

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.10.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Славише Станковића и др Татјане Поповић о урађеној докторској дисертацији Ивана С. Николића, истраживача сарадника на Биолошком факултету, Универзитета у Београду, под насловом **“Идентификација, генетички диверзитет и биолошка контрола *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* са подручја Србије”** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Славиша Станковић, редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет, др Татјана Поповић, виши научни сарадник, Институт за заштиту биља и животну средину, др Ђорђе Фира, редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет, др Тања Берић, ванредни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет и др Јелена Лозо, ванредни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Ивана Николића, под насловом **“Идентификација, генетички диверзитет и биолошка контрола *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* са подручја Србије”** обухвата 134 стране и садржи 8 поглавља: Увод (19 страна), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (34 стране), Резултати (23 стране), Дискусија (14 страна), Закључци (3 стране), Литература (15 страна) и Прилог (25 страна). На почетку дисертације приложен је сажетак на српском и енглеском језику. Дисертација садржи: 18 табела и 49 слика. Поглавље литература садржи 155 библиографских јединица. У дисертацији су приложени биографија кандидата, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

У докторској дисертацији кандидат Иван Николић врши идентификацију фитопатогене бактерије узрочника болести лисне пегавости шећерне репе, утврђује генетички и патогени диверзитет у оквиру сакупљене колекције бактеријских изолата идентификованих као *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, одређује филогенетски статус и спектар потенцијалних биљних домаћина сакупљених изолата и испитује потенцијалне мере биолошке контроле фитопатогена коришћењем доказаних бактеријских биоконтролних агенаса из рода *Bacillus*.

У поглављу **УВОД**, кандидат је у оквиру пет потпоглавља детаљно представио еволуциону историју врсте *Pseudomonas syringae*, основне генетичке и епидемиолошке карактеристике, утицај ове бактеријске врсте као биљног патогена на различите пољопривредне усеве, као и значај ове врсте у функционисању природних феномена. Посебно су истакнуте карактеристике ове бактеријске врсте на основу којих има веома активну улогу у циклусу кружења воде у екосистему. Истакнута је веома изражена свеprisутност, адаптабилност и генетичка хетерогеност овог фитопатогена. Такође приказане су патогене карактеристике, услови за настанак болести и основни фактори вирулентности којима се одликује ова бактеријска врста, на основу којих *P. syringae* спада у најзначајније биљне патогене, са економског и научног аспекта. Истакнуте су и основне карактеристике, распрострањеност и епидемиологија патогеног варијетета *P. syringae* pv. *aptata*, узрочника болести лисне пегавости. Посебно је истакнут мањак истраживања овог патовара који представља надолазећег патогена са изузетно великим патогеним потенцијалом. Посебна пажња посвећена је биолошкој контроли биљних патогена, у мерама превенције болести биљака, као и замена за хемијске пестициде.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ** кандидат је поставио неколико циљева: да се изврши идентификација *P. syringae* pv. *aptata* изолата са заражених листова шећерне репе на територији АП Војводина; да се изолати молекуларно окарактеришу, утврди степен генетичког диверзитета и анализирају филогенетски односи између сакупљених изолата као и њихов филогенетски статус у оквиру *P. syringae* комплекса врсте; да се испитају патогене карактеристике *P. syringae* pv. *aptata* изолата коришћењем *in planta* тестова и да се одреди спектар потенцијалних биљних домаћина, и на крају да се испитају могућности примене биолошке контроле болести коју изазива *P. syringae* pv. *aptata* применом *Bacillus amyloliquefaciens* соја у *in planta* тестовима.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** организовано је у десет потпоглавља. Дат је детаљан опис узорковања заражених листова шећерне репе и приказ свих локалитета. Описана је изолација бактерија и утврђивање морфолошких и биохемијских особина уз приказ свих медијума и реагенса потребних за ове тестове. Детаљно је описана методологија молекуларне и конвекционалне идентификације *P. syringae* pv. *aptata* изолата. Детаљно су представљене методе за утврђивање генетичког профилисања, анализе парцијалних секвенци више генских локуса и интра-патоварског генетичког диверзитета. Описане су процедуре тестова за утврђивање филогенетског статуса *P. syringae* pv. *aptata* у оквиру *P. syringae* комплекса, и то Multiplex PCR и секвенцирање *cts* гена. Приликом филогенетских анализа кандидат је користио Neighbour-joining и UPGMA методу за конструисање дендограма. Дистанце између генетичких профила одређиване су преко Dice-овог коефицијента уз помоћ PyE1ph v. 1.4 софтверског пакета. Анализа парцијалних секвенци вршена је коришћењем софтверских пакета Chromas v. 2.5 и Finch TV v. 1.4.0, док су секвенце поравнате програмом Clustal W интегрисаним у софтверске пакете DAMBE и MEGA 6. Приказана је комплетна методологија тестова патогености и тестова за утврђивање спектра потенцијалних домаћина фитопатогених изолата. Детаљно је описана методологија испитивања биолошке контроле изолата *P. syringae* pv. *aptata* коришћењем *Bacillus amyloliquefaciens* соја у *in planta* тестовима. При статистичкој обради података кандидат је користио непараметријске статистичке

анализе за тестирање значајних разлика и корелација, зависно од дистрибуције података. Статистичке анализе рађене су у програмима Statistika 7.0. (StatSoft, Inc., 2001) и SPSS 20.0 (SAD).

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** организовано је у шест потпоглавља. У оквиру првог потпоглавља представљени су и јасно описани симптоми болести на листовима шећерне репе, на основу којих је и формирана претпоставка да је узрочник болести биљни патоген *P. syringae* pv. *aptata*. У другом поглављу приказани су резултати сета тестова на основу којих су идентификоване морфолошке и нутритивне карактеристике сакупљених изолата, односно, показано је да сви изолати имају округле кремaste колоније, да су Грам негативне штапићасте бактерије које имају способност хидролизе желатина и ескулина, продукују H_2S , имају оксидативни метаболизам разлагања глукозе, док флуоресценцију поседује укупно 51 изолат од 104 тестирана. У трећем поглављу приказани су резултати LOPAT тестова где је показано да сви тестирани изолати припадају Ia LOPAT групи. Заједно са осталим тестираним особинама то је идентификовало изолате као *P. syringae*. На основу умножавања високоспецифичног региона *gyrB* гена сви изолати су означени као *P. syringae* pv. *aptata*. У поглављу четири приказани су резултати одређивања генетичког диверзитета међу изолатима из формиране колекције. На основу генетичких дистанци анализираних умножавањем понављајућих палиндромских секвенци у геному тестираних изолата, утврђено је да се могу издвојити 25 различитих генетичких профила. Репрезентативни изолати свих 25 генетичких профила укључени су у даља истраживања генетичког диверзитета унутар патовара. Генетичким профилисањем читавог генома уз помоћ електрофорезе у пулсирајућем пољу издвојено је 17 различитих профила, док су филогенетском анализом тих профила издвојена 3 различита кластера. Анализом парцијалних секвенци 4 високо конзервирана гена, утврђено је да се на основу гена *gyrB* издвајају 4 алелске варијанте, а на основу *gapA* гена 3 алелске варијанте. Гени *rpoD* и *gltA* нису показали разлике између тестираних изолата. Анализом географске дистрибуције свих генетичких профила и алелских варијанти није утврђен изражени образац расподеле на територији АП Војводина, осим да се највећи диверзитет профила и алелских варијанти налази у централној и јужној Војводини. Утврђивањем филогенетског статуса *P. syringae* pv. *aptata* изолата у оквиру *Pseudomonas syringae* комплекса показано је да изолати из АП Војводина припадају филогенетској групи 26. У поглављу пет представљене су патогене карактеристике *P. syringae* pv. *aptata* и њихова корелација са утврђеним генетичким диверзитетом. На основу тестирања патогености 25 репрезентативних изолата на 4 сорте шећерне репе показано је да су сви вирулентни и да изазивају симптоме болести, које су уочене и на пољима шећерне репе. Међутим, уочена је разлика у агресивности тестираних изолата. Разлике у осетљивости сорти шећерне репе су биле очигледне, а сорта Лара је означена као најрезистентнија на тестираног патогена. Највећу агресивност (51-75% некрозе лисне плоче) након 14 дана од момента инокулације имало је 29% тестираних изолата. Интермедијарну агресивност (20-50%) је имало 15 за сорту Маринела, 10 за сорту Јасмина и 7 за сорту Серенада, док су преостали изолати показали најслабију агресивност (0-20%). На основу упоређивања резултата патогених карактеристика и генетичког диверзитета показано је да не постоји јасна корелација између генетичких профила и степена агресивности тестираних изолата. С друге стране, уочена је врло јасна корелација

између алелских варијанти *gyrB* гена и *gapA* гена са најагресивнијим *P. syringae* pv. *aptata* изолатима. Најагресивнији изолати на сортама Маринела, Јасмина и Серенада сврстани су у IV *gyrB* и III *gapA* алелску варијанту. Анализа опсега домаћина показала је да постоји велики диверзитет међу тестираним изолатима, те се на основу вируленције издвајају изолати који изазивају болест на свим тестираним домаћинима али и изолати који изазивају болест на само једном новом домаћину. На основу оцене агресивности показано је да се издвајају две групе изолата и то: група изузетно агресивних изолата (60% тестираних изолата) и група изолата коју карактерише веома слаба агресивност. Корелација између филогенетског статуса изолата и њиховог опсега домаћина показала је да филогрупа 2 садржи изолате који су највирулентнији, док су 12 изолата из тестиране колекције означени као изузетно вирулентни. У шестом поглављу приказани су резултати испитивања потенцијалне биолошке контроле патогена *P. syringae* pv. *aptata* у *in vivo* условима на биљкама шећерне репе. Резултати су показали да ћелијска култура соја *B. amyloliquefaciens* инхибира настанак некрозе биљног ткива и до 92% у односу на некрозу коју изазива сам патоген.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидат комплетно анализира добијене резултате и пореди их са подацима других аутора. Најпре се анализирају подаци који се тичу идентификације патогена, где се ставља акценат на валидност биохемијских и молекуларних метода у циљу идентификације *P. syringae* pv. *aptata*. Након тога кандидат дискутује о молекуларној карактеризацији и генетичком интра-патоварском диверзитету и пореди добијене податке са подацима аутора који су истраживали диверзитет других патовара у оквиру *P. syringae* комплекса. Акценат се ставља на значају оваквих истраживања у смислу одређивања клоналних линија инфекције, као и потенцијално различитих извора инфекције. Дискутује се о валидности и ефикасности метода које су се користиле за процену генетичког диверзитета тестираних изолата, при чему се ставља акценат на умножавању BOX генетичких елемената на основу којих је издвојено највише различитих генетичких профила. Такође, кандидат дискутује о великом дискриминаторном потенцијалу *gyrB* и *gapA* гена, који су се показали врло ефикасни приликом утврђивања диверзитета на субспецијском нивоу. Дискутује се и о патогеним карактеристикама *P. syringae* pv. *aptata* колекције, са нагласком на великом диверзитету вируленције и агресивности изолата, чиме се јасно указује на велике потенцијале овог патогена у смислу појаве епидемија болести коју узрокује на шећерној репи, као и о уоченим корелацијама између најагресивнијих изолата и издвојених алелских варијанти. Такође, дискутовано је о практичном значају одређивања степена осетљивости најчешће гајених сорти шећерне репе на територији АП Војводина који ће користити произвођачима. Дискутовало се о климатским условима погодним за развијање болести биљака узроковане бактеријским патогенима. Акценат је стављен на агрометеоролошке услове 2013. године у Републици Србији који су у великој мери погодовали настанку болести узроковане патогеном *P. syringae* pv. *aptata*, док је висока релативна влажност ваздуха издвојена као основни лимитирајући фактор за настанак болести лисне пегавости. Кандидат је дискутовао и о широком опсегу потенцијалних домаћина великог броја тестираних изолата из колекције, чији значај се огледа у превенцији настанка болести на културама које се користе у ротацији са основним домаћином патогена. На основу анализе података добијених након

тестирања биолошке контроле патогена, дискутовало се о могућностима потенцијалне одрживе контроле и превенције патогена *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидат сумира добијене резултате из докторске дисертације и на основу њих изводи закључке. На основу резултата морфолошких, биохемијских и молекуларних тестова идентификације закључено је да су сви изолати из сакупљене колекције идентификовани као *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. Коришћењем генетичког профилисања и генотипизације закључено је да постоји веома висок степен интра-патоварског генетичког диверзитета међу изолатима из сакупљене колекције. Такође је закључено да је највећа разноврсност генетичких профила и алеласких варијанти присутна у централном и јужном делу АП Војводина. Утврђивањем филогенетског статуса сакупљених изолата *P. syringae* pv. *aptata* закључено је да сви изолати припадају филогенетској групи 2б у оквиру *P. syringae* комплекса. Анализом резултата патогених карактеристика закључено је да постоји три групе изолата на основу њихове агресивности и да је сорта шећерне репе Лара најрезистентнија на овог патогена. Закључено је да постоји веома широк опсег потенцијалних домаћина *P. syringae* pv. *aptata*. На основу свих генетичких и патогених карактеристика изолата *P. syringae* pv. *aptata* претпостављено је да постоји најмање три различите линије инфекције комерцијалних засада шећерне репе. Анализом биоконтролног ефекта соја *B. amyloliquefaciens* против патогена *P. syringae* pv. *aptata* закључено је да постоје висока активност биоконтролног агенса, те да је могуће у одређеној мери вршити биолошку контролу поменутог патогена.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 155 библиографских јединица. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

У поглављу **ПРИЛОГ** приказани су подаци о свим до сада познатим врстама из рода *Pseudomonas*, као и свих 57 фамилија ефектор протеина који представљају најзначајнији фактор вирулентности код патогених сојева из поменутог рода бактерија. Табеларно су приказани резултати биохемијских тестова, као и резултати LOPAT тестова и умножавање ДНК региона специфичних за *P. syringae* pv. *aptata* за све изолате. Приказани су генетички профили свих 104 изолата на агарозним геловима добијени методом Rep-PCR, филогенетска стабла добијена поређењем свих профила, као и табеларни приказ свих издвојених група генетичких профила. Приказани су генетички профили свих 25 репрезентативних изолата који су добијени PFGE методом. Табеларно су приказане вредности свих читавања некрозе ткива изражене у процентима, средња вредност свих читавања и стандардна девијација у тестовима патогености након 7 и 14 дана од инокулације биљака. Приказане су вредности читавања некрозе ткива изражене у процентима, средња вредност и стандардна девијација након 7 дана од момента третирања у тестовима биолошке контроле патогена.

Истраживања у овој докторској дисертацији урађена су у оквиру националног пројекта ОИ 173026 - „Молекуларна карактеризација бактерија из родова *Bacillus* и *Pseudomonas* као потенцијалних агенаса за биолошку контролу”. Добијени резултати,

приказани у докторској дисертацији, као и они који ту нису укључени штампани су у 3 рада у истакнутим међународним часописима од чега 2 у категорији M21 и 1 у категорији M22, што потврђује актуелност и перспективу истраживања.

Радови и конгресна саопштења који чине део докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Nikolić, I.**, Stanković, S., Dimkić, I., Berić, T., Stojšin, V., Janse, J., Popović, T., 2018. Genetic diversity and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* isolated from sugar beet. *Plant Pathology*, 67(5), 1194-1207. **M21 (IF=2.303)**

Link: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.12831>

2. **Nikolić, I.**, Berić, T., Dimkić, I., Popović, T., Lozo, J., Fira, D., & Stanković, S. 2018. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains. *Journal of Applied Microbiology*. doi.org/10.1111/jam.14070 **M22 (IF=2.160)**

Link: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.14070>

3. Stojšin, V., Balaž, J., Budakov, D., Stanković, S., **Nikolić, I.**, Ivanović, Ž., Popović, T. 2015. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* causing bacterial leaf spot on sugar beet in Serbia. *Plant Disease*, 99(2), 281-281. **M21 (IF=2.941)**

Link: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-06-14-0628-PDN>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу

1. **Nikolić, I.**, Popović, T., Berić, T., Lozo, J., Dimkić, I., Fira, D., Stanković, S., 2017. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* strains from Serbia by using multi-locus sequence typing method. 7th FEMS Congress of European Microbiologists, Valencia, Spain, e-Abstracts Book, FEMS-0390.

2. Dimkić, I., Ristivojević, P., Berić, T., Janakiev, T., **Nikolić, I.**, Fira, Đ., Stanković, S., 2017. HPTLC chromatography as ideal tool for separation a mixture of *Bacillus* lipopeptide extracts in situ. 7th FEMS Congress of European Microbiologists, Valencia, Spain, e-Abstracts Book, FEMS-0292.

3. Dimkić, I., Vojnović, S., Pavić, A., Berić, T., **Nikolić, I.**, Stanković, S., Fira, Đ., 2016. The growth kinetics of phytopathogenic bacteria in the presence of lipopeptide extracts. 3rd International Symposium on Biological Control of Plant Bacterial Diseases, Belgrade, Serbia, e-Abstract book, 55.(11-13).

4. Dimkić, I., Berić, T., Stević, T., Šević, D., Ivanović, Ž., Živković, S., Gavrilović, V., **Nikolić, I.**, Janakiev, T., Lozo, J., Stanković, S., Fira, Dj., 2015. *Bacillus* spp. isolates – future in plant protection. III Simpozijum Biologa i Ekologa Republike Srpske (SBERS 2015), Banja Luka, Republika Srpska, Zbornik sažetaka, 43.

5. Dimkić, I., **Nikolić, I.**, Ivanović, Ž., Berić, T., Popović, T., Fira, D., Stanković, S., 2015. Protective effect of lipopeptide extracts from *Bacillus* sp. isolates on leaves of *Arabidopsis* and sugar beet infected with bacterial pathogen *in planta*. XVIII International Plant Protection Congress, Berlin, Germany, e-Abstracts Book, P N-CCO 45, 443.

6. **Nikolić, I.**, Kojić, M., Popović, T., Ivanović, Ž., Stojšin, V., Dimkić, I., Berić, T., Fira, D., Stanković, S., 2015. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Serbia determined by pulsed-field gel electrophoresis. XVIII International Plant Protection Congress, Berlin, Germany, e-Abstracts Book, P DMD 11, 580.

7. **Nikolić, I.**, Ivanović, Ž., Popović, T., Berić, T., Dimkić, I., Stanković, S., 2015. Determination of genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* by BOX PCR genomic fingerprinting. III Simpozijum Biologa i Ekologa Republike Srpske (SBERS 2015), Banja Luka, Republika Srpska, Zbornik sažetaka, 65.

8. Berić, T., Dimkić, I., Stević, T., **Nikolić, I.**, Janakiev, T., Fira, Dj., Stanković, S., 2015. *In vitro* examination of antagonistic activity and potential synergistic effects of *Bacillus* sp. lipopeptide extract and essential oils. 9th Balkan Congress of Microbiology, Thessaloniki, Greece, Abstract Book, Acta Microbiologica Hellenica, 60(3), 182, P55A

Б3. Конгресна саопштења на скуповима националног значаја штампана у изводу

1. **Nikolić, I.**, Berić, T., Dimkić, I., Popović, T., Lozo, J, Fira, Đ., Stanković, S., 2018. Genetički diverzitet patogenih izolata *Pseudomonas syringae* sa šećerne repe na teritoriji AP Vojvodina. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija. Knjiga sažetaka, 235.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Ивана Николића, под насловом “Идентификација, генетички диверзитет и биолошка контрола *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* са подручја Србије” представља свестрано и савремено урађену студију из области микробиолошке дијагностике, фитопатолошког мониторинга, молекуларне епидемиологије и биолошке контроле. Докторска теза написана је у складу са образложењем наведеним у пријави теме и садржи све релевантне елементе. По свом обиму, садржају, оригиналности резултата, начину њиховог представљања и интерпретацији, уз осврт на обимну и релевантну литературу, поднети текст има све одлике докторске дисертације. Кандидат је на примерен начин представио истраживачку област у којој је радио и резултате до којих је дошао.

Комисија сматра да докторска дисертација Ивана Николића по свом приступу и интерпретираним резултатима истиче важност мултидисциплинарног приступа у детекцији диверзитета биљних патогена и представља значајан допринос истраживањима биолошке контроле фитопатогена као замена за хемијске пестициде. Поред одговора на постављене непосредне циљеве истраживања, добијени резултати представљају основу за будућа истраживања у области молекуларне епидемиологије и екологије биљних патогена, као и њихове адекватне контроле.

Комисија са посебним задовољством истиче да је кандидат до сада, из резултата који представљају део докторске дисертације, публиковао три рада у истакнутим међународним часописима од чега два у категорији M21 и један у категорији M22. Такође, учествовао је са 10 саопштења на научним скуповима.

На основу свега изложеног, комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

Београд, 16.10.2018.год.

Комисија:

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

др Татјана Поповић, виши научни сарадник,
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд

др Ђорђе Фира, редовни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Тања Берић, ванредни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Јелена Лозо, ванредни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет