

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На V редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 07.03.2022. године, прихваћен је извештај ментора др Татјане Поповић и проф. др Тање Берић о урађеној докторској дисертацији Александре Д. Јелушић, истраживача-сарадника на Универзитету у Београду – Институту за мултидисциплинарна истраживања, под називом „**Карактеризација и биолошка контрола *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице (*Brassica napus* L.)**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Славиша Станковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Јелена Лозо, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет и др Петар Митровић, виши научни сарадник, Институт за ратарство и повртарство – Нови Сад, Институт од националног значаја за Републику Србију.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Александре Д. Јелушић, под називом „**Карактеризација и биолошка контрола *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице (*Brassica napus* L.)**“, представља опсежно истраживање генетичког диверзитета и патогених одлика колекције изолата бактерије *X. campestris* pv. *campestris* пореклом са озиме уљане репице, која је 2010. године први пут описана као домаћин овог патогена у Србији. Због релативно скоре појаве *X. campestris* pv. *campestris* на озимој уљаној репици у Србији, као и због великог значаја ове индустријске културе, такође је било важно испитати утицај *X. campestris* pv. *campestris* на састав аутохтоних бактеријских заједница њене филосфере и ризосфере, као и потенцијал ова два станишта за „акумулацију“ потенцијалних биоконтролних агенаса из родова *Bacillus* и *Pseudomonas*, који би могли наћи примену у сузбијању заразе изазване овим патогеном.

Ова докторска дисертација је урађена на Институту за заштиту биља и животну средину, Одсеку за болести биља, на Катедри за микробиологију, Универзитета у Београду – Биолошког факултета и на Одељењу за уљану репицу и остало индустријско биље, Института за ратарство и

повртарство у Новом Саду – Института од националног значаја за Републику Србију. Истраживања ове докторске дисертације су реализована у оквиру пројеката финансираних од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије: „Модификације антиоксидативног метаболизма биљака са циљем повећања толеранције на абиотски стрес и идентификација нових биомаркера са применом у ремедијацији и мониторингу деградираних станишта“, руководилац др Соња Вељовић Јовановић (ИИИ 43010, 2011-2019. године) и „Молекуларна карактеризација бактерија из родова *Bacillus* и *Pseudomonas* као потенцијалних агенаса за биолошку контролу“, руководилац проф. др Ђорђе Фира (ОИ173026, 2011-2019. године).

Докторска дисертација садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о ментору и члановима комисије, изјаву захвалности, сажетак са кључним речима на српском и енглеском језику, садржај, текст по поглављима, списак литературе и прилоге. Докторска дисертација је написана на 115 страна и подељена је на осам поглавља: Увод (10 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (22 стране), Резултати (36 страна), Дискусија (8 страна), Закључци (3 стране), Литература (18 страна) и Прилози (17 страна). Докторска дисертација садржи 33 слике, 30 табела и 277 библиографских јединица. Теза такође садржи и Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Поглавље „Увод“ докторске дисертације је подељено на пет потпоглавља, а у оквиру сваког од њих су наведени литературни подаци који су битни за разумевање теме докторске дисертације и који указују на њен значај. У потпоглављу „Уљана репица (*Brassica napus* L.)“ говори се о еволуцији, пореклу и географском распрострањењу ове биљне врсте, као и о њеном значају и вишеструкој примени у различитим гранама индустрије. Такође су поменути и најзначајнији бактеријски и гљивични патогени и инсекти, који су широм света познати као проузроковачи различитих болести и оштећења на уљаној репици. У другом потпоглављу „*X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson“, детаљно је описана бактерија од интереса, њена таксономска позиција, прва детекција, биохемијске карактеристике, подела на типове на основу интеракције са диференцијалним сортама, круг домаћина, штете које проузрокује и епидемиологија. Указујући на прву појаву бактерије *X. campestris* pv. *campestris* на озимој уљаној репици у Бачкој (Војводина, Србија) 2010. године, а од тада и на њену континуирану појаву, ово

потпоглавље наглашава важност спроведених истраживања у овој докторској дисертацији. Значај примене различитих молекуларних метода за идентификацију фитопатогених бактерија из рода *Xanthomonas* образложен је у потпоглављу „Примена молекуларних метода за идентификацију и карактеризацију *X. campestris* pv. *campestris*“. У оквиру овог потпоглавља је указано на значај примене специфичних прајмера за брзу прелиминарну детекцију патогена у оболелим биљним узорцима. Такође је указано на значај примене метода као што су ДНК профилисање и генотипизација и анализа секвенци више генских локуса, као и анализе засноване на алелима за утврђивање нивоа рекомбинација, које су имале значајну улогу у еволуцији *X. campestris* и које су омогућиле специјализацију ове врсте на различите биљне домаћине и издвајање патовара. У потпоглављу „Микробиота/микробиом биљака и ДНК метабаркодинг“ дефинисан је појам „микробиота биљака“ и указано је на значај микроорганизама који је чине, као и на утицај абиотичких и биотичких фактора на њено обликовање. Такође, истакнута је и све чешћа примена различитих платформи за секвенцирање наредне генерације у студијама микробиома различитих биљних органа и станишта која су у непосредној вези са биљкама и дат преглед досадашњих литературних података о испитивањима микробиома уљане репице. У потпоглављу „Биолошка контрола *X. campestris* pv. *campestris*“ најпре је дат свеобухватан преглед до сада најчешће коришћених приступа (агротехничких, физичких, хемијских и биолошких) у сузбијању црне трулежи изазване инфекцијом *X. campestris* pv. *campestris*. У даљем тексту, посебан акценат је стављен на потенцијал примене бактеријских биоконтролних агенаса, посебно врста из родова *Bacillus* и *Pseudomonas* у заштити биљака и за њих су детаљно објашњени могући механизми деловања на патогена и биљног домаћина. У даљем тексту је дат преглед литературних података у којима се потврђује способност различитих *Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp. изолата да супримирају заразу са *X. campestris* pv. *campestris* и истакнут је недостатак података о биоконтролним истраживањима везаним за сузбијање овог патогена на уљаној репици.

У поглављу „**Циљеви истраживања**“ дефинисани су следећи специфични циљеви:

- 1) Формирање колекције *X. campestris* pv. *campestris* пореклом са различитих сорти, линија и хибрида озиме уљане репице и са различитих локалитета у Војводини (Србија) током три године испитивања (2014, 2016. и 2018);
- 2) Испитивање генетичког диверзитета популација *X. campestris* pv. *campestris* пореклом са уљане репице;
- 3) Испитивање патогености *X. campestris* pv. *campestris* изолата на озимој уљаној репици и одређивање круга домаћина у оквиру гајених врста из фамилије Brassicaceae (купусњаче);

- 4) Утврђивање осетљивости сортимената (сорти, линија и хибрида) уљане репице према изолатима *X. campestris* pv. *campestris*;
- 5) Испитивање утицаја *X. campestris* pv. *campestris* на микробијални диверзитет филосфере и ризосфере различитих сорти, линија и хибрида озиме уљане репице применом метабаркодинг анализе;
- 6) Изолација и идентификација потенцијалних биоконтролних агенаса из родова *Bacillus* и *Pseudomonas* са филосфере и из ризосфере различитих сорти, линија и хибрида озиме уљане репице са и без симптома проузрокованих бактеријом *X. campestris* pv. *campestris*;
- 7) Испитивање биоконтролног потенцијала одабраних *Bacillus* и *Pseudomonas* врста и то њихових пуних култура и супернатаната према изолатима *X. campestris* pv. *campestris* у *in vitro* и *in vivo* условима;
- 8) Испитивање постојања генетичког потенцијала одабраних антагонистичких изолата (*Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp.) за синтезу антимикуробних супстанци (липопептида и антибиотика) и хемијска детекција антимикуробних супстанци у њиховим екстрактима.

Поглавље „**Материјал и методе**“ подељено је на два потпоглавља. У потпоглављу „**Материјал**“ наведени су: (1) референтни *X. campestris* pv. *campestris* сојеви и патотип сој који су коришћени за упоређивање у свим спроведним тестовима, (2) тачан састав течних и чврстих хранљивих подлога коришћених за изолацију и култивацију *X. campestris* pv. *campestris* и потенцијалних биоконтролних изолата, као и за све *in vitro* тестове и (3) раствори коришћени за изолацију ДНК и испитивање способности патогених сојева да формирају биофилм. У потпоглављу „**Методе**“ дат је детаљан опис коришћених метода у докторској дисертацији. Потпоглавље „Узорковање“ састоји се од два одељка у којима су описани: (1) начин узорковања биљног материјала за изолацију *X. campestris* pv. *campestris*, са подацима о локалитетима и години узорковања, као и (2) начин сакупљања узорака филосфере и ризосфере озиме уљане репице за метабаркодинг анализу и изолацију потенцијалних антагонистичких изолата. Друго потпоглавље „Методе за изолацију фитопатогених и потенцијалних антагонистичких сојева“, такође је подељено на два одељка у којима су описане методе коришћене за изолацију и формирање колекције *X. campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице и колекције потенцијалних антагонистичких *Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp. изолата са филосфере и из ризосфере биљака озиме уљане репице, са и без симптома заразе изазваних бактеријом *X. campestris* pv. *campestris*, и дате су листе добијених изолата са детаљним подацима. Треће потпоглавље, „Методе за испитивање патогености и вирулентности изолата *X. campestris* pv. *campestris*“, које је подељено је на три одељка, даје детаљне информације о методама које су коришћене за: (1) испитивање

патогености изолатата *X. campestris* pv. *campestris* на одабраној сорти уљане репице, (2) испитивање круга домаћина у оквиру гајених врста из фамилије Brassicaceae (броколи, купус, келј, келераба, карфиол, раштан) и (3) испитивање осетљивости сортимента уљане репице (50 сорти, линија и хибрида) на изолате *X. campestris* pv. *campestris*. Четврто потпоглавље „*In vitro* и *in vivo* тестови за испитивање биоконтролног потенцијала изолатата *Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp.“ детаљно описује примењене *in vitro* и *in vivo* методе за тестирање антагонистичке активности пуних култура и супернатаната колекције изолатата *Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp. на одабраним *X. campestris* pv. *campestris* сојевима и начин оцене добијене антагонистичке активности. Такође, у оквиру другог одељка овог потпоглавља, описана је и метода коришћена за тестирање способности изолатата *X. campestris* pv. *campestris* да формирају биофилм, чији су резултати, заједно са резултатима теста патогености, допринели селекцији *X. campestris* pv. *campestris* изолатата за тестирање антагонистичке активности супернатаната *in vitro* и за *in vivo* тестове. Наредно потпоглавље је посвећено описивању молекуларних метода коришћених за идентификацију и карактеризацију изолатата *X. campestris* pv. *campestris*. Ово потпоглавље је подељено на пет одељака у којима су детаљно су описане методе коришћене за изолацију ДНК из тестираних *X. campestris* pv. *campestris* изолатата и њихову прелиминарну идентификацију применом *X. campestris*- (DLH109/DLH112 и DLH120/DLH125) и *X. campestris* pv. *campestris*- (Dhrp_Xcc_F/Dhrp_Xcc_R и XCF/XCR) специфичних парова прајмера. Такође, описане су и методе које су коришћене за детаљније испитивање генетичког диверзитета изолатата: ДНК профилисање (BOX-, ERIC- и REP-PCR), генотипизација (*dnaK*, *fyuA*, *gltA*, *gyrB*, *lepA*, *rpoD*) и филогенетска анализа секвенци више генских локуса и анализа заснована на алелима (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* и *rpoD*). Шесто потпоглавље је такође посвећено молекуларним методама, али са аспекта идентификације [*Bacillus* spp. (16S rRNA и *tuf*) и *Pseudomonas* spp. (16S rRNA и *gyrB*)] потенцијалних антагонистичких *Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp. изолатата и испитивања њиховог генетичког потенцијала за продукцију липопептида и антибиотика са антимикуробном активношћу. Потпоглавље „Испитивање састава микробијалних заједница филосфере и ризосфере озиме уљане репице применом метабаркодинг анализе“ је подељено на два одељка у којима су детаљно описане методе коришћене за припрему узорака филосфере и ризосфере озиме уљане репице за изолацију тоталне ДНК и квантификацију, а након тога и за секвенцирање, биоинформатичку обраду добијених података и таксономску анотацију. Осмо потпоглавље „Хемијска анализа секундарних метаболита антагонистичких изолатата“ детаљно описује поступак етил-ацетатне и бензенове екстракције секундарних метаболита из супернатаната три одабрана

антагонистичка изолата и њихову хемијску анализу. У последњем поглављу је описан начин статистичке обраде података добијених у истраживању.

Поглавље **Резултати** је подељено на 10 потпоглавља: 1) Симптоми на озимој уљаној репици проузроковани са *X. campestris* pv. *campestris*; 2) Изолација и прелиминарна молекуларна идентификација *X. campestris* pv. *campestris*; 3) Утврђивање генетичког диверзитета *X. campestris* pv. *campestris*; 4) Патогеност *X. campestris* pv. *campestris* изолата са озиме уљане репице; 5) Метабаркодинг анализа; 6) Изолација потенцијалних биоконтролних сојева; 7) Испитивање антагонистичке активности изолата *in vitro*; 8) Молекуларна идентификација антагонистичких изолата; 9) Хемијска карактеризација продуката антагонистичких изолата и 10) *In vivo* биоконтролна активност одабраних антагонистичких изолата. С обзиром на недавну прву појаву бактерије *X. campestris* pv. *campestris* на озимој уљаној репици у Србији, као и на недостатак литературних података о њеној симптоматологији на овом домаћину, у првом потпоглављу су најпре детаљно описани симптоми који су запажени током петогодишњег периода (2014-2018) праћења, а који су обухватили време појаве симптома, начин и брзину прогресије болести, као и податке о временским условима (температура и количина падавина) који су претходили њиховој појави. У другом потпоглављу приказани су резултати везани за изолацију и прелиминарну молекуларну идентификацију *X. campestris* pv. *campestris* изолата, који су показали да је укупно 65 изолата са 10 посећених локалитета у Војводини припадало врсти *X. campestris* pv. *campestris*. Преосталих 17 изолата, пореклом са 8 локалитета, упркос морфолошкој сличности са *X. campestris* pv. *campestris*, нису били позитивни након амплификације са *X. campestris*- и *X. campestris* pv. *campestris*-специфичним прајмерима. У трећем потпоглављу су приказани резултати везани за молекуларну карактеризацију изолата *X. campestris* pv. *campestris*. Први одељак овог потпоглавља „Rep-PCR“ указује на постојање генетичког диверзитета између тестираних *X. campestris* pv. *campestris* изолата са озиме уљане репице, при чему је највећи број визуелно различитих профила добијен применом BOX-PCR (14) и ERIC-PCR (10) метода, а REP-PCR методом су генерисана само четири визуелно различита профила. На основу комбинације добијених резултата, одабрано је 10 репрезентативних и потенцијално генетички различитих изолата за даљи рад. Резултати приказани у наредном одељку „MLST/MLSA“ такође истичу постојање генетичке хетерогености на основу поделе 10 репрезентативних изолата и пет референтних сојева са озиме уљане репице из Србије на седам група на „Neighbour-joining“ филогенетском стаблу, конструисаном на основу конкатамерних секвенци шест конзервираних гена (*dnaK*, *fyuA*, *gltA*, *gyrB*, *lepA*, *rpoD*). Генетичка хетерогеност је доказана на основу свих гена, осим гена *fyuA*, на основу кога су сви *X. campestris* pv. *campestris* изолати били идентични. Одељак „Анализа заснована на алелима“ указује на

постојање пет типова секвенци (ST3, ST5, ST9, ST26, ST47) код 15 тестираних *X. campestris* pv. *campestris* изолата, од којих је ST47 био најзаступљенији и присутан само код изолата са озиме уљане репице. У овом одељку је на стаблу са минимални распонем приказана дистрибуција 47 типова секвенци за 15 *X. campestris* pv. *campestris* изолата са озиме уљане репице из Србије и 75 *Xanthomonas* spp. сојева пореклом са различитих домаћина и из различитих земаља. У четвртом потпоглављу су сумирани резултати патогености *X. campestris* pv. *campestris* изолата са озиме уљане репице. У првом одељку овог потпоглавља доказано је да су сви тестирани изолати патогени на тестираној сорти уљане репице, а на основу интензитета инфекције изолати су подељени у три групе: високо, средње и слабо вирулентни. У следећем одељку су приказани резултати испитивања круга домаћина 15 тестираних *X. campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице у оквиру гајених врста из фамилије Brassicaceae (броколи, купус, кел, келераба, карфиол, раштан). Доказано је да су изолати били патогени на свим домаћинима, а након обраде резултата, примећено је да су изолати статистички значајно вирулентнији на уљаној репици у односу на друге домаћине. Последњи одељак у оквиру овог потпоглавља односи се на резултате испитивања осетљивости сортимента уљане репице на *X. campestris* pv. *campestris* изолате, где је доказано да је свих 50 тестираних сорти, линија и хибрида уљане репице осетљиво на патогена. Резултати приказани у петом потпоглављу односе се на метабаркодинг анализу састава бактеријских заједница филосфере и ризосфере различитих сорти, линија и хибрида озиме уљане репице, са и без симптома заразе бактеријом *X. campestris* pv. *campestris*. У првом одељку су преко индекса Shannon, Simpson, Fisher Alpha, CHAO1 и ACE и преко рарефакционих кривих приказани подаци о алфа диверзитету у узорцима на нивоу раздела, фамилије и рода. Приказани резултати су указали на већи бактеријски диверзитет на свим испитиваним таксономским нивоима код тестираних узорка ризосфере у односу на узорке филосфере, али такође и на већи диверзитет у узорку филосфере без симптомима у односу на узорке филосфере са симптомима заразе са *X. campestris* pv. *campestris*. Даље су у оквиру истог одељка приказани резултати бета диверзитета добијени анализом главних компоненти, анализом груписања и канонском анализом кореспонденције. У одељку „Анализа састава микробијалних заједница филосфере и ризосфере озиме уљане репице“, приказане су разлике у релативној заступљености детектованих раздела, фамилија и родова у тестираним узорцима филосфере и ризосфере. Доказано је да присуство *X. campestris* pv. *campestris* у филосфери утиче на смањење заступљености потенцијално корисних бактеријских родова, као и да присуство патогена не утиче на промену састава бактеријских заједница ризосфере. У шестом потпоглављу дати су подаци о формираној колекцији потенцијалних антагонистичких *Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp. изолата из филосфере и

ризосфере озиме уљане репице, са и без симптома инфекције бактеријом *X. campestris* pv. *campestris*. У наредном потпоглављу су приказани резултати испитивања *in vitro* антагонистичке активности пуних култура и супернатаната 35 *Bacillus* spp. (27) и *Pseudomonas* spp. (8) изолата на *X. campestris* pv. *campestris*. Антагонистичка активност пуних култура је доказана за 10 *Bacillus* spp. (X2-1, X3-1, X5-2, X6-2, X6-3, X8-1, X8-2, X8-3, X11-1, X12-1) и шест *Pseudomonas* spp. (X2-1P, X3-1P, X4-1P, X1-2PMF, X2-1PMF, X5-1PMF) изолата, од којих су активност супернатанта показала само два *Bacillus* spp. (X5-2 и X6-3) и три *Pseudomonas* spp. (X2-1P, X2-1PMF и X5-1PMF) изолата. У овом потпоглављу су приказани и резултати испитивања способности *X. campestris* pv. *campestris* изолата да формирају биофилм. На основу утврђене способности да формирају биофилм, изолати су подељени у три категорије: изолате који показују слабу (категорија 1), умерену (категорија 2) и изражену (категорија 3) продукцију биофилма. Потпоглавље осам се односи на резултате молекуларне идентификације антагонистичких *Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp. изолата који су показали антагонистичку активност пуних култура и супернатаната *in vitro*. На основу секвенци гена за 16S rRNA и *tuf*, *Bacillus* spp. изолати X2-1, X5-2, X6-2, X6-3, X8-1 и X8-3 су редом идентификовани као: *B. luti*, *B. velezensis*, *B. wiedmannii*, *B. megaterium*, *B. halotolerans* и *B. circulans*, док је за преостала четири изолата (X3-1, X8-2, X11-1 и X12-1) са доказаном антагонистичком активношћу добијен исти проценат идентитета за две блиско сродне врсте, *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Два *Pseudomonas* spp. изолата X3-1P и X4-1P су на основу гена за 16S rRNA и *gyrB*, идентификовани до нивоа рода (*Pseudomonas* sp.), док су остали изолати (X2-1P, X1-2PMF, X2-1PMF и X5-1PMF) идентификовани као *P. orientalis*. Даље су у оквиру овог потпоглавља приказани резултати испитиваног генетичког потенцијала антагонистичких изолата за продукцију липопептида и антибиотика са антимикуробном активношћу. Доказано је да *B. velezensis* X5-2 има генетички потенцијал за продукцију липопептида сурфактина, курстакина, бациломицина Д и итурина; код *B. megaterium* X6-3 детектовани су гени за сурфактин и курстакин синтазу, а код *P. orientalis* X2-1P и X5-1PMF амплификован је само ген који кодира феназин-1-карбоксилну киселину. „Maximum likelihood“ филогенетско стабло је потврдило идентификацију изолата. Резултати хемијске анализе етил-ацетатних и бензенских екстраката, добијених из супернатаната одабраних антагонистичких изолата, приказани су у деветом потпоглављу. Утврђено је да су испарљива органска једињења по којима се разликује етил-ацетатни екстракт *B. megaterium* X6-3 од екстраката осталих изолата: 2-метилбутаноична киселина, 3-метилбутаноична киселина, 2-метилпропаноична киселина и сирћетна киселина. Једињења са антимикуробном активношћу по којима се разликује етил-ацетатни екстракт *B. velezensis* X5-2 од осталих су 2,3-бутандиол, метоксиметан и хенеикосан.

HPLC-ESI-qTOF/MS анализом је утврђено присуство једињења која одговарају курстакинима (C11 – C13), сурфактинима (C12 – C15), итуринима (C15 и C16) и бациломицину Д (C14 и C15) код изолата *B. velezensis* X5-2 и сурфактинима (C12 – C16) код *B. megaterium* X6-3. У екстрактима *P. orientalis* X2-1P детектовани су различити деривати бензоеве киселине и 2-хидроксифенил нитрит. Последње, десето потпоглавље приказује резултате испитивања *in vivo* антагонистичке активности пуних култура и супернатаната изолата и израчунату ефикасност два типа третмана (24 сата пре и 24 сата након инокулације биљака са изолатима *X. campestris* pv. *campestris*) за сваки од тестираних изолата (*B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3, *P. orientalis* X2-1P). *In vivo* третмани 24 сата пре инокулације *X. campestris* pv. *campestris* показали су ефикасност и до 82,37%, док су третмани 24 сата након инокулације *X. campestris* pv. *campestris* показали ефикасност и до 72,47%.

Поглавље **Дискусија** чини једну целину у којој аутор детаљно анализира добијене резултате и пореди их са доступним литературним подацима. На самом почетку поглавља истакнут је значај спроведених истраживања и образложена је постављена хипотеза која је била основа за почетак истраживања. У даљем тексту су истакнуте предности молекуларних метода за брзу детекцију патогена у оболелим биљним узорцима у односу на конвенционалне бактериолошке методе и тиме је истакнут значај примене специфичних прајмера коришћених и у овом истраживању за прелиминарну идентификацију *X. campestris* pv. *campestris*. Такође је дат осврт на досадашња истраживања у којима су коришћени прајмери за ДНК профилисање за испитивање генетичког диверзитета *X. campestris* pv. *campestris*. Наставак дискусије је био усмерен на резултате добијене секвенцирањем конзервираних гена. Објашњени су могући разлози нагомилавања и задржавања нуклеотидних промена на одређеним конзервираним генима и указано је на то да су неке од уочених промена на њима или све заједно, могле омогућити бактерији *X. campestris* pv. *campestris* колонизацију нове еколошке нише, која је различита од оне коју је првобитно насељавала. У даљем тексту су дискутовани резултати добијени анализом заснованом на алелима, којом је утврђено постојање пет типова секвенци, међу којима је тип секвенце ST47 био најзаступљенији и једино присутан код *X. campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице. С обзиром да је на основу конструисаног стабла са минималним распоном доказано да је ST47 повезан са предачким генотипом ST5 преко генотипа ST26, може се претпоставити да је ST47 постепено дивергирао од предачког генотипа и да је услед његове веће адаптивне вредности у новој еколошкој ниши дошло до повећања бројности популација *X. campestris* pv. *campestris* са новим генотипом. Дат је и осврт на досадашња новија истраживања генетичког диверзитета *X. campestris* pv. *campestris* применом различитих комбинација конзервираних гена. У наредној целини су дискутовани резултати теста патогености *X. campestris* pv. *campestris* и

испитивања круга домаћина у оквиру гајених врста из фамилије Brassicaceae (броколи, купус, кељ, келераба, карфиол, раштан). У овом одељку су дискутована најзначајнија запажања у истраживању, која указују на статистички значајно већи вирулентни потенцијал изолата *X. campestris* pv. *campestris* на уљаној репици, као домаћину са кога потичу, у односу на друге тестиране домаћине. Резултати су надовезани на претходно истраживање патогених својстава *X. campestris* pv. *campestris* изолата пореклом са *Brassica oleracea* (броколија, купуса, кеља, келерабе, карфиола и раштана) домаћина и уљане репице из Србије, у коме је овакав тип специјализације (патоген-домаћин) доказан само код изолата са уљане репице. С обзиром да су све тестиране сорте, линије и хибриди уљане репице били осетљиви на *X. campestris* pv. *campestris* изолате, исказана је потреба за проналажењем резистентних сортимената. На основу модела ген-за ген дискутована је могућност успостављања успешних услова за узгој резистентних сорти уљане репице на *X. campestris* pv. *campestris*. Следећи сегмент дискусије је био посвећен метабаркодинг анализи и истицању значаја оваквог типа истраживања. Детаљно су дискутовани добијени резултати са аспекта раздела, фамилије и рода за узорке филосфере и ризосфере уљане репице са и без симптома инфекције бактеријом *X. campestris* pv. *campestris*. Највећи акценат је ипак стављен на дискутовање уочених разлика између филосфере уљане репице са и без симптома инфекције јер је на овом примеру, управо због природе и епидемиологије патогена, његов утицај био најизраженији. Добијени резултати су упоређени са сличним доступним истраживањима, чиме је омогућено боље разумевање резултата о измени у саставу бактеријских заједница до кога је дошло као последица присуства патогена. У наредној тематској целини анализирани су резултати биоконтролних *in vitro* и *in vivo* огледа са аспекта три одабрана антагонистичка изолата: *B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3 и *P. orientalis* X2-1P пореклом са филосфере озиме уљане репице са и без симптома болести. Образложен је начин одабира изолата, а како би се објаснили могући механизми њихове антагонистичке активности, даља дискусија је била усмерена на детаљну анализу једињења која су детектована хемијском аналозом екстраката кроз поређење са доступном литературом и до сада откривеним механизмима деловања ових врста на патогена. Резултати су повезани и са утврђеним генетичким потенцијалом ових изолата за продукцију одређених липопептида и антибиотика. Са аспекта резултата *in vivo* огледа, и у поређењу са литературним подацима, дискутовано је о најбољем тренутку за апликацију биоконтролних агенаса, имајући у виду да је време апликације од круцијалног значаја у пољским условима. На самом крају овог поглавља, дат је предлог истраживања која би у будућности могла допринети решавању неких од питања отворених током досадашњег рада на овој тематици.

У поглављу **Закључци** изнета су 24 закључка, која су проистекла из резултата истраживања ове докторске дисертације, а који су у складу са изнесеним циљевима докторске дисертације, као и са постављеном хипотезом истраживања.

У поглављу **Литература** наведено је 277 библиографских јединица. Сви цитирани литературни извори су адекватно назначени у тексту и омогућавају стицање шире слике о значају теме докторске дисертације, као и лакше разумевање и тумачење добијених резултата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Jelušić, A.**, Popović, T., Dimkić, I., Mitrović, P., Peeters, K., Miklavčič Višnjevec, A., Tavzes, Č., Stanković, S., Berić, T. 2021. Changes in the winter oilseed rape microbiome affected by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and biocontrol potential of the indigenous *Bacillus* and *Pseudomonas* isolates. *Biological Control*, 160, 104695. **M21a** (IF: 3.687)
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104695>
2. **Jelušić, A.**, Berić, T., Mitrović, P., Dimkić, I., Stanković, S., Marjanović-Jeromela, A., Popović, T. 2021. New insights into the genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from winter oilseed rape in Serbia. *Plant Pathology*, 70(1), 35-49. **M21** (IF: 2.493)
<https://doi.org/10.1111/ppa.13273>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу (М34)

1. **Jelušić, A.**, Berić, T., Dimkić, I., Mitrović, P., Stanković, S., Marković, S., Popović, T. 2020. *In vitro* assessment of the antagonistic potential of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated from winter oilseed rape in Serbia. FEMS Online Conference on Microbiology 2020, October 28-31, Belgrade, Serbia, e-Abstract Book, ISBN-978-86-914897-6-2, p. 133.
2. **Jelušić, A.**, Popović, T., Dimkić, I., Mitrović, P., Stanković, S., Marković, S., Berić, T. 2020. PCR screening and chemical analysis of lipopeptides produced by *Bacillus velezensis* and *Bacillus megaterium* strains. FEMS Online Conference on Microbiology 2020, October 28-31, Belgrade, Serbia, e-Abstract Book, ISBN-978-86-914897-6-2, p. 134.
3. **Jelušić, A.**, Berić, T., Mitrović, P., Marković, S., Stanković, S., Popović, T. 2019. Genetic diversity of Serbian isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* originated from winter oilseed rape. 6th Congress of the Serbian Genetic Society, October 13-17, Vrnjačka Banja, Serbia, e-Abstract Book, ISBN-978-86-87109-15-5, p. 163.
4. **Jelušić, A.**, Dimkić, I., Berić, T., Mitrović, P., Marković, S., Stanković, S., Popović, T., 2019. Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting the phyllosphere of the diseased and healthy oilseed rape. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS 2019), July 7-11, Glasgow, Scotland, e-Abstract Book, PT186, 899.
5. **Jelušić, A.**, Popović, T., Mitrović, P., Dimkić, I., Stanković, S., Marković, S., Berić, T., 2019. Genetic heterogeneity among *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates originated from oilseed rape determined with different rep-PCR techniques. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS 2019), July 7-11, Glasgow, Scotland, e-Abstract Book, PT274, 991.

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Александре Д. Јелушић под насловом „Карактеризација и биолошка контрола *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице (*Brassica napus* L.)“, послата је 22.02.2022. на софтверску проверу оригиналности коришћењем програма iThenticate. На основу Извештаја утврђен је индекс сличности од 22%. Увидом у Извештај утврђено је да су подударности углавном последица претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из докторандове дисертације, списка састава медијума, ПЦР програма, списка прајмера, латинских имена и ознака сојева бактерија, имена и ознака линија, сорти и хибрида уљане репице, библиографских података о коришћеној литератури у самом тексту, искључујући списак литературе. Додатно, одређени делови текста код којих је утврђено подударање нису повезани и немају смисао.

Имајући у виду изнесено, а у складу са чланом 8., став 2, Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, Извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Александре Д. Јелушић, те се прописани поступак за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Александре Д. Јелушић под насловом „Карактеризација и биолошка контрола *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице (*Brassica napus* L.)“ представља оригинални научно-истраживачки рад који се бави испитивањем генетичког диверзитета и патогених одлика колекције изолата бактерије *X. campestris* pv. *campestris* пореклом са озиме уљане репице и могућностима њене биолошке контроле. Резултати представљени у овој докторској дисертацији представљају прве детаљне податке о симптоматологији *X. campestris* pv. *campestris* на уљаној репици; утицају овог патогена на састав бактеријских заједница филосфере и ризосфере различитих сорти, линија и хибрида ове биљне врсте и о могућностима биолошке контроле *X. campestris* pv. *campestris* баш на уљаној репици. Истраживања спроведена у овој дисертацији су успешно реализована, а добијени резултати су допринели решавању задатака постављених у циљевима.

Резултати из докторске дисертације су објављени у два научна рада, од којих је први објављен у међународном часопису изузетних вредности а други у врхунском међународном часопису, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата. Имајући у виду изнесено, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидата **Александре Д. Јелушић**, под насловом „**Карактеризација и биолошка контрола *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице (*Brassica napus* L.)**“, и да кандидату одобри јавну одбрану.

У Београду, 08.03.2022. године

КОМИСИЈА

др Славиша Станковић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Јелена Лозо, редовни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Петар Митровић, виши научни сарадник,
Институт за ратарство и повртарство – Нови
Сад, Институт од националног значаја за
Републику Србију