

НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Датум: _____

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације мр Ратибора Штрбановића

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду од **27. јануара 2016.** године, именовани смо у Комисију за оцену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата мр Ратибора Штрбановића под насловом: «Идентификација сората луцерке применом молекуларних маркера у почетним фазама развића биљака», па пошто смо проучили завршену докторску дисертацију, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација мр Ратибора Штрбановића написана је на 96 страница, у оквиру којих се налази 14 табела, 9 графикона и 12 слика. Испред основног текста налази се резиме са кључним речима на српском и енглеском језику, као и приказ садржаја. У докторској дисертацији је цитирано и у литератури наведено 153 референци.

Дисертација се састоји из следећих поглавља: 1. Увод (стр. 1-7), 2. Циљ истраживања (стр. 8), 3. Преглед литературе (стр. 9-17), 4. Радна хипотеза (стр. 18), 5. Материјал и методе (стр. 19-32), 6. Резултати истраживања и дискусија (стр. 33-77), 7. Закључак (стр. 78-79) и 8. Литература (стр. 80-96).

2. Приказ и анализа докторске дисертације

У **Уводу** докторске дисертације Ратибора Штрбановића истиче се значај и распрострањеност луцерке како у Србији тако и у свету. Напоменуто је да је за успешну селекцију неопходно стално уводити нови селекциони материјал и користити га преко разних видова хибридизације за повећање постојеће варијабилности. У уводу је поменута и примена молекуларних метода које се данас користе, примена теста убрзаног старења семена који даје веома значајне информације о квалитету семена појединих биљних врста, као и најштетније фитопатогене гљиве које се јављају на луцерки.

У поглављу **Циљ истраживања** овог рада је био да се испитивањем десет различитих сората луцерке одреди варијабилност и груписање сродних генотипова луцерке применом *ISSR* и *RAPD* молекуларних маркера. Применом теста убрзаног старења код десет различитих сората луцерке и по три партије од сваке сорте, утврдити значајност између партија семена, као показатељ животне способности семена луцерке. Испитивањем здравственог стања семена утврдиће се толерантност према патогенима и утицај локалитета (партије семена) на варијабилност патогена семена исте сорте. Циљ ове докторске дисертације је такође коначан избор најбољих генотипова који ће послужити као родитељи за стварање нових сорти луцерке.

У поглављу **Преглед литературе** изнети су доступни литерарни извори из области која је предмет проучавања ове докторске дисертације. У овом поглављу кандидат даје комплетан историјски преглед оплемењивања луцерке, употребе молекуларних маркера на мапирању генома луцерке као и утврђивање нивоа генетичког диверзитета, што је веома битно за оплемењиваче јер представља основу за селекцију супериорних родитељских

комбинација. Поменут је и појам убрзано старење семена као један од најкориснијих тестова који се користи за процену животне способности семена. Такође, поменут је и значај фитопатогених гљива које су главни агенси који изазивају прогресивни пад продуктивности луцерке.

Мр Ратибор Штрбановић је у **Радној хипотези** полази од претпоставке да је одабрани материјал довољно дивергентан у погледу броја алела на већем броју локуса који ће се одредити *ISSR* и *RAPD* маркерима. Очекује се високи ниво полиморфности у анализираним локусима, као и да ће подела испитиваних генотипова на групе бити у сагласности са њиховим пореклом. На основу вредности проучаваних карактеристика и њихових разлика издвојиће се сорте са пожељним особинама. Те сорте могу да послуже као родитељске компоненте у даљем раду на оплеменењању луцерке на основу хијерархијске кластер анализе и да ће на основу формираних дендограма издвојити најбољи генотипови луцерке за даља истраживања. Очекује се да ће се такође утврдити разлике између партија семена исте сорте луцерке као и разлике између сората на основу теста убрзаног старења семена. Претпоставка је да ће се утврдити различита заступљеност најзначајнијих патогена на различитим партијама семена појединачних сорти као и на различитим сортама луцерке.

У поглављу **Материјал и методе** рада кандидат је приказао да је за испитивање у овом раду одабрао 10 сората луцерке: Крушевачка 22 и Крушевачка 28 селекционисане у Институту за крмно биље у Крушевцу, НС-Банат ЗМС II и НС-Медиана ЗМС V селекционисане у Институту за ратарство и повртарство из Новог Сада, Зајечарска 83 селекционисана у Институту за пољопривредна и технолошка истраживања у Зајечару, Чачанка 10 селекционисана на Агрономском факултету у Чачку, Бањалучанка селекционисана на Пољопривредном Институту Републике Српске у Бања Луци и Осјечка 66, Осјечка 88 и Осјечка 99 селекционисане на Пољопривредном Институту у Осјеку. Од сваке наведене сорте луцерке узете су по три различите партије. Жетва семена свих сората луцерке је из рода 2013. године. У циљу реализације ове докторске дисертације, експерименти су постављени у акредитованим лабораторијама Института за заштиту биља и животну средину у Београду. По 100 семена свих 10 (десет) сората луцерке постављено је на наклијавање у Петри шоље и стављено у клијалиште са наизменичном температуром од 20 °C у тами у трајању од 16 h и 30° C на светлу у трајању од 8 h. Семе је наклијавано седам дана. За екстракцију ДНК из биљног материјала коришћени су први зелени листићи клијанаца луцерке (котиледони). Екстракција ДНК из биљног материјала извршена је модификованом *CTAB* методом (Doyle and Doyle, 1990). Умножавање ДНК фрагмената је обављено у *PCR* апарату (Eppendorf Master Cycler, Hamburg, Немачка). Добијени *PCR* продукти су раздвојени електрофорезом на 1 % агарозном гелу у ТЕ пуферу.

За *ISSR* анализу ДНК је умножена коришћењем два прајмера (GACA)₄ и (TGTC)₄. За *RAPD* анализу коришћена су четири прајмера OPA 01, OPA 02, OPA 13 и OPB 10.

Статистичка анализа резултата бинарних података је укључила израчунавање генетичке сличности између генотипова луцерке, мултиваријациону анализу матрице удаљености генотипова помоћу нехијерархијске кластер анализе и анализе главних координата (PCoA) и анализу молекуларне варијансе (AMOVA). За анализу података добијених молекуларном карактеризацијом коришћени су статистички програми за популационо-генетичке анализе. Позиције трака посматране су кроз бинарни систем података и затим претварани у генетичке дистанце Рестдист програмом по методи (Nei and Li, 1979), а затим је конструисано филогенетско стабло коришћењем UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) алгорита, све у оквиру програмског пакета FILIP (Felsenstein, 1993).

Добијени обрађени подаци различитих сората луцерке израчунати су анализом варијансе ANOVA и AMOVA, а разлике између третмана су тестиране применом Данкановог теста (Duncan's multiple range test) и приказани су табеларно и графички.

Такође је урађено *Neighbor-Joining* стабло формирано на основу спаривања суседних генотипова на темељу матрице генетичке удаљености тих генотипова луцерке.

У овој докторској дисертацији је урађен тест убрзаног старења семена. Тест убрзаног старења семена је обављен у воденом купатилу TW 20, постављањем семена свих партија испитиваних сората луцерке у 4 понављања на металну мрежицу, која је постављена непосредно изнад површине воде у воденом купатилу. Семе сваке партије испитиваних сората изложено је условима високе релативне влажности ваздуха (98-100%), температури од 41 и 45 °C у трајању од 24, 48, 72, 96 и 120 h. Тест убрзаног старења семена рађен је и по стандардној и по модификованој методи. Семена у оквиру сваке партије, постављена су на наклијавање у клијалиште (4 x 100 семена). Очитавање клијавости обављено је после 10 дана од стављања семена на клијање и утврђена је укупна клијавост у процентима, према наведеном Правилнику. Испитивање здравственог стања семена утврђено је према Правилнику о квалитету семена пољопривредног биља (Сл. лист СФРЈ, бр. 47/87, 1987). За испитивање је узето 4 x 100 семена од сваке сорте луцерке. Узорци су стављени у клијалиште на температуру од 20 °C, са наизменичним осветљењем, 12 h без осветљења и 12 h са ултравиолетним осветљењем (UV) таласне дужине 360 nm. Испитивање је обављено после 7 дана од дана стављања на инкубацију.

Поглавље **Резултати истраживања и дискусија** представљају најважнији део докторске дисертације. Резултати истраживања се састоје од 3 потпоглавља. У првом потпоглављу *Примена молекуларних маркера луцерке* је рађена примена *ISSR* и *RAPD* код десет сората луцерке. Филогенетско стабло за *ISSR* ДНК профиле са (GACA)₄ прајмером добијено на основу матрица дистанци коришћењем UPGMA алгорита састојало се од два кластера. Први кластер је подељен на два подкластера, један је чинила сорта Зајечарска 83 и други који се састојао од сорти Чачанка 10, Осјечка-88 и Крушевачка-28. Други кластер су образовале сорте Бањалучанка, Осјечка-99, Осјечка-66, НС-Медиана и НС-Банат које су биле груписане у подкластер, док је сорта Крушевачка-22 била издвојена.

Примећено је да се у *RAPD* анализи генома биљака могу пратити репетитивне секвенце које чине значајан део генетичког материјала. На основу *RAPD* ДНК профила може се видети раздвајање ДНК фрагмената различите величине од 100 bp до 3 kb. На гелу на коме се налазе различите сорте луцерке са прајмером OPB 10, могу се уочити разлике између сората луцерке. Јасно се види да се сорта луцерке Зајечарска 83 разликује од свих осталих сората луцерке по броју трака.

Конструкцијом дендограма различитих сората за *RAPD-PCR* ДНК профиле добијен на основу матрица дистанци коришћењем UPGMA алгорита састојао се од два кластера. Први кластер укључује сорте Бањалучанка, НС-Медиана, Крушевачка 22 и Крушевачка 28, при чему су сорте НС-Медиана, Крушевачка 22 и Крушевачка 28 издвојене у посебан субкластер. Други кластер је подељен на два подкластера. Први подкластер је садржао сорте луцерке Осјечка 66, Осјечка 88 и Осјечка 99 а други подкластер чине сорте НС-Банат, Чачанка 10 и Зајечарска 83. Такође је и овде анализа показала да су сорте луцерке селекционисане у Институту у Крушевцу и Институту у Осијеку генетички најсродније. Кластер дијаграм добијен анализом свих проучаваних молекуларних маркера састоји се од 4 групе кластера. У четвртој групи се издвојила сорта Зајечарска 83 која се показала као генетички најудаљенија сорта од свих осталих сорти.

У докторској дисертацији је такође израчуната генетичка дистанце између десет проучаваних генотипова луцерке чије су се вредности кретале у интервалу од 0,097 до 0,310. Најмања генетичка дистанца забележена је између сората НС-Банат и Крушевачка 22 (0,097), као и између сората Крушевачка 22 и Чачанка 10 (0,107), док је највећа генетичка дистанца забележена између сората Зајечарска 83 и Бањалучанка (0,308), као и између сората Зајечарска 83 и НС-Банат (0,310).

У дисертацији је урађено *Neighbor-Joining* стабла формираног на основу спаривања суседа на темељу матрице генетичке удаљености генотипова луцерке. Међусобно су најсличнији генотипови Крушевачка 22 и НС-Банат као и Крушевачка 28 и Осјечка 66. Такође се можемо уочити из *Neighbor-Joining* стабла да је генотип Зајечарска 83 генетички најудаљенији од свих осталих генотипова.

Анализа главних координата (PCoA) користи се за идентификацију мултидимензионалних односа који описују делове генетичке варијабилности датих података. У анализи главних координата прве и друге осе објасниле су укупно 63,1 % генетичке варијабилности садржане у оригиналном сету података. На PCoA графикону такође се може видети да је генотип Зајечарска 83 генетички најудаљенији од осталих проучаваних генотипова луцерке.

Применом анализа молекуларне варијансе (AMOVA) испитана је дистрибуција генетичке варијације између и у оквиру две географске групе генотипова луцерке. Утврђен је велики проценат унутар групне варијације (98,22 %), указује да је материјал добар за даљу селекцију и мали проценат варијације између група (1,78 %), што указује да посматране сорте луцерке из различитих географских група углавном поседују генетички сродан материјал, али и да свака група располаже довољном генетичком варијабилношћу која може бити употребљена у будућим програмима оплемењивања луцерке.

У другом потпоглављу *Примена теста убрзаног старења семена луцерке* је анализирана примена теста убрзаног старења семена на различитим сортама и партијама луцерке. Применом стандардног теста убрзаног старења на температури од 41 °C након излагања семена времену од 72 h на свим испитиваним сортама било је могуће детектовати партије семена које су биле виталније од других. При примени теста убрзаног старења на температури од 41 °C, након првог времена излагања од 24 h, између сората је утврђена већа варијабилност (CV=13.44 %) од варијабилности утврђене при наредним временима (48 h CV=8.49 %; 72 h CV=9.01 %; 96 h CV=7.80 %). То се може приписати присуству тврдих семена која су карактеристична за луцерку. Генерално сорта луцерке Зајечарска 83 (просек за три локалитета) показала је највећу клијавост (83 % након 72 h и 61 % након 96 h), међутим нејасно је да ли је то резултат аридних услова који владају у источној Србији (Бољевац, Велики Извор и Минићево) или је то сортна особина. Применом стандардног теста убрзаног старења на температури од 45 °C и након времена излагања семена у трајању од 24 h ни на једној партији од десет сорта луцерке није било могуће детектовати партије које су биле виталније од других. То указује да семе није упило влагу из ваздуха, односно да је био повећан број тврдих семена. Међутим применом стандардног теста убрзаног старења на температури од 45 °C и након времена излагања семена у трајању од 48 h на свим испитиваним сортама луцерке било је могуће детектовати партије семена које су биле виталније од других. Продужење трајања теста старења у времену од 72 h и 96 h при истој температури (45 °C) јасно је показало које сорте, посебно које партије имају бољи потенцијал за сетву и/или чување семена и коришћење у наредним годинама. Применом модификованог теста убрзаног старења у испитивањима на температури од 41 °C у периоду од 24 h, 48 h, 72 h, 96 h и 120 h није дошло до значајних разлика (Duncan's test; $P \geq 0.05$) које би на десет испитиваних сората омогућиле детектовање виталнијих партија семена. Ни период од 24 h до 120 h није омогућило детектовање разлика ни за једну партију семена луцерке. Примена теста убрзаног старења по модификованој методи и на вишој температури (45 °C) са временом трајања од 120 h било је могуће одредити виталније партије семена код свих испитиваних сората луцерке. Клијавост након теста убрзаног старења показала је да су се сорте (просек три локалитета) након испитиваног времена трајања теста веома мало разликовале (24 h CV = 1,64 %; 48 h CV = 0,75 %; 72 h CV = 0,79 % и 96 h CV = 1,38 %) осим најдужег времена које је омогућило и детектовање виталнијих партија (120 h CV = 4,51 %). Испитивањима је утврђено да је применом адекватног теста убрзаног старења на семену

луцерке могуће детектовати виталније семе сората а посебно партија појединих сората. Испитивањем је унапређена метода која је адекватна и даје валидне резултате за семе луцерке, а која је потврдила и резултате добијене стандардним тестом убрзаног старења. Резултати о животној способности партија семена луцерке омогућавају доношење правилне одлуке о томе које семе ће задржати дуже клијавост односно које ће моћи да се успешније користи у наредним годинама, сетвеним роковима и/или које ће дати униформнији усев по заснивању.

У трећем потпоглављу **Испитивање здравственог стања семена луцерке** је испитивано здравствено стање семена луцерке. Оцена здравственог стања испитиваног семена луцерке урађена је на основу прегледа клијанаца. Детерминација присутних гљива извршена је на основу морфолошких одлика, посматрањем под микроскопом. У зависности од сората, (просек три локалитета-партија) присуство гљиве *Alternaria* spp. на клијанцима је утврђено од 0,17 % код сорте луцерке НС Банат, до 3,58 % код сорте Зајечарска 83. Највећа заступљеност ове гљиве утврђена је на семену сорте Зајечарска 83, са локалитета Велики Извор (6,75 %). Са друге стране, на већини испитиваних локалитета ова гљива није уопште детектована. Гљива *Fusarium* spp. утврђена је на сорти Зајечарска 83 (0,25 %), а на сортама Крушевачка 28, НС-Банат, НС-Медиана, Бањалучанка и Осјечка 88 на клијанцима уопште је није било. Патоген је највише детектован на клијанцима семена сорте Осјечка 99 са локалитета Осијек (1,25 %). Клијанци из семена сорте Зајечарска 83 показали су највећу осетљивост према гљиви *Mucor* spp. (8,67 %), где је на истој сорти са локалитета Велики Извор утврђен и максимално детектован проценат гљиве (15,5 %). Најмање присуство гљиве детектовано је на клијанцима сората Крушевачка 28 и Крушевачка 22 (0,08 % односно 0,33 %). За гљиву *Rhizopus* spp. се може констатовати да је најмање била на клијанцима луцерке, са обзиром да је пронађен само на сорти Осјечка 99 и то на локалитету Широко Поље (2,50 %). На клијанцима из семена сората са других локалитета није утврђено присуство ове гљиве. Након испитивања клијавости и здравственог стања семена десет различитих сората и партија луцерке коефицијентима простих корелација (r) утврђена је међузависност између испитиваних особина. Детектоване гљиве на семену луцерке су утицале на смањење укупне клијавости на шта указује негативна корелациона међузависност. Значајну ($P \leq 0,05$) и негативну међузависност са клијавошћу су оствариле гљиве на клијанцима: *Rhizopus* spp. ($r = -0,444$) и *Penicillium* spp. ($r = -0,415$), док су негативну међузависност али не и статистички значајну ($P \geq 0,05$) са клијавошћу оствариле гљиве: *Alternaria* spp. ($r = -0,130$), *Fusarium* spp. ($r = -0,274$), и *Mucor* spp. ($r = -0,225$). Такође значајну ($P \leq 0,05$) и негативну корелацију остварила је *Alternaria* spp. са *Penicillium* spp. ($r = -0,420$) и са *Rhizopus* spp. ($r = -0,433$). Најјача муђузависност ($P \leq 0,001$) и то позитивна остварена је између *Penicillium* spp. и *Rhizopus* spp. ($r=0,596$). Резултати испитивања присуства врста гљива на семену различитих сората луцерке у значајној су сагласности са подацима других аутора (Krnjaja i sar., 2011). Због велике штетности које врсте овог рода могу нанети гајеним биљкама различитих фамилија и родова, присуству овог патогена на семену луцерке треба посветити већу пажњу. Пре свега радити на поузданим методама њене детекције, укључујући и молекуларне методе, али и пратити њен развој и ширење у усевима луцерке. У усеви луцерке *Fusarium* spp. проузрокује њено веће што даљим развојем патогена доводи до сушења читавих биљака (Lević, 2008).

У поглављу **Закључак** кандидат је у кратким тезама изнео најрелевантније чињенице до којих је дошао на основу својих проучавања. На гелу на коме се налазе различите сорте луцерке са прајмером OPB 10, могу се уочити разлике између сората луцерке. Јасно се види да се сорта луцерке Зајечарска 83 разликује од свих осталих сората луцерке по броју трака. Такође се уочава постојање заједничких трака од 300 bp код свих сората осим код сорте Зајечарска 83. Сорте Осјечка 99, Осјечка 88 и Осјечка 66 показују висок ниво међусобне сличности, као и сорте Крушевачка 22 и Крушевачка 28.

На основу резултата добијених молекуларном методом *ISSR* и коришћењем прајмера $(GACA)_4$ и $(TGTC)_4$ потврђене су разлике између испитиваних сората луцерке. Овом методом је утврђено да су сорте у великој мери сличне, али да постоје траке које су карактеристичне за сваку од њих.

Генетичке дистанце између десет проучаваних генотипова луцерке кретале су се у интервалу од 0,097 до 0,310. Најмања генетичка дистанца забележена је између сората НС-Банат и Крушевачка 22 (0,097), као и између сората Крушевачка 22 и Чачанка 10 (0,107), док је највећа генетичка дистанца забележена између сората Зајечарска 83 и Бањалучанка (0,308), као и између сората Зајечарска 83 и НС-Банат (0,310).

У анализи главних координата (PCoA) прве и друге осе објасниле су укупно 63,1 % генетичке варијабилности садржане у оригиналном сету података. Јасно се може видети да је генотип Зајечарска 83 генетички најудаљенији од осталих проучаваних генотипова луцерке.

Анализом молекуларне варијансе (AMOVA) у укупној варијацији знатно веће варирање било је резултат диференцијације у оквиру група (98,22 %), него диференцијације између група (1,78 %), указујући да посматране географске групе углавном поседују генетички сродан материјал, али и да свака група располаже довољном генетичком варијабилношћу која може бити употребљена у будућим програмима оплемењивања луцерке.

Применом адекватног теста убрзаног старења на семену луцерке могуће је детектовати виталније семе сората, а посебно партија појединих сората. У погледу применљиво развојних истраживања резултати о животној способности партија семена луцерке омогућавају доношење правилне одлуке о томе које ће партије дуже задржати клијавост и које ће се успешније користи у наредним годинама, односно сетвеним роковима.

Утврђене гљиве на семену луцерке утицале су на смањење укупне клијавости на шта указује негативна корелациона међузависност. Значајну ($P \leq 0,05$) и негативну међузависност са клијавошћу су оствариле гљиве на клијанцима: *Rhizopus* spp. ($r = -0,444$) и *Penicillium* spp. ($r = -0,415$). Такође значајну ($P \leq 0,05$) и негативну корелацију је остварила *Alternaria* spp. са *Penicillium* spp. ($r = -0,420$) и са *Rhizopus* spp. ($r = -0,433$). Најјача муђузависност ($P \leq 0,001$) и то позитивна је остварена између *Penicillium* spp. и *Rhizopus* spp. ($r=0,596$).

Ова истраживања су потврдила да проучавана колекција сорти луцерке поседује варијабилност неопходну за успешан селекциони процес. Оплемењивачки материјал поседује пожељне особине за оплемењивање нових сорти и уз избор одговарајућег модела оплемењивања могуће је селекционисање сорти за одређене намене.

У поглављу **Литература** наведен је списак од 153 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 Ратибора Штрбановића, под насловом: «Идентификација сората луцерке применом молекуларних маркера у почетним фазама развића биљака» представља оригиналан научни рад из генетике, оплемењивања луцерке и семенарства.

Циљ овог рада је да се испитивањем десет различитих сората луцерке одреди варијабилност и груписање сродних генотипова луцерке применом *ISSR* и *RAPD* молекуларних маркера, што је ова колекција и потврдила.

Такође је применом теста убрзаног старења утврђена значајност између партија семена, као показатељ животне способности семена луцерке. Испитивањима је утврђено да је применом адекватног теста убрзаног старења на семену луцерке могуће детектовати виталније семе сората а посебно партија појединих сората луцерке.

Испитивањем здравственог стања семена утврђена је толерантност према патогенима и утицај локалитета (партије семена) на варијабилност патогена семена исте сорте. Утврђене гљиве на семену луцерке утицале су на смањење укупне клијавости на шта указује негативна корелациона међузависност.

Истраживања у докторској дисертацији обављена су у потпуности према програму предвиђеном у пријави. Посебно треба истаћи да резултати које је кандидат добио у својим истраживањима представљају оригинална решења и драгоцено искуство за даљи оплемењивачки рад на луцерки.

Узимајући у обзир све наведено, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију мр Ратибора Штрбановића, под насловом: «Идентификација сората луцерке применом молекуларних маркера у почетним фазама развића биљака», и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да ову оцену усвоји, чиме би си пружила могућност кандидату да приступи јавној одбрани ове докторске дисертације.

Чланови Комисије:

Др Томислав Живановић, ред. проф. Пољопривредног факултета
Универзитета у Београду (ужа научна област генетика)

Др Гордана Шурлан-Момировић, ред. проф. у пензији
Пољопривредног факултета Универзитета у Београду (ужа
научна област генетика)

Др Славољуб Лекић, ван. проф. Пољопривредног факултета
Универзитета у Београду (ужа научна област семенарство)

Др Славен Продановић, ред. проф. Пољопривредног факултета
Универзитета у Београду (ужа научна област оплемењивање
биљака)

Др Гордана Бранковић, доцент Пољопривредног факултета
Универзитета у Београду (ужа научна област генетика)

Објављени рад мр Ратибора Штрбановић у часопису који се налазе на SCI листи:

Bogovid Živković, Jasmina Radović, Dejan Sokolović, Branislav Šiler, Tijana Banjanac, **Ratibor Štrbanović** (2012): Assessment of genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes by morphometry, seed storage proteins and RAPD analysis. Industrial Crops and Products, vol. 40, str. 285-291. **(M21), (IF-2.837)**.

НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Извештај о урађеној докторској дисертацији мр Ратибора Штрбановића

Овде

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду од 27. јануара 2016. године, именован сам у Комисију за оцену и одбрану урађене докторске дисертације (у којој су и Др Томислав Живановић, ред. проф., Др Гордана Шурлан-Момировић, ред. проф. у пензији, Др Славен Продановић, ред. проф., Др Гордана Бранковић, доцент) кандидата мр Ратибора Штрбановића под насловом: «Идентификација сората луцерке применом молекуларних маркера у почетним фазама развића биљака», а након упознавања са садржајем докторске дисертације подносим следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација мр Ратибора Штрбановића има 96 страница, 14 табела, 9 графика и 12 слика, те садржај с обавезним резимеом и кључним речима на српском и енглеском језику, као и приказ садржаја. У докторској дисертацији је цитирано и у литератури наведено 153 литературна извора. Дисертацију чине следећа поглавља: 1. Увод (стр. 1-7), 2. Циљ истраживања (стр. 8), 3. Преглед литературе (стр. 9-17), 4. Радна хипотеза (стр. 18), 5. Материјал и методе (стр. 19-32), 6. Резултати истраживања и дискусија (стр. 33-77), 7. Закључак (стр. 78-79) и 8. Литература (стр. 80-96).

2. Приказ и анализа докторске дисертације

У **Уводу** (стр. 1-7) докторске дисертације, г. Ратибор Штрбановић бави се распрострањеношћу и значајем луцерке како у Србији тако и у свету, значајем селекције, молекуларним методама, тестом убрзаног старења, фитопатогеним гљивама луцерке.

У поглављу **Циљ истраживања** (стр. 8) наводи се да је циљ докторске дисертације испитивање варијабилности и груписање сродних генотипова десет различитих сорти луцерке одреди применом *ISSR* и *RAPD* молекуларних маркера. Такође применом теста убрзаног старења семена десет различитих сората луцерке (по три партије од сваке сорте), утврђује се значајност између партија семена, као показатељ животне способности семена луцерке. Испитивањем здравственог стања семена утврдиће се толерантност према патогенима и утицај локалитета (партије семена) на варијабилност патогена семена исте сорте. Циљ ове докторске дисертације је да укаже на најбоље генотипове који ће послужити као родитељи за стварање нових сорти луцерке.

У **Прегледу литературе** (стр. 9-17) докторанд је дао литературу с којом је упознат а која се односи на испитивања постављена циљем истраживања.

У **Радној хипотези** (стр. 18) докторанд полази од тога да је одабрани материјал довољно дивергентан у погледу броја алела на већем броју локуса који ће се одредити *ISSR* и *RAPD* маркерима и очекује висок ниво полиморфности у анализираним локусима. Очекује да ће утврдити разлике између партија семена исте сорте луцерке као и разлике између сората на основу теста убрзаног старења семена. Такође и да ће установити различиту заступљеност најзначајнијих патогена на различитим партијама семена појединачних сорти као и на различитим сортама луцерке.

У поглављу 5.1. **Материјал и методе рада** (стр. 19-32) докторанд је навео да су огледи изведени у лабораторијама Института за заштиту биља и животну средину у Београду а да је убрано семе произведено 2013 године. У поглављу 5.2. описао испитиваних 10 сората луцерке: Крушевачка 22 и Крушевачка 28 селекционисане у Институту за крмно биље у Крушевцу, НС-Банат ЗМС II и НС-Медиана ЗМС V селекционисане у Институту за ратарство и повртарство из Новог Сада, Зајечарска 83 селекционисана у Институту за пољопривредна и технолошка истраживања у Зајечару, Чачанка 10 селекционисана на Агрономском факултету у Чачку, Бањалучанка селекционисана на Пољопривредном Институту Републике Српске у Бања Луци и Осјечка 66, Осјечка 88 и Осјечка 99 селекционисане на Пољопривредном Институту у Осијеку. У поглављу 5.3. описао је екстракцију ДНК, у поглављу 5.4. изоловање ДНК, у поглављу 5.5. умножавање фрагмената ДНК PCR методом, у поглављу 5.6. *ISSR* анализу, у поглављу 5.7. *RAPD* анализу, у поглављу 5.8. оцену теста убрзаног старења семена, у поглављу 5. 9. Испитивање здравственог стања семена, у поглављу 5.10. статистичку обраду података.

Тест убрзаног старења семена изведен је у воденом купатилу TW 20, постављањем семена свих партија испитиваних сората луцерке у четири понављања на металну мрежицу, која је постављена непосредно изнад површине воде у воденом купатилу. Семе сваке партије испитиваних сората изложено је условима високе релативне влажности ваздуха (98-100%), температуре од 41 и 45°C у трајању од 24, 48, 72, 96 и 120 часова. Тест убрзаног старења семена рађен је и по стандардној и по модификованој методи са засићеним раствором кухињске соли (NaCl). Докторанд, без посебног образложења и без поткрепе, својим или резултатима других аутора, констатује да је дисертацијом унапређен тест убрзаног старења (стр. 28).

Осим тога, испитана је и клијавост семена стандардним методом, као и здравствено стање семена.

Поглавље 6. **Резултати истраживања и дискусија** (стр. 33-77) подељено је на три дела.

У делу 6.1. **Примена молекуларних маркера луцерке** (стр. 33-49) приказани су резултати примене *ISSR* и *RAPD* десет испитиваних сората луцерке.

У делу који се бави резултатима 6.2. **Примена теста убрзаног старења семена луцерке** (стр. 49-71) у табелама приказани су резултати примене теста убрзаног старења семена на различитим сортама и партијама луцерке.

За разумевање и тумачење добијених резултата важна је чињеница да докторанд није пружио ни један литературни извор или сопствени резултат којим показује како се добијени резултати теста убрзаног старења користе за идентификацију сората луцерке. Да је кандидат погледао приручник о методама испитивања животне способности семена (*Handbook of vigour test methods*, ed. Hampton, J.G., TeKrony, D.M. ISTA, 1995) у првој реченици поглавља 3.2. (стр. 35) те најновијим Правилима ИСТА-е (ISTA, 2016. *International Rules for Seed Testing*, 15.8.2.2) би се обавестио да је тест убрзаног старења првобитно осмишљен ради процене дуговечности семена и његовог чувања а не

идентификације биљних врста и сорти. Стога тумачење резултата теста убрзаног старења не стоје ни у каквој узрочно-последичној вези са насловом тезе „Идентификација сората луцерке применом молекуларних маркера у почетним фазама развића биљака“ бећ би оно (тумачење резултата) могло стајати у некој другој докторској тези при чему Штрбановићева неби изгубила на квалитету.

У трећем делу поглавља с резултатима **6.3. Испитивање здравственог стања семена луцерке (71-77)** приказана је оцена здравственог стања семена луцерке на основу прегледа клијанаца. Детерминација присутних гљива извршена је на основу морфолошких одлика, посматрањем под микроскопом.

У поглављу **Закључак (стр. 78-79)** кандидат је у кратким тезама изнео чињенице до којих је дошао на основу својих испитивања. И у овом поглављу докторанд је избегао да осветли везу између резултата добијених тестом убрзаног старења на семену луцерке и његовог сортног идентитета већ говори о сетвеним роковима и чувању семена премда то излази из оквира његове дисертације. У закључку докторанд тврди да гљиве присутне на семену луцерке смањују клијавост што је од давнина познато те би такав закључак ваљало, по мишљењу потписника, изоставити из текста дисертације.

У поглављу **Литература (80-96)** наведен је списак од 153 референци које су у докторској дисертацији коришћене као основ за примењене методе истраживања и за поређење добијених резултата са другим истраживањима.

На основу увида у текст дисертације господина Ратибора Штрбановића потписник овог извештаја сумира запажања и примедбе у вези њеног садржаја и тока израде извештаја петочлане комисије.

- I. Укорићена докторска дисертација и написана оцена дисертације уручени су ми, као и осталим члановима, 3.2.2016. 24 часа пред фебруарску седницу Катедре за генетику, селекцију и семенарство а да никада о дисертацији или оцени нисам имао прилику да разговарам с докторандом или ментором.
- II. Подразумева се, премда нигде није посебно прописано, да чланови комисије морају добити (вероватно и прочитати) дисертацију пре него што потпишу извештај о урађеној дисертацији. У противном чему петочлана комисија и седнице већа ако докторанд, кандидат и декан (ректор) могу да обаве читав посао, од писања доктората, извештаја и издавања дипломе?
- III. У моменту писања овог извештаја нисам имао на располагању оцену пријаве докторске дисертација г. Штрбановића. Овај сам тражио на фебруарској седници Катедре за генетику, селекцију и семенарство али га до данас нисам добио.
- IV. У датим околности одлучио сам да самостално напишем и поднесем овај извештај.
- V. Истичем да докторанд нема објављен рад који је произашао из његове дисертације већ радове из других истраживања. Рад из 2012. који је кандидат објавио у сарадњи са још пет сарадника (Bogovid Živković, Jasmina Radović, Dejan Sokolović, Branislav Šiler, Tijana Banjanac, Ratibor Štrbanović (2012): Assessment of genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes by morphometry, seed storage proteins and RAPD analysis. Industrial Crops and Products, vol. 40, str. 285-291.) проучава биљни материјал из 2008. а докторат г. Штрбановића односи се на истраживања биљног материјала из 2013. г. У поменутом раду из 2012 и у докторату се испитује 10 генотипова а два генотипа се појављују и у раду и у докторату (сорте луцерке К-28, За-83). Ваља запазити да ни један од аутора чланка из 2012. није члан комисије за одбрану дисертације Р. Штрбановића што указује да се ради о независним истраживањима. Мислим да је нужно установити зашто се понављају испитивања на сортама луцерке К-28 и За-83 и да ли то

понављање нарушава оригиналност тог дела (поглавље 6.1.) докторске дисертације.

- VI. Докторанд је неправилно тумачио резултате метода убрзаног старења семена непримереног овој докторској дисертацији будући да се тај метод до сада није користио за идентификацију било које врсте укључујући и луцерку. Примена теста убрзаног старења семена и резултати испитивања здравственог стања (који су у овој дисертацији изведени рутински као да је реч о испитивању семена за сетву у меркантилној производњи а не о истраживачком раду) не може бити циљ само по себи без његовог стављања у контекст докторске радње – идентификације сорти луцерке, осим ако циљ није да дисертација, захваљујући бројним табелама и резултатима теста убрзаног старења и здравственог стања, добије жељену величину (дебљину). Резултати изнети у поглављу 6.1. *Примена молекуларних маркера луцерке* (стр. 33-49) заузимају 16 страна док резултати теста убрзаног старења (поглавље 6.2) и испитивања здравственог стања семена (поглавље 6.3) заузимају 28 страна (стр. 49-77).
- VII. Модификацију метода убрзаног старења семена с NaCl-ом (која није верификована ни у најновијим Правилима правилима ИСТА-е из 2016) и резултате добијене њеном применом ваљало би додатно објаснити и ојачати тумачењем налаза других истраживача. Исто тако кандидат обавезно мора пружити више података о току испитивања пре свега у погледу праћења влажности семена.
- VIII. Рутинско испитивање присуства гљива на семену никако се не може сматрати доприносом патологији семена а још мање идентификацији сорти луцерке. Неодрживо је статистичко поткрепљивање негативног утицаја гљивица на клијавост семена луцерке пошто се ради о општепознатој појави коју не треба изнова доказивати.

3. Закључак и предлог

На основу свега изнетог предлажем да се застане с поступком оцене докторске дисертације мр Ратибора Штрбановића под насловом: «Идентификација сората луцерке применом молекуларних маркера у почетним фазама развића биљака» а да Наставно-научно веће Факултета донесе закључак о одлагању доношења одлуке сходно члану 25 с. 3. Правилника о докторским студијама које организује и изводи универзитет у Београду.

Такође, предлажем да Наставно-научно веће Факултета сходно Правилнику (чл. 25 с. 3) одреди рок до шест месеци за отклањање свих пропуста и примедби изнетих у овом извештају које би ваљало учинити у дисертацији. Сматрам да ће овај рок (предах) бити довољан да се отклоне пропусти наведени у тачкам I-III; те да кандидат објави рад који је произашао из докторске дисертације и изврши измене дисертације како би јасно поткрепио везу резултата испитивања здравственог стања семена и резултате теста убрзаног старења с идентификацијом генотипова луцерке. Објављивањем барем једног рада из докторске дисертације и изменама у делу који се односи на тест убрзаног старења и на испитивање здравственог стања семена поткрепио би научни допринос истраживања изнетих у дисертацији и отклонио постојеће неодумице. Тако би се стекли услови да господин Ратибор Штрбановић приступи одбрани своје докторске дисертације и успешно је одбрани.

Земун, 8.3.2016.

Члан Комисије:

Др Славољуб Лекић, ван. проф. Пољопривредног факултета
Универзитета у Београду (ужа научна област семенарство)