

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

На III редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одржаној 15.12.2022. године, прихваћен је извештај ментора др Татјане Поповић Миловановић и проф. др Славише Станковића о урађеној докторској дисертацији Сање С. Марковић, истраживача – сарадника на Универзитету у Београду – Институту за мултидисциплинарна истраживања, под називом „**Мониторинг, идентификација и молекуларно-генетичка карактеризација фитопатогених бактерија кромпира (*Solanum tuberosum* L.)**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Тања Берић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Оља Медић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Биолошки факултет и др Рената Иличић, виши научни сарадник, Универзитет у Новом Саду – Пољопривредни факултет.

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 Сање С. Марковић под називом „**Мониторинг, идентификација и молекуларно-генетичка карактеризација фитопатогених бактерија кромпира (*Solanum tuberosum* L.)**“, представља опсежно истраживање о појави фитопатогених бактерија кромпира у северном делу Србије. Мониторингом је обухваћено преко 2000 хектара усева кромпира у подручју интензивне производње. У овој докторској дисертацији као узрочници бактериоза кромпира идентификоване су врсте *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium brasiliense* и *Dickeya dianthicola* и извршена је њихова детаљна фенотипска и молекуларно-генетичка карактеризација. Бактерије *P. brasiliense* и *D. dianthicola* су први пут изоловане са кромпира у Србији.

Додатно, доказана је ефикасност антагонистичких сојева *Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6 и SS-38.4 у сузбијању болести изазваних овим фитопатогенима.

Ова докторска дисертација је урађена на Институту за заштиту биља и животну средину, Одсеку за болести биља и на Катедри за микробиологију, Универзитета у Београду – Биолошког факултета. 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 менторима 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 136 страна и подељена је на осам поглавља: Увод (11 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (18 страна), Резултати (44 стране), Дискусија (9 страна), Закључци (2 стране), Литература (20 страна) и Прилози (31 страна). Докторска дисертација садржи 68 слика, 19 табела и 288 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 четири 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 „Кромпир (*Solanum tuberosum* L.)“ говори се о значају кромпира, његовом пореклу и географском распрострањењу, као и о приносима и површинама на којима се гаји у свету, Европи и Србији. Такође, у овом потпоглављу дат је и осврт на обим производње кромпира у четири региона Србије и описани су најзначајнији изазови у његовој производњи. У другом

потпоглављу „Болести кромпира изазване бактеријама“ које се састоји из три одељка, наведен је значај бактерија као проузроковача болести кромпира, дат је преглед најважнијих бактерија које се јављају у усевима кромпира и наглашена је важност спроведених истраживања у овој докторској дисертацији. За две болести, бактериозну увелост и мрку трулеж кртола кромпира узроковану бактеријом *R. solanacearum* (први одељак овог потпоглавља) и трулеж приземног дела стабљике – „дрну ногу“ и влажну трулеж кртола кромпира узроковану *Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp. (други одељак овог потпоглавља) дат је детаљан преглед о таксономији узрочника болести, њиховој распрострањености у свету и Србији, домаћинима, епидемиологији, симптомима и штетама које проузрокују. За остале болести кромпира (трећи одељак овог потпоглавља) је дат кратак преглед о њиховом значају и распрострањености. Примена интегрисаних метода образложена је у потпоглављу „Методe за детекцију, идентификацију и карактеризацију фитопатогених бактерија кромпира“. У оквиру овог потпоглавља је указано на значај примене конвенционалних и савремених метода за идентификацију и карактеризацију фитопатогена, као што су проучавање култура на основу морфологије, биохемијско-физиолошких и одгајивачких особина, ДНК профилисање, као и генотипизација и анализа секвенци више генских локуса. У потпоглављу „Биолошка контрола“ дат је свеобухватан преглед превентивних и директних мера које се користе за сузбијање фитопатогених бактерија. У даљем тексту, посебан акценат је стављен на потенцијал примене бактеријских биоконтролних агенаса, посебно врста из рода *Bacillus*, у заштити биљака и дат је преглед могућих механизма њихових деловања на патогена и биљног домаћина. У даљем тексту наведени су литературни подаци у којима се потврђује потенцијал различитих сојева *B. amyloliquefaciens* да супримирају болести изазване врстом *R. solanacearum* и врстама из рода *Pectobacterium*.

У поглављу „Циљеви рада“ дефинисани су следећи циљеви:

- 1) Мониторинг усева кромпира у петогодишњем периоду (2015-2019. године) у северном делу Србије, симптоматологија и мапирање присуства потенцијалних фитопатогених бактерија;
- 2) Изолација фитопатогених бактерија из оболелих биљака кромпира и формирање колекције изолата;

- 3) Идентификација фитопатогених бактерија пореклом са кромпира коришћењем конвенционалних и савремених метода;
- 4) Одређивање филогенетског статуса и испитивање генетичког диверзитета фитопатогених бактеријских изолата пореклом са кромпира, као и генеалошка анализа идентификованих хаплотипова;
- 5) Анализа укупног диверзитета бактерија кртола кромпира и земљишта;
- 6) Испитивање антагонистичког потенцијала *Bacillus amyloliquefaciens* сојева SS-12.6 и SS-38.4 према фитопатогеним бактеријама са кромпира у *in vitro*, *in situ* и *in planta* условима.

Поглавље „**Материјал и методе**“ подељено је на два потпоглавља. У потпоглављу „**Материјал**“ наведени су по одељцима: (1) фитопатогени изолати; (2) контролни сојеви; (3) антагонистички сојеви; (4) хранљиве подлоге коришћени за изолацију и култивацију фитопатогених бактерија и антагонистичких сојева, као и за све биохемијско-физиолошке тестове и (5) пуфери и раствори, који су коришћени у току израде докторске дисертације. У потпоглављу „**Методе**“ дат је детаљан опис коришћених метода у докторској дисертацији. У првом одељку овог потпоглавља „Мониторинг усева кромпира и сакупљање узорка са симптомима бактериоза“ описана је динамика спровођења мониторинга, дат је преглед локалитета на којима су гајени праћени усеви кромпира, као и начин узорковања биљног материјала за изолацију фитопатогена. Други одељак овог потпоглавља „Изолација фитопатогених бактерија“ је подељен на два дела у којима су описани поступци у изолацији бактерија из: (1) кртола кромпира са симптомима промена у проводном ткиву и (2) биљака са симптомима црне ноге и влажне трулежи кртола кромпира. У трећем одељку „Фенотипске карактеристике“ дат је детаљан преглед метода којима су утврђиване (1) биохемијско-физиолошке карактеристике изолата; (2) патогеност *R. solanacearum* изолата на биљкама кромпира, парадајза и плавог патлициана; (3) патогеност *Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp. изолата на биљкама кромпира и (4) имунофлуоресценција *R. solanacearum* изолата. Наредни, четврти одељак је посвећен описивању молекуларних метода коришћених за идентификацију и карактеризацију фитопатогених изолата. У овом одељку се налази осам делова који се односе на: (1) изолацију ДНК; (2) припрему ПЦР смеше; (3) идентификацију *R. solanacearum* изолата коришћењем специфичних прајмера („PS-1/PS-2“ и „OLI-1/Y-2“) и биовар специфичних прајмера („Rs-1-F/Rs-1-R“ специфичан за биоваре 1

и 2; „Rs-1-F/Rs-3-R“ специфичан за биоваре 3, 4 и 5); (4) идентификацију изолата који припадају врстама родова *Pectobacterium* и *Dickeya* („F0145/E2477“ за идентификацију *P. carotovorum*, „BR1f/L1r“ за идентификацију *P. brasiliense*, „ECA1f/ECA2r“ за идентификацију *P. atrosepticum* и „ADE1/ADE2“ за идентификацију *Dickeya* spp.); (5) детаљније испитивање генетичког диверзитета изолата коришћењем „rep-PCR“ методе са „BOX-“ „ERIC-“ и „REP-PCR“ прајмерима; (6) услове извођења хоризонталне елетрофорезе; (7) генотипизацију и анализу секвенци више генских локуса коришћењем 14 гена (*adk*, *gapA*, *gdhA*, *gyrB*, *ppsA*, *hrpB* и *fliC* за *R. solanacearum* и *acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* и *proA* за *Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp.) и (8) генеалогску анализу хаплотипова. У петом одељку „Метабаркодинг анализа бактеријског диверзитета кртола кромпира и земљишта“ описане су методе коришћене за испитивање и описивање микробијалне заједнице кртола кромпира са и без симптома влажне трулежи, као и земљишта које је окруживало испитиване кртоле применом „NGS“ технике секвенцирања. Последњи одељак „Одређивање антагонистичког потенцијала *B. amyloliquefaciens* сојева SS-12.6 и SS-38.4“ је подељен у четири дела: (1) *in vitro* огледи у којима су одређени антагонистички потенцијали сојева SS-12.6 и SS-38.4 испитивањем пуних култура, супернатаната и етил-ацетатних екстраката према фитопатогенима (*R. solanacearum* Rs0115, Rs6616 и Rs8118; *P. carotovorum* Pcc324; *P. brasiliense* Pcb133, Pcb62, Pcb2544, Pcb2811 и Pcb2842; и *D. dianthicola* Dd31), МИК и МБК етил-ацетатних екстраката сојева SS-12.6 и SS-38.4 за фитопатогене, способност продукције биофилма фитопатогених изолата и утицај етил-ацетатних екстраката сојева SS-12.6 и SS-38.4 на продукцију биофилма фитопатогена; (2) *in situ* огледи у којима је одређен антагонистички потенцијал сојева SS-12.6 и SS-38.4 према изолатима бактерија *P. carotovorum* (Pcc324), *P. brasiliense* (Pcb133, Pcb62, Pcb2544, Pcb2811 и Pcb2842) и *D. dianthicola* (Dd31) на кртолама кромпира; (3) *in planta* огледи у којима је одређен антагонистички потенцијал сојева SS-12.6 и SS-38.4 према *R. solanacearum* изолатима (Rs0115, Rs6616 и Rs8118) на биљкама кромпира и (4) статистичка обрада резултата добијених у *in vitro*, *in situ* и *in planta* огледима.

Поглавље **Резултати** је подељено на шест потпоглавља: (1) „Детектоване бактериозе кромпира“; (2) „Изолација бактерија“; (3) „Фенотипске карактеристике“; (4) „Молекуларно-генетичке карактеристике“; (5) „Анализа диверзитета заједнице микроорганизама кртола кромпира“ и (6) „Биолошка контрола“. У првом потпоглављу у оквиру два одељка „Мрка

трулеж кртола кромпира“ и „Црна нога и влажна трулеж кртола кромпира“ су детаљно описани симптоми који су запажени на посматраним усевима кромпира током петогодишњег мониторинга (2015-2019. године) и/или на сакупљеним узорцима које су чиниле биљке и/или кртоле. У току вегетације кромпира у усевима нису уочени симптоми бактериозне увелости, али је укупно 229 узорака кртола означено као потенцијално позитивно на присуство мрке трулежи. Узорци су сакупљени са локалитета Српски Милетић и Стапар током 2015. године (88 узорака); са локалитета Болеч, Сомбор, С. Милетић и Стапар током 2016. (140 узорака); и локалитет Змајево током 2018. (један узорак). На усевима кромпира на локалитетима Кулпин (2016. и 2019. године); Фекетић, Кула, Обровац (2018. године); и Маглић (2018. и 2019. године) је бележена појава црне ноге и влажне трулежи кромпира у епифитотичним размерама и дат је детаљан преглед динамике развоја симптома на посматраним усевима. У другом потпоглављу приказани су резултати везани за изолацију бактерија из сакупљених узорака. Резултати првог одељка овог потпоглавља „Изолација бактерија из кртола са симптомима мрке трулежи“ указују да је из ове групе узорака добијено укупно 70 изолата (27 из узорака сакупљених током 2015. године, 37 током 2016. и шест током 2018. године) који су коришћени за даљи рад. Изглед добијених колонија је у потпуности одговарао колонијама референтног соја *R. solanacearum* PD 2762. Резултати другог одељка овог потпоглавља „Изолација бактерија из биљака и кртола са симптомима црне ноге и влажне трулежи“ указују да су изолати из ове групе узорака изолати образовали два типа колонија (41 изолат добијен у 2016, 2018. и 2019. години и девет изолата у 2018. години) и да је добијено укупно 50 изолата који су коришћени за даљи рад. У трећем потпоглављу су приказани резултати везани за фенотипске карактеристике изолата. Резултати првог одељка овог потпоглавља „Биохемијско-физиолошке карактеристике изолата“ указали су на постојање три групе изолата, при чему је утврђено да прву групу од 70 изолата чине изолати добијени из кртола са симптомима мрке трулежи, и да ови изолати поседују карактеристике које у потпуности одговарају референтном соју *R. solanacearum* PD 2762. Друга и трећа група изолата је добијена из узорака са симптомима црне ноге и влажне трулежи кртола, а резултати указују да карактеристике ових изолата одговарају упоредном *P. carotovorum* Pcc10 (41 изолат), односно и референтном *D. solani* МК10 соју (девет изолата). Резултати приказани у наредном одељку „Доказивање патогености“ су указали да су изолати који су

идентификовани као *R. solanacearum* патогени за биљке кромпира, парадајза и плавог патлиџана и да су након две недеље (кромпир), односно седам дана (парадајз и плави патлиџан) проузроковали потпуно пропадање инокулисаних биљака. Изолати идентификовани као *Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp. су након седам дана (инфилтрацијом бактеријске суспензије у стабло), односно три недеље (заливањем супстрата) проузроковали потпуно пропадање биљака кромпира. Из свих тест биљака које су коришћена за доказивање патогености реизолација на одговарајуће подлоге је успешно извршена. Резултати трећег одељка „Тест имунофлуоресценције“ указали су на присуство флуоресцентних бактеријских ћелија применом одговарајућих проба, што је потврдило припадност изолата врсти *R. solanacearum*. У четвртном потпоглављу су сумиране молекуларно-генетичке карактеристике изолата. У првом одељку овог потпоглавља „Идентификација и карактеризација *R. solanacearum* изолата“ је применом специфичних и биовар специфичних прајмера доказана припадност 70 изолата врсти *R. solanacearum* биовара 2 (за специфичне прајмере „PS-1/PS-2“ и „OLI-1/Y2“ амплификовани су фрагменти величине 553 бп, односно 288 бп, док су за биовар специфични прајмер „Rs-1-F/Rs-1-R“ амплификовани фрагменти величине 718 бп). Даље, у оквиру истог одељка утврђено је да су „BOX-PCR“ профили указали на одсуство генетичке варијабилности, док су се „ERIC-“ и „REP-PCR“ профили раздвојили на три („ERIC-“) односно пет („REP-“) група профила. Узимајући у обзир добијене резултате и годину, локалитет и сорту кромпира са којих су изоловани, за даљи рад одабрано је 33 изолата. Резултати добијени секвенцирањем седам гена (*adk*, *gapA*, *gdhA*, *gyrB*, *ppsA*, *hrpB* и *fliC*) су потврдили сродност 33 тестирана изолата са референтним и другим сојевима из НЦБИ (Национални центар за биотехнолошке информације) базе и утврђено је да ови изолати припадају филотипу II бактерије *R. solanacearum*. Хаплотипска мрежа је показала да изолати са кромпира у Србији заједно са сојевима из Европе и других делова света припадају предачком хаплотипу. У другом одељку овог потпоглавља „Идентификација и карактеризација *Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp. изолата“ прво су наведени резултати примене специфичних прајмера, односно да је пет изолата идентификовано као *P. carotovorum* (прајмери „F0145/E2477“ амплификовали су фрагменте величине 666 бп), 36 изолата као *P. brasiliense* (прајмери „BR1f/L1r“ амплификовали су фрагменте величине 322 бп) и девет изолата као *Dickeya* spp. (прајмери „ADE1/ADE2“ амплификовали су фрагменте величине 420 бп), а да коришћењем

„ECA1f/ECA2r“ прајмера није дошло до умножавања ДНК, односно није констатовано присуство бактерије *P. atrosepticum* у сакупљеним узорцима. Даље, у оквиру истог одељка „Rep-PCR“ профилисање је показало постојање генетичке хетерогености *Pectobacterium* изолата (шест група профила) и генетичке хомогености изолата *D. dianthicola*. На основу наведених резултата из сваке од седам утврђених група профила одабрана су по три репрезентативна изолата (укупно 21 изолат). Резултати добијени секвенцирањем седам гена (*acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* и *proA*) су за три изолата потврдили сродност са *P. carotovorum* сојевима из НЦБИ базе (са једним новим хаплотипом), а за 15 изолата сродност са *P. brasiliense* сојевима из НЦБИ базе (са пет нових хаплотипова). За хаплотип 5SRB\_PCB је показано да је дуже у популацији од осталих хаплотипова из Србије. Такође, три генетички хомогена изолата идентификована су као *D. dianthicola* на основу сродности са сојевима из НЦБИ базе и представљају нов хаплотип. Резултати приказани у петом потпоглављу односе се на метабаркодинг анализу састава бактеријских заједница кртола кромпира са и без симптома влажне трулежи кртола и земљишта које је окруживало те кртоле. Разноликост алфа и бета диверзитета бактеријских заједница утврђена је поређењем разлика на таксономском нивоу реда, фамилије и рода. Највећи алфа диверзитет (приказан кроз „FisherAlpha“ индекс) је утврђен у узорцима кртола кромпира без симптома влажне трулежи и у земљишту које је окруживало те кртоле. Бета диверзитет процењен „PCoA“ анализом утврдио је блиску повезаност између узорака кртола кромпира, односно утврдио је да је састав бактеријске заједнице код узорака кромпира сличнији међусобно, него са узорцима земљишта. Даље, на основу ове анализе утврђено је да су Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes и Actinobacteria присутни у свим узорцима. Раздео Proteobacteria је био најзаступљенији у свим узорцима, нарочито у узорцима кртола без симптома влажне трулежи. Најдоминантнији род у кртолама са симптомима је био *Acinetobacter*, док су *Pseudomonas* и *Enterobacter* били најбројнији у кртолама без симптома. *Bacteroides* и *Dysgonomonas* су готово искључиво били присутни у кртолама са влажном трулежи и њиховим земљиштима. Најзаступљенији родови у земљишту око кртола без симптома су били *Gaiella*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Gemmatimonas* и *Geminicoccus*. У свим узорцима су детектоване *Pectobacterium* врсте (*P. aroidearum*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* и *P. polaris*), које су биле бројније у кртолама без симптома, док су врсте из рода *Dickeya* биле на граници детекције или потпуно одсутне. У последњем потпоглављу приказани су



результати испитивања потенцијала антагонистичких сојева *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 и SS-38.4 да инхибирају изоловане фитопатогене бактерије *R. solanacearum*, *P. carotovorum*, *P. brasiliense* и *D. dianthicola* у *in vitro*, *in situ* и *in vivo* условима. У првом одељку овог потпоглавља приказани су резултати *in vitro* испитивања. За пуне културе, супернатанте и етил-ацетатне екстракте *B. amyloliquefaciens* сојева SS-12.6 и SS-38.4 утврђена је антагонистичка активност према изолатима *R. solanacearum*. Пуне културе сојева SS-12.6 и SS-38.4 су испољиле слабу антагонистичку активност на *D. dianthicola* изолат, док за изолате *P. carotovorum* и *P. brasiliense* није утврђена антагонистичка активност. *Pectobacterium* и *Dickeya* изолати су показали осетљивост према супернатантима и етил-ацетатним екстрактима антагонистичких сојева. С обзиром да су етил-ацетатни екстракти сојева SS-12.6 и SS-38.4 показали најјачу антимикуробну активност (у односу на пуне културе и супернатанте) према свим испитиваним изолатима одређене су њихове МИК и МБК вредности. Дефинисане МИК и МБК вредности су показале најизраженији ефекат према *R. solanacearum* изолатима, а затим према *Pectobacterium* spp. и *D. dianthicola* изолатима. Даље, у овом потпоглављу приказани су и резултати испитивања способности фитопатогених изолата да формирају биофилм. Изолати врста *R. solanacearum* *P. carotovorum*, *P. brasiliense* су показали слабу способност формирања биофилма, док је *D. dianthicola* показао умерену способност формирања биофилма. Резултати деловања етил-ацетатних екстраката сојева *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 и SS-38.4 на формирање биофилма фитопатогених изолата показали су да је инхибиција формирања биофилма зависила од концентрације екстракта која је примењена. У следећем одељку овог потпоглавља су приказани резултати *in situ* (на кртолама кромпира) оцене антагонистичке активности *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 и SS-38.4 сојева према *P. carotovorum*, *P. brasiliense* и *D. dianthicola* изолатима. Антагонистички сојеви SS-12.6 и SS-38.4 су статистички значајно смањили интензитет влажне трулежи кромпира, што је утврђено визуелном проценом за већину изолата, а мерењем тежине кртола након пет дана инкубације, за све изолате. Бележена ефикасност третмана је била између 66,5 и 79,4%. Такође, ови сојеви су статистички значајно смањили интензитет влажне трулежи 15 дана након инкубације, што је утврђено код већине изолата визуелном проценом. Мерењем тежине кртола утврђено је статистички значајно смањење интензитета влажне трулежи код свих третмана са антагонистичким сојем SS-12.6 и већине третмана са сојем SS-38.4. Забележена ефикасност

третмана је била између 19,7-45,9%. Антагонистички сојеви SS-12.6 и SS-38.4 су показали сличан ефекат у сузбијању испитиваних фитопатогена. У последњем одељку овог потпоглавља су приказани резултати *in vivo* антагонистичке активности *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 и SS-38.4 сојева према *R. solanacearum* изолатима. На основу визуелне процене увелости листова биљака кромпира третман са антагонистичким сојевима је статистички значајно редуковао интензитет обољења за већину изолата у односу на позитивну контролу. Бележена ефикасност третмана је била између 28,64 и 60,22%. Мерењем тежине свежих и сувих биљака утврђена је статистички значајна разлика између биљака које су заражене *R. solanacearum* и третмана са антагонистичким сојевима SS-12.6 и SS-38.4. Антагонистички сојеви SS-12.6 и SS-38.4 су показали сличан ефекат у сузбијању испитиваних фитопатогена.

Поглавље **Дискусија** је подељено у четири потпоглавља у којима аутор детаљно анализира добијене резултате и пореди их са доступним литературним подацима. На самом почетку истакнут је значај спроведених истраживања и образложена је постављена хипотеза која је била основа за почетак истраживања. У првом потпоглављу „Увелост и мрка трулеж кртола кромпира-мониторинг, фенотипске и молекуларно-генетичке карактеристике проузроковача болести“ дискутовани су резултати везани за прву од две детектоване болести, односно за мрку трулеж кртола кромпира. С обзиром да симптоми увелости које проузрокује *R. solanacearum* нису уочени у току трајања мониторинга, дискутовано је о отежавајућим околностима за утврђивање, као што су велике површине праћених усева и чињеница да исти симптоми могу да буду проузроковани другим биотичким и абиотичким факторима, на шта указују и друга досадашња сазнања. Даље је дискутовано о уоченим симптомима на сакупљеним узорцима и закључку да је дијагностички тест потапања кртола у воду, при чему се из спроводних судова ослобађа ексудат у виду нити, довољно дискриминаторан да упути на проузроковача болести бактериозне природе (*R. solanacearum* или *C. sepedonicus*). Локалитети на којима је утврђена *R. solanacearum* током овог истраживања су упоређени са доступним наводима о претходно утврђеним локалитетима у подручју интензивне производње за ову бактерију, па је разматрана позиција тих локалитета и дискутовани су могући путеви ширења овог патогена. Наставак дискусије је био усмерен на анализу карактеризације добијених изолата, односно на њихове фенотипске одлике, а резултати су повезивани са досадашњим сазнањима. Дати су резултати коришћених прајмера за ДНК профилисање за испитивање генетичког диверзитета *R. solanacearum*, као

и осврт на досадашња истраживања других аутора. Молекуларно-генетичком карактеризацијом је утврђено да изолати припадају филолипу II и истакнуто је да су ово први налази таквог типа утврђени за *R. solanacearum* изолате изоловане у Србији, као и да су добијени изолати идентични међусобно и са другим сојевима који су пореклом из географски удаљених подручја. На основу приказаних сазнања дискутовано је о могућим хипотезама о пореклу изолате. У следећем потпоглављу „Црна нога и влажна трулеж кртола кромпира-мониторинг, фенотипске и молекуларно-генетичке карактеристике проузроковача болести“ дискутовано је о резултатима који су везани за другу забележену болест кромпира бактериозне природе, односно о црној нози и влажној трулежи кртола. Указано је на сазнање да је симптоматологија ове болести довољно дискриминаторна да може да укаже на проузроковаче из родова *Pectobacterium* и *Dickeya*, али не и на саме врсте. Сазнања о симптомима добијена у овом раду упоређена су симптомима које су навели други аутори у досадашњим истраживањима. У наставку је дат приказ о проузроковачима из родова *Pectobacterium* и *Dickeya* који се појављују у Европи и дискутовано је о смени међу узрочницима ове болести. Наставак дискусије је био усмерен на анализу карактеризације добијених изолате у односу на њихове фенотипске одлике, а добијени резултати су повезивани са досадашњим сазнањима. Дати су резултати коришћених прајмера за ДНК профилисање за испитивање генетичког диверзитета изолате и упоређени су са наводима других аутора. Молекуларно-генетичком карактеризацијом је утврђено да изолате припадају врстама *P. carotovorum*, *P. brasiliense* и *D. dianthicola*. Наглашено је да су сазнања добијена у току ове дисертације, прва о бактеријама *P. brasiliense* и *D. dianthicola* које су изоловане са кромпира у Србији. У даљем тексту су дискутовани резултати добијени анализом заснованом на секвенцирању конзервираних гена, којом је утврђено постојање једног хаплотипа код *P. carotovorum*, пет код *P. brasiliense* и једног код *D. dianthicola*. На основу приказаних сазнања дискутовано је о могућим закључцима о пореклу изолате. Постојање пет *P. brasiliense* хаплотипова је значајан резултат који указује на вероватноћу интродукције овог патогена са садним материјалом, јер је утврђена велика генетичка варијабилност изолате. Следеће потпоглавље дискусије „Диверзитет заједнице микроорганизама кртола кромпира“ се односило на резултате метабаркодинг анализе. Детаљно су дискутовани добијени резултати са аспекта раздела, фамилије и рода за кртоле кромпира са и без симптома влажне трулежи, као и земљишта које је окруживало ове

кртоле. Такође, дискутовано је присуство или одсуство појединих бактеријских родова, а добијени резултати су упоређени са сличним и доступним истраживањима, чиме је омогућено боље разумевање резултата о измени у саставу бактеријских заједница. У последњем потпоглављу „Биолошка контрола проузроковача мрке трулежи и црне ноге и влажне трулежи кромпира“ дискутовано је о резултатима биоконтролних *in vitro*, *in situ* и *in vivo* огледа са аспекта два одабрана антагонистичка *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 и SS-38.4 соја. Дискусија овог потпоглавља је започета навођењем досадашњих сазнања о антагонизму ових сојева, због којих је њихово коришћење у овој студији било оправдано. Резултати *in vitro* огледа као почетног скрининга су указали да антагонистички сојеви делују на све фитопатогене који су добијени у току овог истраживања и да је улога липопептидних једињења у потенцијалу за сузбијање фитопатогена значајна. Дат је осврт на досадашња истраживања других аутора и упоређене су и наведене вредности пречника инхибиторних зона насталих деловањем сојева SS-12.6 и SS-38.4 на изоловане фитопатогене. Дискутовани су резултати да је највећу отпорност према антагонистичким сојевима показала врста *D. dianthicola*, просечну *P. carotovorum* и *P. brasiliense*, а најмању *R. solanacearum*. Даље је дискутовано о способности стварања биофилма фитопатогених бактерија као значајног фактора њихове вируленције. Наведено је и да је *D. dianthicola* показала умерену способност стварања биофилма, док су *P. carotovorum*, *P. brasiliense* и *R. solanacearum* показале слабу способност стварања биофилма. Сходно овим резултатима, при једнаким концентрацијама етил-ацетатних екстраката сојева SS-12.6 и SS-38.4 за све испитиване фитопатогене, сојеви су показали најбољи антагонистички потенцијал за инхибицију *R. solanacearum*. Следећи сегмент дискусије се односио на сузбијање симптома влажне трулежи узроковане бактеријама *P. carotovorum*, *P. brasiliense* и *D. dianthicola* на целим кртолама кромпира. Закључено је да су антагонистички сојеви значајно утицали на интензитет обољења смањујући симптоме влажне трулежи и пети и 15. дан и да су били подједнако ефикасни (66,5-79,4% петог дана и 19,7-45,9% 15. дана). Процењена ефикасност третмана је упоређена са наводима других аутора и закључено је да се би се дужим трајањем предтретмана антагонистима вероватно добили још бољи резултати. Наставак дискусије је био усмерен на резултате *in planta* експеримента у којима су коришћени *B. amyloliquefaciens* сојеви SS-12.6 и SS-38.4 за сузбијање *R. solanacearum*. Антагонистички сојеви су били ефикасни у сузбијању бактериозног увенућа у распону од

28,64-60,22%, а добијени резултати су упоређени са сличним доступним истраживањима. Сходно свим анализираним резултатима, закључено је да су *B. amyloliquefaciens* сојеви SS-12.6 и SS-38.4 показали високу антагонистичку активност у *in vitro*, *in situ* и *in planta* условима против *R. solanacearum*, *P. carotovorum*, *P. brasiliense* и *D. dianthicola* врста и да би се стога могли користити као препарат за биоконтролу широког спектра за сузбијање бактериозне увелости и мрке трулежи кртола и/или црне ноге и влажне трулежи кртола кромпира.

У поглављу **Закључци** изнето је 11 закључака који су проистекли 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 288 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) **Marković, S.**, Stanković, S., Jelušić, A., Iličić, R., Kosovac, A., Poštić, D., Popović, T. 2021. Occurrence and identification of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* and *Dickeya dianthicola* causing blackleg in some potato fields in Serbia. *Plant Disease*, 105(4), 1080-1090. **M21** (IF: 4.614)  
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS-05-20-1076-RE>
- 2) **Marković, S.**, Stanković, S., Iličić, R., Veljović Jovanović, S., Milić Komić, S., Jelušić, A., Popović, T. 2021. *Ralstonia solanacearum* as a potato pathogen in Serbia: Characterization of strains and influence on peroxidase activity in tubers. *Plant Pathology*, 70(8), 1945-1959. **M21** (IF: 2.772)  
<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ppa.13421>
- 3) **Marković, S.**, Popović, T., Berić, T., Dimkić, I., Jelušić, A., Iličić, R., Stanković, S. 2022. Metabarcoding Approach for Evaluation of Bacterial Diversity in Soft Rotting Potato Tubers and Corresponding Geocaulospheres. *Potato Research*, 1-18. **M22** (IF: 2.561)  
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11540-022-09601-9.pdf?pdf=button>

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

- 1) **Marković, S.**, Popović, T., Stanković, S., Jelušić, A. 2018. Monitoring of potato fields to presence of *Ralstonia solanacearum*. 12 th Congress of Serbian microbiologists with international participation “MICROMED 2018 REGIO”, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, 209-210.
- 2) **Marković, S.**, Dimkić, I., Stanković, S., Jelušić, A., Iličić, R., Popović, T. 2019. Metagenomic analysis of microbial communities associated with diseased potato tubers. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS 2019), Glasgow, Scotland, Abstract Book, PT168, 881.
- 3) **Marković, S.**, Stanković, S., Jelušić, A., Iličić, R., Popović, T. 2019. Multilocus sequence analysis of *Ralstonia solanacearum* isolates originated from potato in Serbia. 6th Congress of the Serbian Genetic Society, October 13-17 th , Vrnjačka Banja, Serbia, Abstract Book, 164.
- 4) **Marković, S.**, Popović, T., Jelušić, A., Iličić, R., Stanković, S. 2019. Genetic insight into the isolates causing blackleg disease on potato. 6th Congress of the Serbian Genetic Society, October 13-17 th , Vrnjačka Banja, Serbia, Abstract Book, 165.
- 5) **Marković, S.**, Popović, T., Jelušić, A., Iličić, R., Stanković, S. 2020. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strains SS-12.6 and SS-38.4 in biological control of potato rot pathogens. FEMS Online Conference on Microbiology 2020, October 28-31, Belgrade, Serbia, Electronic Abstract Book, 178.

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Сање С. Марковић под насловом „Мониторинг, идентификација и молекуларно-генетичка карактеризација фитопатогених бактерија кромпира (*Solanum tuberosum* L.)“, послата је 26.12.2022. на софтверску проверу оригиналности коришћењем програма iThenticate. На основу Извештаја утврђен је индекс сличности од 6%. 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, 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 Сање С. Марковић, те се прописани поступак за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Сање С. Марковић под насловом „Мониторинг, идентификација и молекуларно-генетичка карактеризација фитопатогених бактерија кромпира (*Solanum tuberosum* L.)“ представља оригинални научно-истраживачки рад који се бави испитивањем генетичког диверзитета изолата бактерија *R. solanacearum*, *P. carotovorum*, *P. brasiliense* и *D. dianthicola* пореклом са кромпира и могућностима њихове биолошке контроле. Резултати представљени у овој докторској дисертацији представљају прве детаљне податке о мониторингу бактериоза кромпира у подручју интензивне производње, симптоматологији фитопатогена *R. solanacearum*, *P. carotovorum*, *P. brasiliense* и *D. dianthicola*, као и о могућностима биолошке контроле антагонистичким сојевима *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 и SS-38.4. 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 три научна рада, од којих су два објављена у врхунском међународном часопису, а трећи у истакнутом 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 **Сање С. Марковић**, под насловом „**Мониторинг, идентификација и молекуларно-генетичка карактеризација фитопатогених бактерија кромпира (*Solanum tuberosum* L.)**“, и да кандидату одобри јавну одбрану.

У Београду, 26.12.2022. године

## КОМИСИЈА

---

др Тања Берић, редовни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Оља Медић, научни сарадник,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Рената Иличић, виши научни сарадник,  
Универзитет у Новом Саду – Пољопривредни факултет