутралном детерџенту (NDF) у биљном материјалу је урађено према методи коју су навели Van Soest и Wine (1967). Шенонов индекс диверзитета је служио за одређивање дистрибуције генотипова за морфолошке маркере по категоријама дескриптора, а одређен је по формули коју су навели Shannon и Weaver (1949). Генетички односи између генотипова црвене детелине за морфолошке маркере су анализирани помоћу анализе хомогености HOMALS (*Homogeneity analysis*). Матрица дистанци између парова генотипова на основу резултата примене морфолошких маркера, је конструисана на основу коефицијента сличности-*simple matching* (Sokal и Michener, 1958). UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) метода кластер анализе је коришћена за прављење дендрограма. За агрономске особине су израчунати дескриптивни статистички параметри, а примењена је једнофакторска анализа варијансе (ANOVA) по потпуно случајном блок систему, за сваку испитивану годину. На основу вредности агрономских особина одређен је Спирменов коефицијент корелације ранга и примењена је UPGMA кластер анализа и анализа главних компоненти PCA (*Principal Component Analysis*). За процену резултата примене молекуларних SSR маркера коришћена је анализа главних координата PCoA (*Principal Coordinate Analysis*) и анализа молекуларне варијансе (AMOVA). Генетичка матрица дистанци је била заснована на Dice коефицијентима (Nei и Li, 1979). Сагласност матрица дистанци генотипова добијених на основу агрономских особина, морфолошких и микросателитских маркера је тестирана помоћу Мантеловог теста (Mantel, 1967).

Поглавље **Резултати и дискусија** се састоји од осам потпоглавља. У потпоглављу **Морфолошки маркери генотипова црвене детелине** израчунат је Шенонов индекс диверзитета (H') за сваки морфолошки маркер (и један фенолошки маркер), као мера разноврсности у броју категорија и уравнотежености дистрибуције генотипова по категоријама маркера. Међу испитиваним генотиповима црвене детелине, највећи број генотипова је имао рано цветање (52%). Веома рано цветање је било присутно код 26% генотипова, а средње рано код 17% генотипова. Најмања заступљеност је установљена за генотипове са касним (2%) и веома касним цветањем (2%). Вредност Шеноновог индекса диверзитета за особину време цветања је износила 0,721. Према особини форма раста, генотипови су се раздвојили у пет категорија, при чему је доминирала средње усправна форма раста (54%), док су генотипови били неравномерно распоређени по преосталим класама овог дескриптора, па је вредност Шеноновог индекса диверзитета за форму раста износила 0,752. У погледу особине маљавости стабљике, доминирали су генотипови са слабо израженом (65%) и веома слабо израженом маљавошћу стабљике (26%). Средња и велика маљавост стабљике су биле заступљене са по 7% и 2%, док веома велика маљавости није била присутна код испитиваних генотипова, што се одразило и на вредност Шеноновог индекса диверзитета, који је за маљавост стабљике износио 0,642. У испитиваном сету генотипова црвене детелине само 2% генотипова је имало светло зелену боју листа, док су остали генотипови имали средње зелену (50%) и тамно зелену боју листа (48%). Вредност Шеноновог индекса диверзитета за боју листа је износила 0,712. Према интензитету обојености пеге на листу, генотипови су се сврстали у четири од укупно пет могућих категорија овог дескриптора, а јака обојеност пеге на листу није била међу заступљеним класама. Највећи је био удео генотипова са слабо обојеном пегом на листу (50%), док је мањи број генотипова имао врло слабу обојеност пеге листа (33%), средњу обојеност пеге листа (15%) и веома јаку обојеност пеге листа (2%). Вредност Шеноновог индекса диверзитета за обојеност пеге листа је износила 0,728. Просечан Шеноновог индекс диверзитета за посматране морфолошке особине и једну фенолошку особину је износио 0,711, и указао је на висок ниво варијабилности посматраних особина код испитиваних генотипова црвене детелине, и њихову корисност за успешну идентификацију, диференцијацију и разврставање генотипова црвене детелине. Применом HOMALS анализе утврђено је да су дескриптори маљавост стабљике, време цветања и интензитет обојености пеге на листу, имали дуже векторе и значајно, и позитивно и негативно учешће на осама, што их чини особинама велике варијабилности и дискриминационе моћи. На основу HOMALS анализе четири морфолошке особине и једне фенолошке особине за 46 генотипова црвене детелине конструисан је биплот, при чему је првом осом објашњено 38,4%, а другом осом 32,8% укупне варијабилности података проучаваних маркера. Анализирани генотипови црвене детелине су на основу сличности њихових профила морфолошких особина и једне фенолошке особине груписани у седам хомогених група. Извршено је и груписање генотипова на основу кластер анализе, применом UPGMA методе, а сви генотипови црвене детелине сврстани су у четири групе, превасходно на основу комбинација категорија две особине (време цветања и боја листа).

У потпоглављу **Агрономске особине генотипова црвене детелине**, једнофакторском анализом варијансе установљено је да утицај блокова није био значајан, а да је утицај генотипова на варијабилност посматраних агрономских особина био статистички високо значајан, у обе године испитивања. За биљке гајене 2011. године утврђено је да је број интернодија варирао је од 3,87 код генотипа SA3, до 8,53 код генотипа BGR3. Најмањи број грана забележен је код генотипа SA3 (2,83), а највећи код генотипа BGR3 (7,47). Генотип Krapo је имао најмању (32,67 cm), а генотип BGR3 највећу дужину стабљике по биљци (65,27 cm). Дебљина стабљике се кретала од 1,93 cm (Bjorn) до 4,95 cm (Triton). Дужина централне лиске имала је вредности од 21,97 cm (Bjorn) до 40,10 cm (NCPGRU2). Најмању ширину централне лиске остварио је генотип Bjorn (10,60 cm), а највећу SA3 (23,40 cm). Принос зелене масе кретао се од 40,33 g код генотипа Чортановци, до 319 g код генотипа NCPGRU2.

Најмањи принос суве материје измерен је код генотипа Renova (16,77 g), а највећи код генотипа NCPGRU2 (60,43 g). За биљке гајене 2012. године утврђено је да је највећа вредност броја интернодија измерена за генотип Kora (8,73), док је генотип SA3 карактерисала најмања вредност посматране особине (3,33). Дужина стабљике кретала се од 26,77 cm код генотипа 91 E-63, до 50,23 cm код генотипа HC-Млава. Најмањи принос зелене масе остварио је генотип SA3 (75,33 g), а највећи генотип HC-Млава (348 g). Интервал варирања приноса суве материје је био у опсегу 23,27 g (SA3)-130,80 g (Уна).

У потпоглављу **Хемијске особине генотипова црвене детелине** истакнуто је да је просечна вредност садржаја сирових протеина код 46 генотипова црвене детелине износила 16,22%. Најнижа вредност садржаја сирових протеина измерена је код генотипа Mercury (13,73%), а највиша код генотипа Triton (19,23%). Просечна вредност садржаја ADF је износила 35,59%. Најмањи садржај ADF је одређен код генотипа Bradlo (27,78%), а највећи код генотипа 89 E-0 (42,60%). Просечна вредност садржаја NDF је износила 47,57%. Најмања вредност садржаја NDF измерена је за генотип Bolognino (43,08%), а највећа вредност за генотип 89 E-0 (55,54%). У потпоглављу **Корелације између агрономских особина, и између агрономских и хемијских особина црвене детелине** утврђене су вредности Спирменовог коефицијента корелације ранга. За 2011. годину, највећи коефицијент корелације је утврђен између броја интернодија и броја грана, а био је позитиван и статистички високо значајан ($r = 0,97^{***}$). Такође, позитивна, веома јака и статистички високо значајна корелација је утврђена између приноса зелене масе и приноса суве материје ($r = 0,95^{***}$). Дужина централне лиске и ширина централне лиске су особине које су биле у јакој, позитивној и статистички високо значајној корелацији ($r = 0,77^{***}$). Корелације између броја интернодија и дужине стабљике ($r = 0,68^{***}$), броја грана и дужине стабљике ($r = 0,64^{***}$), дужине стабљике и приноса суве материје ($r = 0,60^{***}$) су биле јаке, позитивне и статистички високо значајне. За 2012. годину, највећи коефицијент корелације утврђен је између приноса зелене масе и приноса суве материје ($r = 0,86^{***}$). Позитивна, јака и статистички високо значајна корелација је утврђена између дужине стабљике и приноса зелене материје ($r = 0,62^{***}$). Слаба, негативна и статистички значајна корелација је утврђена за број интернодија и NDF ($r = -0,3^{*}$). У потпоглављу **Анализа главних компоненти (РСА) агрономских и хемијских особина црвене детелине**, РСА биплотом је објашњено 74% варијансе стандардизованих података. На биплоту за 2011. годину се издвојило седам група генотипова, док су се на биплоту за 2012. годину издвојило шест група генотипова. У потпоглављу **Кластер анализа агрономских и хемијских особина црвене детелине**, утврђено је да су се на UPGMA дендрограму кластер анализе 46 генотипова црвене детелине, на основу осам агрономски значајних особина измерених у 2011. години, издвојила два кластера. На UPGMA дендрограму кластер анализе 46 генотипова црвене детелине, на основу четири агрономске и три хемијске особине за 2012. годину, издвојила су се четири кластера. Груписање генотипова није било у складу са географским пореклом.

У потпоглављу **Генетичка варијабилност микросателитских (SSR) молекуларних маркера за генотипове црвене детелине**, утврђено је да је 14 парова прајмера амплификовало укупно 187 алела, просечно 13,36 алела по локусу. Највећи број алела је био 35, за маркер RCS0078, док је најмањи број алела износио 4 и утврђен је за маркер RCS0685. Трећина укупног броја локуса имала је осам и више алела. Фреквенције алела за 14 SSR локуса су биле у опсегу од 0,062 (маркер RCS0078) до 0,391 (маркер RCS1667). Код анализираних генотипова црвене детелине само су били присутни умерено чести алели (са фреквенцијама од 0,05-0,50), док ретки алели са фреквенцијама мањим од 0,05, као и чести алели са фреквенцијама већим 0,50, нису били заступљени. Амплификовани фрагменти ДНК налазили су се у различитим опсезима за различите SSR маркере, при чему су најмање вредности опсега биле за маркер RCS0252 (11 bp), а највеће за маркер RCS0793 (70 bp). PIC вредност (*Polymorphism Information Content*) је показатељ моћи одређеног маркера да детектује полиморфизам у популацији. Највећа PIC вредност је износила 0,482 и то за маркер RCS1667, а најмања је била 0,116 и карактерисала је маркер RCS0078. Маркери са

динуклеотидним мотивима су просечно имали већу полиморфност (0,43) од маркера са тринуклеотидним мотивима (0,32), као и у односу на маркер RCS0031 са тетрануклеотидним мотивом (0,17). Кластер анализа SSR молекуларних података црвене детелине резултовала је груписањем генотипова црвене детелине у две групе тј. два кластера. Груписање генотипова није било у складу са географским пореклом. Анализом главних координата (PCoA) 46 генотипова црвене детелине на основу SSR маркера, првом и другом осом објашњено је укупно 19,3% генетичке варијабилности оригиналног сета података. У груписању генотипова на основу SSR маркер анализе, уочени су следећи генотипови, који су генетички одступали по својим молекуларним подацима, у односу на већину осталих генотипова, а били су груписани око координатног средишњег дела PCoA биплота: Чортановци, 91 E-63, NCPGRU4, Виолета, Nessonas, Уна, 91 E-44, Violetta, Marino. Резултати PCoA анализе су били у сагласности са резултатима добијеним на основу кластер анализе. Применом AMOVA анализе засноване на резултатима примене SSR маркера код генотипова црвене детелине, груписаних на основу типа (сорта или популација) и плоидности ($2n$ или $4n$), утврђено је постојање статистички значајне ($P < 0,05$) међу-групне диференцијације. Генетичка дистанца изражена Φ_{ST} индексом између група, одређених на основу типа и плоидности генотипова црвене детелине, је била слаба, и износила је 0,0124, а указивала је на слабу генетичку диференцијацију ове две групе. У потпоглављу **Сагласност резултата добијених на основу морфолошких, агрономских, хемијских и SSR молекуларних података**, истакнуто је да је најмања просечна генетичка удаљеност утврђена на основу агрономских особина (0,380), већа на основу морфолошких дескриптора (0,587), а највећа на основу молекуларних маркера (0,623). Статистички значајна позитивна корелација је утврђена између матрица дистанци морфолошких и агрономских особина, као и између матрица дистанци морфолошких у односу на агрономске и хемијске особине. Генотипови сличних морфолошких особина истовремено су показали и одређену сличност на нивоу агрономских особина 2011. године, као и на нивоу хемијских и агрономских особина 2012. године, односно генотипови сличних морфолошких профила показују, у извесној мери, и сличне агрономске и хемијске карактеристике. Утврђено је одсуство корелација матрице дистанци на основу SSR маркера у односу на све друге матрице удаљености, указујући на то да су одабрани SSR маркери слабо рефлектовали односе између генотипова утврђене на основу фенотипских особина.

У поглављу **Закључак** кандидаткиња је у кратким тезама изнела најрелевантније чињенице до којих је дошла на основу свог истраживања. Просечна вредност Шеноновог индекса диверзитета за четири морфолошке и једну фенолошку особину је износила 0,711, што представља показатељ високог нивоа диверзитета међу генотиповима црвене детелине за ове особине. Анализом хомогености извршено је груписање генотипова црвене детелине на седам умерено хомогених група и то на основу особина: време цветања, интензитет обојености пеге листа и делимично на основу особине маљавости стабљике. UPGMA кластер анализом је извршено груписање генотипова црвене детелине на четири кластера и то на основу времена цветања и боје листа, уз мањи допринос и осталих особина. HOMALS анализа је омогућила да се јасно издвоје генотипови црвене детелине (NCPGRU2, Kora, BGR2, Vivi, Krano), који су имали јединствене профиле на основу морфолошких особина и једне фенолошке особине, у односу на хомогене групе. HOMALS метода се показала као информативнија у односу на UPGMA кластер анализу, јер је јасније приказала морфолошку варијабилност испитиваног материјала.

Анализом варијансе установљено је да је утицај генотипова црвене детелине на варијабилност посматраних агрономских особина био статистички високо значајан за обе испитиване године. Између свих испитиваних агрономских особина црвене детелине у првој години истраживања су утврђене позитивне корелације, а највећи статистички значајни коефицијенти корелације су утврђени између броја интернодија и броја грана ($r = 0,97^{***}$), као и између приноса зелене масе и приноса суве материје ($r = 0,95^{***}$). Највећи, статистички значајан коефицијент корелације између агрономских особина генотипова црвене детелине у другој години истраживања, је такође утврђен између приноса зелене масе

и приноса суве материје ($r = 0,86^{***}$). Слаба, негативна и статистички значајна корелација је утврђена за број интернодија и садржај влакана нерастворљивих у неутралном детергенту ($r = -0,3^*$). Применом PCA и кластер анализе, на основу агрономских и хемијских особина, груписање генотипова црвене детелине се није могло довести у везу са географским пореклом. Перспективни генотипови са повољним агрономским особинама и особинама квалитета су: Amos, BGR3, Fertody, Kora, Марина, Quinekel, Triton, Уна и Vivi.

Утврђена је значајна полиморфност коришћених SSR маркера. Четрнаест парова прајмера амплификовало је укупно 187 алела, просечно 13,36 алела по локусу, а трећина од укупног броја локуса је имала осам и више алела. Највећу фреквенцију алела имао је маркер RCS0078 (0,062), а најмању маркер RCS1667 (0,391), док је просечна фреквенција алела износила 0,206. PIC вредност проучаваних SSR локуса је била у распону од 0,12 (маркер RCS0078) до 0,48 (маркер RCS1667), а просечна вредност је износила 0,306. На основу анализе главних координата и кластер анализе микросателитских података, груписање генотипова било је сагласно на основу обе примењене статистичке методе. На основу AMOVA анализе засноване на резултатима примене SSR маркера генотипова црвене детелине груписаних на основу морфолошких, агрономских и хемијских особина, није утврђено постојање статистички значајне међу-групне диференцијације. Груписање на основу статуса и нивоа плоидности је било статистички значајно ($p < 0,05$), али међу-популационо раздвајање је било слабо изражено ($\Phi_{ST} = 0,01236$). Најмања просечна генетичка удаљеност генотипова црвене детелине је износила 0,380, и утврђена на основу агрономских особина. Просечна генетичка дистанца утврђена на основу морфолошких дескриптора је била већа (0,587), док је највећа генетичка дистанца добијена на основу резултата примене молекуларних маркера (0,623). Резултати Мантел теста су показали да није било статистички значајне корелације SSR матрице дистанци у односу на матрице дистанци морфолошких, агрономских и хемијских особина црвене детелине. Статистички значајна позитивна корелација је утврђена између матрице дистанци морфолошких особина у односу на матрице агрономских и хемијских особина, што је показало да генотипови сличних морфолошких профила показују у извесној мери и сличне агрономске и хемијске карактеристике.

У поглављу **Литература** дат је списак од 149 наведених референци, сложених по абecedном реду, написаних у складу са стандардима за навођење, а које се односе на тему истраживања и радове који су послужили за поређење сопствених резултата са резултатима других аутора.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Ирене Радиновић, дипл. биолога, под насловом: „Варијабилност генотипова црвене детелине на основу агрономских особина, морфолошких и микросателитских маркера“, представља оригиналан и самосталан научни рад из генетике и оплемењивања црвене детелине. Радам на докторској дисертацији остварени су резултати према постављеним циљевима истраживања у пријави докторске дисертације, а који су се односили на карактеризацију морфолошких маркера по UPOV дескриптору и евалуацију агрономских особина ради сагледавања фенотипске варијабилности и дивергентности генотипова црвене детелине, и на утврђивање параметара генетичког диверзитета и одређивање дивергентности генотипова црвене детелине применом микросателитских маркера. Такође су одређени и параметри квалитета тј. садржај сирових протеина, садржај ADF и садржај NDF, корелације између свих проучаваних особина, и одређена је сагласност добијених матрица дистанци генотипова црвене детелине на основу морфолошких и микросателитских маркера, агрономских и хемијских особина. Истраживања у докторској дисертацији обављена су у потпуности према програму предвиђеном у пријави докторске дисертације.

Одабрана тема је значајна како са научног, тако и са практичног становишта. Резултати добијени у овој докторској дисертацији имају научни допринос у сагледавању

генетичке и фенотипске варијабилности и дивергентности генотипова црвене детелине са аспекта агрономских и хемијских особина, морфолошких и микросателитских маркера, као и у одређивању хијерерхије значајности матрица дистанци између генотипова, добијених на основу четири типа проучаваних особина, а све у циљу одабира најперспективнијих парова генотипова и најадекватнијег приступа у пред-оплемењивачком раду, ради даљег успешног оплемењивања. Просечна генетичка дистанца генотипова црвене детелине добијена на основу анализе агрономских особина је износила 0,380, и била је мања у односу на генетичке дистанце израчунате на основу морфолошких маркера (0,587) и микросателитских маркера (0,623). На основу молекуларне анализе проучаваних генотипова утврђен је висок полиморфизам SSR локуса. Груписање генотипова на основу резултата примене SSR маркера није било у сагласности са њиховим географским пореклом. Анализа молекуларне варијансе на основу статуса (сорта или популација) и плоидности је указала на слабу генетичку диференцијацију група формираних на основу статуса и плоидности ($\Phi_{ST} = 0,0124$). Позитивна статистички значајна корелација је утврђена између матрице дистанци морфолошких особина (и једне фенолошке) и матрице дистанци агрономских особина, као и између матрице дистанци морфолошких у односу на матрицу дистанци агрономских и хемијских особина.

Имајући у виду реализацију програма истраживања, извршену анализу добијених резултата и закључке, као и значај ових истраживања за генетику и оплемењивање црвене детелине, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију дипл. биолога Ирене Радиновић, под насловом: „Варијабилност генотипова црвене детелине на основу агрономских особина, морфолошких и микросателитских маркера“, и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да усвоји ову позитивну оцену, и да кандидату омогући да приступи јавној одбрани докторске дисертације.

Београд, 28.11.2016.

Чланови Комисије:

др Гордана Бранковић, доцент, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду (ужа научна област: генетика)

др Сања Васиљевић, виши научни сарадник, Институт за ратарство и повртарство у Новом Саду (ужа научна област: генетика и оплемењивање биљака)

др Томислав Живановић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду (ужа научна област: генетика)

др Славен Продановић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду (ужа научна област: оплемењивање биљака)

др Ђура Карагић, виши научни сарадник, Институт за ратарство и повртарство у Новом Саду (ужа научна област: семенарство)

Објављени рад дипл. биолога Ирене Радиновић (девојачко Ћалић) у часопису који се налази на SCI листи:

Ahsyee, R.S., Vasiljević, S., Ćalić, I., Zorić, M., Karagić, Đ., Šurlan-Momirović, G. (2014): Genetic diversity in red clover (*Trifolium pretense* L.) using SSR markers. Genetika 46(3): 949-961.

<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0534-0012/2014/0534-00121403949A.pdf>