

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Београд - Земун

Датум: 28.04.2022. године

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Извештај Комисије за оцену докторске дисертације Бранке Петровић, мастер инжењера пољопривреде

На основу члана 57. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог већа Катедре за фитопатологију и мишљења Наставно-научног већа Института за фитомедицину, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 27.04.2022. године, донело је одлуку бр. 32/7-8.1. да се образује Комисија у саставу др Бранка Крстић, редовни професор, Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет (ужа научна област: Фитопатологија), др Катарина Зечевић, научни сарадник, Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет (ужа научна дисциплина: Фитопатологија), др Данијела Ристић, виши научни сарадник, Институт за заштиту биља и животну средину, Београд (ужа научна дисциплина: Фитопатологија), др Драгана Милошевић, виши научни сарадник, Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад (ужа научна дисциплина: Фитопатологија) и др Дарко Јевремовић, виши научни сарадник, Институт за воћарство, Чачак (ужа научна дисциплина: Фитопатологија) за оцену докторске дисертације кандидата Бранке Петровић, мастер инжењер пољопривреде, под насловом: „Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*) пореклом из различитих домаћина у Србији“.

Након прегледа завршене докторске дисертације, председник Комисије др Бранка Крстић, редовни професор (Одлука број 4/15-5 од 28.04.2022. године), подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

Основни подаци о кандидату. Бранка Р. Петровић рођена је 28.06.1993. године у Београду, Република Србија. Основне академске студије на Универзитету у Београду-Пољопривредном факултету, студијски програм Биљна производња, модул Фитомедицина, уписала је школске 2012/13. године, а дипломирала је 27.09.2016. године са просечном оценом 9,46 (девет и 46/100). Завршни рад под насловом „Развијање брзог и ефикасног протокола за екстракцију укупних РНК за доказивање вируса парадајза“ одбранила је са оценом 10 (десет). Мастер академске студије на

Универзитету у Београду-Пољопривредном факултету, студијски програм Фитомедицина уписала је школске 2016/17. године, а завршила је 27.09.2017. године са просечном оценом 9,88 (девет и 88/100), одбранивши мастер рад под насловом „Карактеризација изолата вируса мозаика краставца на основу секвенци СР и МР гена применом анализе полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената (RFLP методе)“ са оценом 10 (десет). Докторске академске студије на Универзитету у Београду-Пољопривредном факултету, студијски програм Пољопривредне науке, модул Фитомедицина, уписала је школске 2017/18. године. Од 2018. године ангажована је на Катедри за фитопатологију, Универзитета у Београду-Пољопривредног факултета као стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под непосредним руководством др Иване Станковић, редовног професора. Одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Пољопривредног факултета (број: 32/8-6.1 од 29.05.2019. године) и Већа научних области биотехничких наука (број: 61206-2457/2-19 од 11.06.2019. године) одобрена јој је израда докторске дисертације под називом: „Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*) пореклом из различитих домаћина у Србији“, а за ментора је одређена др Ивана Станковић, редовни професор. У звање истраживач-приправник изабрана је 28.06.2018. године, а у звање истраживач сарадник 27.05.2021. године на Универзитету у Београду-Пољопривредном факултету. До сада је објавила и саопштила 14 научних радова, од чега један у врхунском међународном часопису (M21), четири објављена у истакнутим међународним часописима (три оригинална научна рада и једно кратко саопштење-*News Item*), један објављен у националном часопису међународног значаја, два саопштена на скуповима међународног значаја, један објављен у истакнутом националном часопису и пет саопштена на скуповима националног значаја.

Основни подаци о дисертацији. Докторска дисертација Бранке Р. Петровић, мастер инжењера пољопривреде, под насловом „Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*) пореклом из различитих домаћина у Србији“ написана је у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду, као и у складу са пријавом теме која је одобрена од стране Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и Већа научних области биотехничких наука Универзитета у Београду. Докторска дисертација садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, информације о ментору и члановима Комисије, резиме на српском и енглеском језику, садржај и текст дисертације организован по поглављима. Дисертација је написана на 134 стране текста и садржи 10 табела и 52 слике.

Докторска дисертација садржи 8 основних поглавља, и то: Увод (стр. 1-2), Преглед литературе (стр. 3-21), Циљеви истраживања (стр. 22-23), Материјал и методе (стр. 24-37), Резултати (стр. 38-85), Дискусија (стр. 86-95), Закључак (стр. 96-98) и Литература (стр. 99-117). Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља. На крају текста дисертације налазе се Прилози (стр. 118-130), Биографија (стр. 131), Изјава о ауторству (стр. 132), Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације (стр. 133) и Изјава о коришћењу (стр. 134).

2. Предмет и циљ дисертације

Вирус бронзавости парадајза (TSWV) један је од десет економски најзначајнијих и најпроучаванијих биљних вируса, одговоран за бројне епидемије на различитим усевима широм света. Због широке распрострањености и ефикасности вектора, али и због недостатака специфичности у односу на домаћине, TSWV је један од најдеструктивнијих вируса у свету. Вредност губитака услед заразе овим вирусом процењује се на око 1 милијарду долара годишње. У Србији, присуство TSWV први пут је забележено на дувану 1969. године. Касније, присуство вируса доказано је и у парадајзу, паприци, као и у великом броју украсних биљака. Последњих година забележено је и ширење круга домаћина овог вируса у нашој земљи, па су тако забележени и први налази овог вируса на црном и белом луку и две врсте тикава *Cucurbita pepo* 'Београдска' и *C. maxima*. Проучавања у нашој земљи, пре свега, односила су се на утврђивање појаве и распрострањености TSWV на различитим домаћинима, док је делимична молекуларна карактеризација на основу секвенци N гена (*nucleocapsid gene*) обављена само за мали број изолата овог вируса, пореклом са дувана, паприке и парадајза.

Основни циљ ове докторске дисертације био је да се кроз утврђивање генетичког диверзитета и структуре популације TSWV, коришћењем секвенци репрезентативних изолата овог вируса пореклом из различитих домаћина прикупљених у различитим периодима са локалитета широм Србије, утврди утицај фактора који утичу на обликовање популације овог вируса у нашој земљи. Молекуларна карактеризација одабраних изолата TSWV заснована је на прорачуну генетичког диверзитета између испитиваних изолата и са изолатима из других делова света, затим на филогенетској анализи секвенци пет генских региона различитих геномних сегмената, на утврђивању генеалогских међуодноса испитиваних изолата на основу мреже хаплотипова, као и на утврђивања типа селекције на генске регионе одабраних изолата, чиме је омогућено утврђивање фактора који утичу на облик варирања и степен промена у оквиру популације овог вируса у Србији. Познавање структуре природне популације TSWV је неопходно за разумевање важних епидемиолошких питања као што су утврђивање порекла и извора заразе, путева интродукције, ширења и промена у локалној популацији овог вируса.

Истраживања на основу молекуларне карактеризације изолата TSWV из Србије, пореклом из различитих биљака домаћина и различитог географског порекла, подразумевају коришћење података секвенци одређених гена испитиваних изолата вируса за филогенетске анализе, евалуацију параметара популационе генетике, диференцирање субпопулација вируса на територији Србије и утврђивање еволутивног селекционог притиска на геном вируса. На овај начин је утврђена генетичка варијабилност изолата пореклом из Србије, њихова међусобна еволутивна повезаност, као и повезаност са изолатима овог вируса из других делова света.

3. Основне хипотезе од којих се полазило у истраживању

Досадашња проучавања појаве, присуства и распрострањености TSWV у нашој земљи указала су на економски значај овог вируса чије је присуство у Србији утврђено на важним пољопривредним културама као што су дуван, парадајз и паприка, али и на бројним врстама украсних биљака. Обзиром на велики економски значај TSWV, повећану међународну размену биљног материјала и могућност интродукције овог

вируса увозом зараженог или трипсима инфицираног вегетативног пропaгaтивнoг материјaлa, пoлaзнa прeтпoстaвкa билa је дa ће мoлeкулaрнa истрaживaњa у oквиру oвe дoктoрскe дисeртaцијe, зaснoвaнa нa принципимa пoпулaциoнe гeнeтикe укaзaти нa нaчинe и путeвe ширeњa oвoг вирусa и oмoгућити дaљa мoлeкулaрнa eпидeмиoлoшкa истрaживaњa кoјa ће имaти зa циљ рaзвoј стрaтeгијe кoјa укључујe прирeну eфикaснijих мeрa кoнтрoлe oвoг вирусa у нaшoј зeмљи.

Имaјући у виду изрaжeну вaријaбилнoст TSWV, aнaлизa oдрeђeних пaрaмeтaрa пoпулaциoнe гeнeтикe и њихoвa oбрaдa прирeнoм oдгoвaрaјућих сoфтвeрских пaкeтa, дaће прeцизнa сaзнaњa o гeнeтичкoм дивeрзитeту и стрyктури пoпулaцијe oвoг вирусa укaзујући нa фaктoрe кoји утичу нa вaрирaње и стeпeн прoмeнa у oквиру пoпулaцијe oвoг вирусa. Нoвa сaзнaњa дoпринeћe бoљeм рaзумeвaњу мoлeкулaрнe eпидeмиoлoгијe кaкo прeдуслoвa зa рaзвoј и прирeну oдгoвaрaјућих стрaтeгијa кoнтрoлe.

4. Крaтaк oпис сaдржajа дисeртaцијe

Увoд. У увoду је укaзaнo нa знaчaj вирусa брoнзaвoсти пaрaдajзa у прирoднoм повртaрских, индустријских и украсних биљaкa. Изнeти су oснoвни пoдaци o тaксономijи, рaспрoстрaњeнoсти и вaријaбилнoсти TSWV, кaкo и пoдaци o крyгу дoмaћинa oвoг вирусa. Мaдa су прирeствo и рaспрoстрaњeнoст TSWV прoучaвaни у Србији, укaзaнo је дa пoстoји вeмa мaлo пoдaтaкa o гeнeтичкoј стрyктури прирoднe пoпулaцијe и фaктoримa кoји oбликују пoпулaцију oвoг вирусa у нaшoј зeмљи.

Преглeд литeрaтурe. У oвoм пoглaвљу кoјe сe сaстoји oд тринaeст пoтпoглaвљa, изнeти су дoступни литeрaтурни пoдaци o истрaживaњимa других aутoрa, кoјa су ускo пoвeзaнa сa прeдмeтoм прoучaвaњa дoктoрскe дисeртaцијe. У првoм пoтпoглaвљу **Тaксономски статус вирусa** укaзaнo је нajпрe нa брoјнe прoмeнe у звaничнoм нaзиву вирусa у вeмa крaткoм врeмeнскoм пeриoду збoг чeгa сe у публикaцијaмa oбјaвљeним чaк истe гoдинe прирeствe рaзликe. Првoбитни нaзив *Tomato spotted wilt virus*, нajпрe је прoмeњeн у *Tomato spotted wilt orthospovirus*, пa у *Tomato spotted wilt tospovirus*, дa би прeмa пoслeдњим пoдaцимa Мeђунaрoднoг кoмитeтa зa тaксономijу вирусa из 2019. гoдинe звaнични нaзив вирусa брoнзaвoсти пaрaдajзa глaсиo *Tomato spotted wilt orthospovirus* (TSWV; рoд *Orthospovirus*; фaмилijа *Tospoviridae*; рeд *Bunyavirales*). Дрyгo пoтпoглaвљe **Рaспрoстрaњeнoст TSWV** oднoси сe нa рaспрoстрaњeнoст oвoг вирусa у свeту, дoк су у трeћeм пoтпoглaвљу **Прирeствo TSWV у Србији** нaвeдeни литeрaтурни пoдaци o прoучeнoсти вирусa у нaшoј зeмљи. У пoтпoглaвљу **Екoнoмски знaчaj** нaвeдeнe су eкoнoмскe штeтe кoјe вирус прoузрoкyје у прирoднoм рaзличитих дoмaћинa чијa је брoјнoст нaвeдeнa у пoтпoглaвљу **Дoмaћини**. Симптoми кoјe вирус изaзивa нa нajзнaчajнијим дoмaћинимa укључујући пaрaдajз, пaприкy, дyвaн и украснe биљкe прикaзaни су у пoтпoглaвљу **Симптoмaтoлoгијa**. У пoтпoглaвљу **Епидeмиoлoгијa** укaзaнo је нa нaчинe прeнoшeњa и oдржaвaњa TSWV у прирoди. У oсмoм пoтпoглaвљу **Мoрфoлoгијa вирусних чeстицa и oргaнизaцијa гeнoмa** изнeти су пoдaци o вeличини, грaђи вирусних чeстицa и oргaнизaцији гeнoмa, a у пoтпoглaвљу **Функцијe прoтeинa** пoдaци o функцији и улoзи прoтeинa кoјe гeнoм кoдирa. Пoтпoглaвљe **Филoгeнeтскa испитивaњa** дoнoси пoдaткe o рaзнoврeнoсти изoлaтa oвoг вирусa нa кoјe укaзују филoгeнeтскe aнaлизe, дoк пoтпoглaвљe **Вaријaбилнoст вирусa** укaзују нa извoрe вaријaбилнoсти и гeнeтички дивeрзитeт пoпулaцијe TSWV у свeту. У пoтпoглaвљу **„Resistance-breaking“ изoлaтu TSWV** укaзaнo је нa пoјaву и знaчaj RB (*resistance-breaking*) изoлaтa кoји прeвaзилaзe oтпoрнoст угрaђeну у

комерцијалне сорте парадајза и паприке. У тринаестом потпоглављу *Контрола* наведене су најзначајније мере контроле обољења које вирус изазива.

Циљеви истраживања. Циљеви истраживања приказани су у тачки 2. овог извештаја.

Материјал и методе рада. У овом поглављу наведени су коришћени материјали за рад, као и методе рада кроз 8 потпоглавља. У циљу анализе генетичке структуре популације TSWV у Србији, а како би се обухватио што већи број биљака домаћина или истих домаћина са различитим симптомима природне заразе пореклом са што већег броја локалитета на територији наше земље, сакупљених у различитом временском периоду, у истраживања је укључен 41 изолат добијен из најзначајнијих домаћина овог вируса у нашој земљи, укључујући: парадајз, паприку, дукан и различите врсте украсних биљака (*Порекло одабраних изолата TSWV*). Потврда присуства појединачне заразе TSWV у одабраним узорцима различитих биљака домаћина обављена је применом DAS-ELISA методе, коришћењем комерцијалних поликлоналних антисерума специфичних за детекцију десет вируса (*Утврђивање присуства TSWV у одабраним узорцима применом DAS-ELISA теста*). *Амплификација различитих гена одабраних изолата TSWV* обављена је применом методе реверзне транскрипције праћене ланчаном реакцијом полимеразе (RT-PCR) уз коришћење специфичних парова прајмера који омогућавају амплификацију дела свих пет генских региона укључујући N и NSs гене у оквиру S сегмента, NSm и Gn-Gc у оквиру M сегмента и RdRp гена у оквиру L сегмента. Екстракција укупних РНК из узорака заражених биљака, обављена је коришћењем cetyltrimethylammonium bromide (СТАВ) методе, док је за умножавање циљних секвенци коришћен „One-step“ RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany). Након успешне амплификације пет генских региона, а у циљу добијања секвенци одабраних изолата, RT-PCR продукти свих појединачних гена гена одабраних изолата послати су на услужно пречишћавање и секвенцирање (Macrogen Europe, Холандија) у оба смера коришћењем истих прајмера као у RT-PCR реакцији. Након секвенцирања и обраде у секвенци у програму FinchTV Version 1.4.0., молекуларна идентификација добијених консензус секвенци обављена је помоћу BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) анализе, поређењем секвенци свих пет генских региона одабраних изолата пореклом из Србије са секвенцама одговарајућих региона доступних у светској бази података GenBank. Осим тога, извршен је и прорачун међусобне нуклеотидне и аминокиселинске сличности одабраних изолата овог вируса пореклом из Србије (*Секвенцирање делова генома одабраних изолата TSWV*). *Филогенетске анализе* обављене су реконструкцијом филогенетских стабала на основу секвенци свих пет генских региона (N, NSs, NSm, Gn-Gc и RdRp), али и делова S и M сегмената добијених спајањем секвенци N и NSs, односно NSm и Gn-Gc гена (*concatenated trees*). Реконструкција филогенетских стабала на основу секвенци N и NSs гена, као и дела S сегмента обављена је употребом maximum parsimony методе, док је филогенетско стабло на основу секвенци NSm и Gn-Gc гена, као и дела M сегмента реконструисано употребом neighbour-joining методе. Стабло на основу секвенци RdRp гена реконструисано је употребом maximum likelihood методе. Провера поузданости реконструисаних стабала обављена је коришћењем bootstrap анализе са 1000 понављања, а као *outgroup* коришћена је секвенца одговарајућег генског региона изолата вируса хлоротичне пегавости парадајза (*Tomato chlorotic spot orthotospovirus, TCSV*). У циљу потврде резултата добијених филогенетским анализама, као и утврђивања генеалошких међуодноса испитиваних изолата извршена је и реконструкција мреже хаплотипова на основу делимичних секвенци свих пет генских региона. Реконструкција хаплотипске мреже за сваки генски регион TSWV обављена је

помоћу median-joining network алгоритма, који је имплементиран у Network v.4.6.1.6 софтвер (Fluxus Engineering, <http://www.fluxusengineering.com>). *Анализа рекомбинација* обављена је применом RDP v.4.101 софтвера. За ову анализу коришћене су секвенце S и M сегмента. Утврђивање утицаја селекције на популацију TSWV обављено је применом „Codon-based“ Z-testa селекције имплементiranог у MEGA 6.0 програму. У потпоглављу *Механичке инокулације тест биљака RI и RB изолата TSWV пореклом из парадајза* описан је поступак механичких инокулација примењен у циљу провере способности одабраних изолата TSWV пореклом из осетљивих и отпорних хибрида парадајза да остваре инфекцију отпорних и/или осетљивих комерцијалних хибрида парадајза и паприке.

Резултати. Резултати истраживања приказани су јасно и прегледно, уз концизна текстуална тумачења, табеле, графиконе и слике које илуструју делове истраживања у оквиру 6 потпоглавља са више поднаклова. У потпоглављу *Симптоми на природно зараженим биљкама* дат је детаљан опис симптома на биљкама из којих потичу изолати одбрани за истраживања, а описани симптоми документовани су бројним оригиналним фотографијама. Присуство појединачне заразе TSWV у свим одабраним узорцима доказано је применом *DAS-ELISA теста*. Потпоглавље *Анализа секвенци и молекуларна карактеризација одабраних изолата TSWV* садржи резултате добијене амплификацијом свих пет генских региона одабраних изолата и њиховим секвенцирањем, као и резултате молекуларне идентификације и карактеризације добијених секвенци. Анализа секвенци N гена 41 одабраног изолата TSWV пореклом из Србије указала је на низак степен генетичке варијабилности изолата из Србије (96,4-100% нуклеотидне и 90,7-100% аминокиселинске сличности). Без обзира на висок степен сличности, филогенетске анализе указале су на изразиту варијабилност српских изолата TSWV који се групишу у четири различите подгрупе. Већина српских изолата, груписала се у кластер европских изолата, али у две одвојене субпопулације (23 изолата у подгрупу 1 и девет изолата у подгрупу 2). Преосталих девет изолата груписали су се у северноамерички кластер и то један изолат у подгрупу 3, а осам у подгрупу 4. Применом DnaSP 6.0 програма утврђено је да се на основу делимичних секвенци N гена, 41 одабрани изолат TSWV пореклом из Србије групише у 26 хаплотипова који се у мрежи хаплотипова реконструисаној помоћу median-joining networks алгоритма групишу у четири групе и представљају углавном периферне хаплотипове, али и транзиционе чворове ка другим изведеним хаплотиповима. Иако је висок степен сличности 34 одабрана изолат TSWV из Србије (94,4-100% нуклеотидне и 87,7-100% аминокиселинске сличности) утврђен је и анализом секвенци NSs гена, филогенетске анализе су указале на изразиту варијабилност српских изолата TSWV који се групишу у четири различите подгрупе. Већина српских изолата поново се груписала у европску групу и то 20 изолата у подгрупу 1 и седам у подгрупу 2, док се преосталих седам изолата груписало у северноамеричку групу и то један изолат у подгрупу 3, а шест изолата у подгрупу 4. Осим тога, филогенетске анализе на основу NSs гена указале су и на различито груписање два изолата у односу на филогенетске анализе на основу N гена, указујући на могуће постојање рекомбинантних изолата. Применом DnaSP 6.0 програма утврђено је да се на основу делимичних секвенци NSs гена, 34 одабрана изолата TSWV пореклом из Србије групишу у 19 хаплотипова који се у мрежи хаплотипова реконструисаној помоћу median-joining networks алгоритма групишу у четири групе. За групу I и IV одређени су и централни или предачки хаплотип, али су присутни и хаплотипови који представљају транзиционе чворове ка другим изведеним хаплотиповима. И филогенетско стабло реконструисано на основу дела S сегмента добијеног спајањем делимичних секвенци N и NSs гена, потврдило је груписање српских изолата у четири групе, али и издвајање два потенцијално

рекомбинантна изолата (646-11 и 525-11) на засебној грани у оквиру европске подгрупе I. Висок степен сличности српских изолата утврђен је и анализом секвенци NSm и Gn-Gc, указујући на низак степен генетичке варијабилности изолата из Србије. Такође, анализа секвенци NSm гена изолата пореклом из отпорних и осетљивих хибрида парадајза, указала је на присуство промена аминокиселина на позицијама 118 или 120, карактеристичних за RB изолате TSWV, код шест изолата који воде порекло из отпорне сорте парадајза, али не и код 12 изолата овог вируса изолованих из осетљивих сорти парадајза у које није уграђен *Sw-5b* ген отпорности. Без обзира на висок степен нуклеотидне и аминокиселинске сличности, реконструисана филогенетска стабла и на основу NSm и Gn-Gc секвенци указује на варијабилност српских изолата TSWV који се групишу у два различита кластера. Осим тога, дошло је и до различитог груписања изолата 224-16 пореклом из украсне биљке *Cinia* sp. на основу секвенци NSm и Gn-Gc гена, што је и потврђено реконструкцијом филогенетског стабла на основу секвенце дела M сегмента и груписања потенцијално рекомбинантног изолата 224-16 у посебан R (рекомбинантни) кластер. Варијабилност српских изолата TSWV потврђена је и применом DnaSP 6.0 програма где се на основу делимичних секвенци NSm и Gn-Gc гена, 34 одабрана изолат TSWV пореклом из Србије групишу у 27 односно 26 хаплотипова који се у мрежи хаплотипова групишу у две групе и чине перифералне хаплотипове, али и транзиционе чворове ка другим изведеним хаплотиповима. Молекуларна карактеризација обављена реконструкцијом филогенетског стабла на основу секвенце RdRp гена, такође је указала на варијабилност српских изолата и њихову поделу у две групе, али и на различито груписање два изолата 345-15 пореклом из паприке и 230-17 пореклом из украсне биљке *Pelargonium* sp. у односу на филогенетске анализе на основу секвенци других гена, указујући да L сегмент ова два изолата води различито порекло у односу на S и M сегмент, што их чини псеудорекомбинантима. Применом DnaSP 6.0 програма утврђено је да се на основу делимичних секвенци RdRp гена 34 одабрана изолата TSWV пореклом из Србије групишу у 15 хаплотипова који се у мрежи хаплотипова реконструисаној помоћу median-joining networks алгоритма групишу у две групе и представљају углавном перифералне хаплотипове, али и транзиционе чворове ка другим изведеним хаплотиповима. Филогенетске анализе на основу свих пет генских региона указују и на заједничко груписање српских изолата из различитих региона наше земље (северни, централни и јужни) указујући на присуство протока гена између различитих региона унутар наше земље. Анализа M сегмента применом RDP v.4.101 софтвера потврдила је постојање рекомбинације код изолата 224-16 при чему је овај изолат природни рекомбинант између српских изолата: 525-11 који води порекло из паприке и припада кластеру II и 232-17 који води порекло из украсне биљке *Osteospermum* sp. и припада кластеру I на основу филогенетске анализе секвенци M сегмента (потпоглавље **Анализа рекомбинација**). Потпоглавље **Утицај селекције на генске регионе одабраних изолата TSWV** приказује резултате добијене применом „codon-based“ Z теста који указују да је присутан утицај негативне селекције код свих пет генских региона. Међутим, тестирањем сваког пара секвенци NSm и Gn-Gc гена одабраних изолата утврђен је утицај позитивне селекције код пет тестираних парова секвенци NSm гена, као и код четири пара секвенци Gn-Gc гена изолата пореклом из парадајза. У шестом потпоглављу приказани су резултати **Биолошке карактеризације одабраних српских RI и RB изолата TSWV пореклом из парадајза** који су потврдили постојање RB изолата у нашој земљи способних да изазову заразу сорти парадајза са уграђеним *Sw-5b* геном отпорности, али не и сорти паприке са *Tsw* геном отпорности.

Дискусија. Добијени резултати дискутовани су у оквиру шест потпоглавља уз концизна тумачења. У потпоглављу *Симптоми TSWV на природно зараженим биљкама* истакнуто је да су уочене бројне и разноврсне морфолошке и хроматске промене на листовима и плодовима заражених биљака, као и промене у општем изгледу биљака у зависности од врсте и сорте, старости биљке домаћина и услова спољашње средине и нису могле бити доведене у везу са генотипом испитиваног изолата. У другом потпоглављу *Молекуларна идентификација и карактеризација изолата TSWV* наведено је да је прорачун степена диверзитета секвенци свих пет генских региона, показао како високу међусобну сличност одабраних изолата TSWV пореклом из Србије тако и са изолатима овог вируса из других делова света, без обзира на порекло, биљку домаћина или годину сакупљања што је у сагласности са ранијим истраживањима популације овог вируса у свету. Током ових истраживања по први пут је утврђено присуство TSWV код парадајза хибрида 'Wrestler F1' са уграђеним *Sw-5b* геном отпорности, а анализа аминокиселинске секвенце NSm протеина српских RB изолата указала је на присуство две супституције C118Y или T120N указујући да су ови изолати независно подлегли утицају селекције, као што је забележено и у истраживањима других аутора. Филогенетске анализе на основу делимичних секвенци свих пет гена (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp), као и на основу секвенци дела S и M сегмента добијених спајањем одговарајућих секвенци, упркос високом степену нуклеотидне сличности секвенци српских изолата TSWV, указале су на хетерогеност популације овог вируса у нашој земљи. Филогенетске анализе су показале да је већина српских изолата TSWV европског порекла, међутим неки изолати су показали већу блискост са изолатима из северноамеричког кластера, указујући да су српски изолати TSWV унети кроз више независних интродукција. Осим тога, филогенетско стабло на основу секвенци M и L сегмента указало је и на постојање рекомбинантних, односно псеудорекомбинантних изолата. Резултати филогенетских анализа на основу свих пет генских региона указали су на заједничко груписање српских изолата TSWV пореклом из географски удаљених подручја наше земље, упућујући да је дошло до протока гена („gene flow“) између географских региона. У потпоглављу *Мрежа хаплотипова изолата TSWV* указано је да на висок степен диверзитета и постојање варијабилности у популацији TSWV у нашој земљи и постојање великог броја хаплотипова за све испитиване гене. За сваки од испитиваних генских региона утврђена су два до три преовлађујућа хаплотипа са већим бројем изолата, док су преостали хаплотипови обухватили само појединачне секвенце што и јесте карактеристика популације овог вируса и у другим деловима света. Мреже хаплотипова на основу делимичних секвенци свих пет генских региона пружиле су увид у генеалогске односе хаплотипова детектованих у популацији овог вируса у нашој земљи и потврдиле резултате филогенетских анализа за сваки испитивани генски регион о више независних интродукција изолата TSWV у нашу земљу. Осим тога, хаплотипови пронађени у популацији TSWV у Србији на основу секвенци свих генских региона заузели су углавном периферална места, док су неки од њих представљали и транзиционе чворове ка другим хаплотиповима, што указује да је у оквиру наше земље дошло и до развоја и ширења популације настале унутар саме територије наше земље. У четвртном потпоглављу *Анализа рекомбинација* продискутовани су резултати анализе секвенци S и M сегмента изолата TSWV пореклом из Србије помоћу RDP v.4.101 софтвера која је показала да је до измене генетичког материјала у виду рекомбинације дошло само на M сегменту код изолата 224-16 пореклом из украсне биљне врсте *Cinia* sp. Овај изолат представља природног рекомбинанта између два српска изолата указујући да је до појаве рекомбинације дошло из постојеће локалне популације овог вируса, чему у великој мери доприноси и чињеница да је у нашој земљи често заступљено гајење

повртарских и украсних биљака заједно у истом заштићеном простору, нарочито када је у питању расадничка производња поврћа. Резултати Z-теста селекције на основу укупног сета секвенци показали су да су свих пет анализираних генских региона под утицајем негативне (*purifying*) селекције указујући да су несинонимне супституције, односно нуклеотидне промене које доводе до измена у аминокиселинском саставу протеина, мање заступљене у популацији TSWV у нашој земљи у односу на синонимне супституције које не доводе до промена у самом протеину. Међутим, анализа појединачних парова секвенци NSm и Gn-Gc гена показала је да се пет, односно четири пара секвенци српских изолата TSWV пореклом из парадајза налази под утицајем позитивне селекције што није изненађујуће имајући у виду да несинонимне супституције на позицији 118 (C118Y) и 120 (T120N) NSm гена, одговорне за превазилажење отпорности код парадајза, под утицајем позитивне селекције (***Утицај еволутивних параметара на популацију TSWV***). У потпоглављу ***Биолошка карактеризација RB изолата TSWV*** указано је да је биолошко тестирање комерцијално доступних отпорних и осетљивих хибрида парадајза и паприке на TSWV потврдило резултате молекуларне идентификације и постојање RB изолата TSWV у нашој земљи. Осим тога, биолошка карактеризација је потврдила да су српски RB изолати способни да превазиђу отпорност парадајза са *Sw-5b*, али не и паприке са *Tsw* геном. Настанак RB фенотипова вероватно је последица широке употребе отпорних хибрида у производњи парадајза, нарочито у периоду од 2016. до 2019. године, што је довело до селекционог притиска и појаве RB изолата TSWV у нашој земљи.

Закључак. Закључци су правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата. Молекуларна карактеризација на основу делимичних секвенци свих пет генских региона (N, NSs, NSm, Gn-Gc и RdRp), али и на основу секвенци дела S и M сегмената добијених спајањем одговарајућих секвенци указала је на постојање генетичке варијабилности у природној популацији TSWV у Србији, пре свега као последице више независних интродукција изолата TSWV у нашу земљу из других делова света, али и појаве мутација, рекомбинација и псеудорекомбинација забележених у популацији овог вируса у нашој земљи. Филогенетске анализе на основу делимичних секвенци N и NSs гена, као и дела S сегмента показале су да се изолати TSWV групишу на основу географског порекла и то у четири кластера (Европа, Бразил, Северна Америка и Азија). Испитивани изолати TSWV пореклом из Србије груписали су се у оквиру европског и северноамеричког кластера, али у оквиру различитих географских субпопулација. Иако је прорачун генетичког диверзитета делимичних секвенци NSm и Gn-Gc гена показао висок степен сличности секвенци TSWV пореклом из Србије, реконструисано филогенетско стабло указује на варијабилност српских изолата и њихово груписање у два различита кластера. Осим тога, филогенетске анализе на основу Gn-Gc гена указале су и на различито груписање изолата 224-16 пореклом из украсне биљке *Cinia* sp. у односу на филогенетске анализе на основу NSm гена, што је и потврђено филогенетским анализама на основу секвенци дела M сегмента где је дошло до јасног издвајања рекомбинантног кластера који чини изолат 224-16. Варијабилност српских изолата TSWV утврђена је и филогенетским анализама на основу секвенци RdRp гена. Реконструисано филогенетско стабло указује да се српски изолати поново групишу у два различита кластера, али и на различито груписање изолата 345-15 пореклом из паприке и изолата 230-17 пореклом из украсне биљке *Pelargonium* sp. у односу на филогенетске анализе на основу секвенци других гена указујући да је код ових изолата дошло до измене читавог геномног сегмента и да се ради о псеудорекомбинантима. Осим тога, резултати филогенетских анализа показали су да су српски изолати из парадајза, паприке и дувана већином европског

породице и да су више пута интродуковани у нашу земљу, док изолати из украсних биљака углавном припадају северноамеричкој групи изолата TSWV, што говори о њиховом пореклу и указује да су интродуковани у Европу заједно са *F. occidentalis* из тог дела света. Такође, филогенетске анализе на основу секвенци свих пет испитиваних гена показују и заједничко груписање српских изолата пореклом из различитих региона (северни, централни и јужни), указујући на присуство протока гена између различитих региона унутар територије наше земље. Током ових истраживања први пут у нашој земљи детектовано је и присуство RB (*resistance-breaking*) изолата TSWV изолованих из симптоматичних биљака парадајза хибрида 'Wrestler F1' са уграђеним *Sw-5b* геном отпорности према вирусу. Код српских RB изолата утврђена је супституција цистеина тирозином на позицији 118 (C118Y) или треонина аспарагином на позицији 120 (T120N), а велика нуклеотидна сличност између RI и RB изолата, као и филогенетске анализе, указују да фенотип изолата нема утицаја на њихово груписање, због чега се може закључити да је до појаве RB изолата дошло развојем из локалне популације под утицајем селекционог притиска гајењем отпорних сорти парадајза. На постојање варијабилности у популацији TSWV у нашој земљи указало је и постојање великог броја хаплотипова за сваки од испитиваних генских региона. Хаплотипови пронађени у популацији TSWV у Србији на основу секвенци свих генских региона заузели су углавном периферална места, док су неки од њих представљали и транзиционе чворове ка другим хаплотиповима што указује да је у оквиру наше земље дошло и до развоја и ширења популације настале унутар саме територије наше земље. RDP анализа је потврдила присуство рекомбинација у M сегменту код изолата 224-16 пореклом из украсне биљке *Cinia* sp. који представља природног рекомбинанта између два српска изолата, док резултати „codon-based“ Z-теста селекције указују на доминантан утицај негативне (*purifying*) селекције на свих пет генских региона одабраних изолата TSWV пореклом из Србије. Међутим, тестирањем сваког пара секвенци NSm и Gn-Gc гена одабраних изолата утврђен је утицај позитивне селекције код пет тестираних парова секвенци NSm гена, као и код четири пара секвенци Gn-Gc гена изолата пореклом из парадајза. Биолошка карактеризација одабраних изолата TSWV пореклом из парадајза хибрида 'Wrestler F1', са уграђеним *Sw-5b* геном отпорности, механичким инокулацијама отпорних и осетљивих сорти парадајза и паприке комерцијално доступних на нашем тржишту показала је да су српски RB изолати TSWV способни да превазиђу отпорност уграђену у комерцијалне сорте парадајза, али не и паприке.

Литература. У дисертацији је наведено 309 референци, од чега 41 домаћих и 268 страних аутора. Избор референци је актуелан, одговара проучаваној проблематици, а цитиране су на умешан и правилан начин.

Прилози. У прилозима су приказани допунски материјали који су од значаја за боље разумевање овог рада: секвенце изолата преузетих из GenBank базе података коришћене за филогенетске анализе (Прилози 1-4), табеле процената сличности нуклеотидних и изведених аминокиселинских секвенци свих испитиваних изолата из Србије за пет испитиваних генских региона TSWV (Прилози 5-10) и резултати анализа „codon-based“ Z теста позитивне селекције за сваки пар испитиваних секвенци NSm и Gn-Gc гена (Прилози 11-12).

5. Остварени резултати и научни допринос дисертације

Тема и садржај ове дисертације су актуелни и значајни имајући у виду распрострањеност и штете које вирус бронзавости парадајза (TSWV) причињава у производњи различитих пољопривредних култура у Србији и свету. Научни допринос дисертације огледа се кроз прва сазнања о генетичкој структури природне популације TSWV у Србији и факторима који обликују популацију овог вируса у нашој земљи. У истраживањима је примењено више различитих метода карактеризације вируса бронзавости парадајза, чиме су добијени поуздани резултати о изворима генетичке варијабилности у природној популацији TSWV у Србији, пре свега као последице више независних интродукција изолата TSWV у нашу земљу из других делова света, али и појаве мутација, рекомбинација и псеудорекомбинација забележених у популацији овог вируса у нашој земљи.

Поред доприноса у сагледавању структуре и састава популације овог вируса у нашој земљи, ова дисертација има и практичан значај јер откриће RB изолата и њихова карактеризација указују да је настанак RB фенотипа последица селекционог притиска и широке употребе отпорних хибрида у производњи парадајза, те стога поред пажљивог мониторинга и контроле трипса, пажњу треба обратити и на наизменично гајење осетљивих и отпорних хибрида како би се смањило селекциони притисак и спречила појава изолата који превазилазе отпорност уграђену у комерцијалне сорте. Такође, ова истраживања представљају основ и омогућавају даља молекуларна епидемиолошка истраживања и развој и примену ефикаснијих и дуготрајнијих стратегија контроле обољења која овај вирус изазива у нашој земљи.

6. Објављени и саопштени резултати

Petrović, B., Vučurović, A., Zečević, K., Delibašić, G., Krstić, B., Stanković, I. (2021): Resistance-breaking tomato spotted wilt orthospovirus isolates on resistant tomato in Serbia. *Journal of Plant Disease and Protection* 128: 1327-1339. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00493-4>

Петровић, Б., Зечевић, К., Делибашић, Г., Крстић, Б., Станковић, И. (2021): Карактеризација изолата вируса бронзавости парадајза који заражавају сорте са *Sw-5b* геном отпорности. Зборник резимеа XVI Симпозијума о заштити биља, новембар 22-25.2021., Златибор, Србија, стр. 48.

7. Закључак и предлог комисије

Докторска дисертација Бранке Р. Петровић, мастер инжењера пољопривреде, под насловом: „Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*) пореклом из различитих домаћина у Србији“ представља оригинални научни рад из области фитопатологије, а спроведена истраживања су у сагласности са планом који је прихваћен при пријави дисертације. Кандидаткиња је веома успешно обавила експериментални део истраживања примењујући адекватне и савремене методе, а добијени резултати потврђују постављене хипотезе истраживања. Докторска дисертација је технички веома добро организована и уређена, а написана је прегледно и јасним језиком.

Имајући у виду све изнето, а нарочито остварене резултате и њихов научни и практични допринос, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Бранке Р. Петровић под насловом: „Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*) пореклом из различитих домаћина у Србији“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидату да јавно брани докторску дисертацију.

Београд, 28.04.2022. године

Чланови Комисије:

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

др Катарина Зечевић, научни сарадник
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна дисциплина Фитопатологија)

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

др Драгана Милошевић, виши научни сарадник
Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад
(ужа научна дисциплина Повртарство)

др Дарко Јевремовић, виши научни сарадник
Институт за воћарство, Чачак
(ужа научна дисциплина Фитопатологија)

Прилог:

Објављен рад Бранке Р. Петровић, мастер инжењера у научном часопису на SCI листи који квалификује кандидата за одбрану дисертације:

Petrović, B., Vučurović, A., Zečević, K., Delibašić, G., Krstić, B., Stanković, I. (2021): Resistance-breaking tomato spotted wilt orthospovirus isolates on resistant tomato in Serbia. *Journal of Plant Disease and Protection* 128: 1327-1339. <https://doi.org/0.1007/s41348-021-00493-4>

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

**ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације под насловом „Генетичка структура популације вируса бронзавости парадајза (*Tomato spotted wilt tospovirus*) пореклом из различитих домаћина у Србији“, аутора Бранке Р. Петровић, констатујем да утврђено подударане текста износи 14%. Овај степен подударности је последица употребе цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, општих и стручних израза, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Датум: 28.04.2022. године

Ментор:

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