

**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**

Београд-Земун

Датум: 28.12.2023. године

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: *Извештај Комисије за оцену докторске дисертације кандидата Ирене Тодоровић, мастер инжењера технологије*

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду број 32/23-7.2. од 27.12.2023. године именована је Комисија за оцену урађене докторске дисертације под насловом „**Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum***” кандидаткиње Ирене Тодоровић, мастер инжењера технологије. На основу прегледа и анализе докторске дисертације, Комисија у саставу др Игор Кљујев, редовни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Вера Карличић, виши научни сарадник, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Смиља Теодоровић, редовни професор, Криминалистичко-полицијски Универзитет, Београд, др Лидија Ђокић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, др Alain Sarniguet, научни саветник, *INRAE - National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment, UMR 1345 Beaucozé – IRHS - Institute of Research in Horticulture and Seeds*, Француска, др Marie Simonin, научни сарадник, *INRAE - National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment, UMR 1345 Beaucozé – IRHS - Institute of Research in Horticulture and Seeds*, Француска, др Florence Hommais, редовни професор, Универзитет *Claude Bernard Lyon1*, Француска и др Daniel Muller, доцент, Универзитет *Claude Bernard Lyon1*, Француска, подноси Наставно-научном већу Пољопривредног факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

Основни подаци о кандидату. Ирена Тодоровић је рођена 27. априла 1995. године у Београду, Република Србија. Завршила је Земунску гимназију 2014. године. Исте године је уписала основне студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биологија, модул Екологија. Дипломирала је 17.09.2018. године са просечном оценом 9,09/10, стекавши звање Дипломирани биолог. Током основних студија била је координатор Конгреса студената биологије „Симпласт“ и заменик председника Студентског парламента, као и представник студената. Такође је била ангажована на стручним студентским праксама, као и на другим праксама из области неформалног образовања. Школске 2018/19. године уписана је на мастер студије на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, студијски програм Прехрамбена технологија, модул Микробиологија хране и животне средине. Мастер студије је завршила са просечном оценом 9,67/10, а мастер рад под називом „Могућности примене

инокулума *Bacillus megaterium* и метаболита *Aspergillus piperis* у биопрајмингу семена“ одбранила је 04.07.2019. године са оценом 10/10, стекавши звање мастер инжењер технологије. Школске 2019/2020. године, додељена јој је стипендија Владе Француске за удружене докторске студије на Универзитету *Claude Bernard Lyon1* (Докторска школа *Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation*) и Универзитету у Београду (Пољопривредни факултет, студијски програм Пољопривредне науке), као и стипендија Фонда за младе таленте Републике Србије за најбоље студенте који студирају у иностранству - „Доситеја”. Током докторских студија, положила је свих осам испита на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду са просечном оценом 9,25/10, а такође је успешно завршила две обуке на Универзитету *Claude Bernard Lyon1*. Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду (број 32/11-5.1., од 26.10.2022. године) и Већа научних области биотехничких наука Универзитета у Београду (број 61206- 4366/2-22, од 08.11.2022. године), одобрена јој је израда докторске дисертације под називом „Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*“. Др Јелена Јовичић-Петровић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, и др Daniel Muller, доцент Универзитета *Claude Bernard Lyon1*, Лион, Француска, одређени су за менторе. Ирена Тодоровић је до сада, као први аутор, објавила један научни рад из категорије M21a и један из категорије M22. Године 2021. учествовала је на конференцији „12th Eastern European Young Water Professionals Conference, Water Research and Innovations in Digital Era”, где је одржала усмену презентацију (категиорија M33), док је 2023. године учествовала на радионици „Trends in Microbial Solutions for Sustainable Agriculture”, где је своје истраживање представила у виду постер презентације (категиорија M34). Ирена Тодоровић говори, чита и пише енглески (ниво Ц2/Ц2) и француски (ниво Б2/Ц2) језик.

Основни подаци о дисертацији. Докторска дисертација Ирене Б. Тодоровић, мастер инжењера технологије, под називом „Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*“ писана је у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду, Упутством за докторску дисертацију на Универзитету *Claude Bernard Lyon1*, Међународним споразумом о заједничком менторству при изради докторске дисертације, потписаном 21. априла 2021. године, као и у складу са пријавом теме која је одобрена од стране Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и Већа научних области биотехничких наука Универзитета у Београду. Докторска дисертација садржи насловну страницу на енглеском, српском и француском језику, податке о менторима и члановима Комисије, опширне сажетке на енглеском, српском и француском језику, садржај и текст дисертације организован по поглављима. Дисертација садржи укупно 439 стране писаног текста, укључујући 35 слика, 29 табела и 562 цитирана литературна извора.

Докторска дисертација садржи осам основних поглавља: Увод (стр. 1-2), Преглед литературе (стр. 3-30), Циљеве истраживања (стр. 31), Материјал и методе (стр. 32-51), Резултате (стр. 52-125), Дискусију (стр. 126-139), Закључке (стр. 140-142) и Литературу (стр. 143-180). Наведена поглавља садрже више потпоглавља. На крају текста дисертације налазе се Прилози (стр. 181-434), Биографија (стр. 435), Изјава о ауторству (стр. 436), Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације (стр. 437) и Изјава о коришћењу (стр. 438-439).

2. Предмет и циљ дисертације

Врсте гљива из рода *Fusarium* су типични земљишни микроорганизми који спадају међунајразорније фитопатогене. Они производе широк спектар микотоксина, који могу бити

присутни у храни и прехранбеним производима. Биљни патоген *Fusarium graminearum*, који такође производи микотоксине, изазива значајне економске губитке приноса пшенице широм света, уз ограничене доступне методе контроле. Међутим, одређени микроорганизми у земљишту могу успешно да инхибирају фитопатогене, ометајући њихов развој и последично смањујући појаву инфекције биљака, што све доводи до дефинисања супресивних земљишта. Супресивност земљишта је у суштини појава посредована земљишним микроорганизмима, пошто процеси стерилизације претварају супресивно у несупресивно земљиште. Такође, агрономске праксе које поспешују микробну активност, нпр. употреба стајњака, могу повећати супресивност. У супресивним земљиштима, појава сузбијања болести се јавља упркос присуству биљке домаћина, фитопатогена и услова средине погодних за развој болести. Описана су два типа супресивности земљишта: општа (укључује целокупан микробиом земљишта који ограничава раст или развој патогена, и у случају патогених гљива се назива фунгистаза) и специфична (укључује једну или више специфичних микробних популација које ограничавају болест узроковану патогеном), за разлику од несупресивних (тј. кондуцивних) земљишта, где се болест редовно развија. Супресивна земљишта представљају резервоар обећавајућих биоконтролних агенаса који би могли да обезбеде ефикасну заштиту биљака од различитих земљишних фитопатогена. Овај потенцијал је од велике важности када су у питању фитопатогени као што је *F. graminearum*, који изазивају све већу штету усевама у контексту растућих климатских промена. Познато је да земљишта супресивна према болестима изазваним гљивом *Fusarium* постоје широм света и да су из тих земљишта изоловани биоконтролни агенси. Штавише, представници низа бактеријских родова врше функције које доводе до супресије болести изазваним гљивом *Fusarium*. На пример, познато је да врсте из родова *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Streptomyces* играју улогу у сузбијању болести изазваним гљивом *Fusarium* кроз различите механизме биоконтроле (тј. антагонизам, компетиција, паразитизам и индукција системске отпорности биљке). Поред тога, ове бактерије такође показују бројна својства која подстичу раст биљака, као што је солубилизација фосфата, производња индол-3-сирћетне киселине (ИАА) или производња 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АСС) деаминазе. Поред поменутих врста, познато је да врсте из рода *Pseudomonas* имају широк спектар корисних функција и играју важну улогу у ризосфери. На пример, различите врсте рода *Pseudomonas* могу модулисати раст биљака путем производње фитохормона и утицати на биорасположивост хранљивих материја, производњом АСС деаминазе, солубилизацијом фосфата, азотофиксацијом и денитрификацијом. Како би се открили различити начини деловања корисних бактерија, анализа генома је корисна јер не само да омогућава карактеризацију ових корисних функционалних особина, већ и идентификацију бактерија. Међутим, поред ових специфичних бактеријских група које утичу на развој патогена и болести, показало се да већи функционални и генетички диверзитет целе микробне заједнице у земљишту позитивно доприноси супресивности земљишта.

С обзиром на значај супресивних земљишта (која до сада нису документована у Србији) и патогена *F. graminearum*, општи циљ овог истраживања је био боље разумевање фунгистазе и феномена супресивних земљишта, као и процена корисности супресивних и фунгистатичних земљишта као извора биоконтролних бактерија. У том контексту, први циљ овог истраживања био је да се идентификују земљишта која су фунгистатична и супресивна према *F. graminearum* у Србији, да се испита повезаност употребе стајњака и појаве фунгистазе/супресивности, и да се упореди диверзитет гљива и прокариота у одабраним фунгистатичним и супресивним земљиштима. Други циљ је био да се процени потенцијал земљишта фунгистатичних према *F. graminearum* као извора биоконтролних агенаса. Ово је укључивало изолацију бактерија које припадају различитим таксономским категоријама, њихову карактеризацију на основу геномских и функционалних особина и процену њиховог потенцијала у заштити пшенице од *F.*

graminearum. Трећи циљ овог рада био је да се идентификују геномске и функционалне специфичности бактерија рода *Pseudomonas*, пореклом из супресивних и несупресивних земљишта.

3. Основне хипотезе од којих се полазило у истраживању

Општа хипотеза овог истраживања је била да се супресивна земљишта могу наћи широм света, и да је већа вероватноћа да ће земљишта у која је претходно додат стајњак испољавати фунгистазу и супресивност. Ова општа хипотеза је подељена на три специфичне хипотезе: Прва хипотеза је била да се земљишта супресивна према болестима изазваним гљивом *Fusarium*, која су документована широм света, могу идентификовати изучавањем земљишта која немају пуно проблема са болестима изазваним овом гљивом (на основу запажања пољопривредника) или која су била подвргнута додавању органске материје у циљу повећања микробне разноврсности. Друга хипотеза је била да супресивност земљишта настаје као резултат деловања биотичких фактора, и да фунгистатична (и супресивна) земљишта представљају резервоар обећавајућих биоконтролних агенаса против земљишног патогена *F. graminearum*. Трећа хипотеза је била да геномска и функционална анализа флуоресцентних *Pseudomonas*, пореклом из супресивних и несупресивних земљишта, може бити корисна за проучавање механизма супресивности.

Током овог истраживања су први пут у Србији идентификована земљишта фунгистатична и супресивна према *F. graminearum*. Прва хипотеза није потврђена, јер супресивни и фунгистатични статус земљишта није настао као последица додавања стајњака у свим испитиваним земљиштима. Друга хипотеза је потврђена, јер су фунгистатична и супресивна земљишта служила као извор обећавајућих биоконтролних агенаса, међутим, неки обећавајући сојеви су такође документовани и у нефунгистатичним и несупресивним земљиштима. Трећа хипотеза није потврђена, с обзиром да су сојеви рода *Pseudomonas*, пореклом из супресивних и несупресивних земљишта, показали сличан биоконтролни капацитет.

4. Кратак опис садржаја дисертације

Увод. У овом поглављу је истакнут значај биолошке контроле и супресивних земљишта, са акцентом на бактеријске родове који доприносе сузбијању болести узрокованим гљивом *Fusarium*.

Преглед литературе. Ово поглавље садржи пет потпоглавља, и представља синтезу тренутних сазнања о супресивним земљиштима и биоконтролним агенсима против гљива из рода *Fusarium*. У првом потпоглављу, ***Супресивност земљишта***, представљена су актуелна сазнања о супресивности земљишта, као и типови супресивних земљишта и значај ризосферних бактерија у супресивности земљишта. У другом потпоглављу, ***Значај патогене гљиве Fusarium и земљишта супресивних према болестима изазваним гљивом Fusarium***, фокус је стављен на главне доступне методе контроле, појаву земљишта супресивних према болестима изазваним гљивом *Fusarium*, утицај пољопривредних пракси на земљишта супресивна према гљиви *Fusarium*, и на крају, према *F. graminearum*. Ово потпоглавље, у адаптираном облику, је објављено у виду прегледног рада, у часопису *Frontiers in Plant Science*, категорије M21a (Todorović et al., 2023a). У трећем потпоглављу, ***Биоконтролни агенси против гљиве Fusarium и њихови механизми деловања***, описане су врсте бактерија и гљива за које се зна да делују антагонистички против гљиве *Fusarium*, заједно са њиховим механизмима деловања. У четвртном потпоглављу, ***Механизми деловања корисних бактерија које стимулишу раст биљака***, описани су механизми деловања прокариота који доприносе расту и развоју биљака. Коначно, у

петом потпоглављу, **Значај рода *Pseudomonas* у биолошкој контроли и стимулисању раста биљака**, описани су механизми деловања врста рода *Pseudomonas* који доприносе заштити биљака.

Циљеви истраживања. Циљеви овог истраживања били су: 1) да се идентификују земљишта која су фунгистатична и супресивна према болестима изазваним гљивом *F. graminearum* у Србији, да се испита однос употребе стајњака и појаве фунгистазе/супресивности и да се упореде изабрана фунгистатична и супресивна земљишта на основу ризосферног диверзитета заједнице гљива и прокариота; 2) да се процени потенцијал земљишта фунгистатичних према *F. graminearum* као извора биоконтролних агенаса, што је подразумевало изоловање бактерија различитих таксономских категорија, њихову карактеризацију на основу геномских и функционалних особина и процену њиховог капацитета заштите пшенице од *F. graminearum*; 3) да се идентификују геномске и функционалне специфичности бактерија рода *Pseudomonas*, пореклом из супресивних и несупресивних земљишта, вођено чињеницом да врсте рода *Pseudomonas* могу допринети заштити биљака од болести изазваним гљивом *Fusarium* и играти улогу у земљиштима супресивним према овим болестима, и поред тога што су биоконтролни *Pseudomonas* такође документовани и у несупресивним земљиштима.

Материјал и методе. У овом поглављу, коришћени материјали и методе описани су у 12 потпоглавља. У првом потпоглављу, **Узорковање земљишта**, дат је опис узорковања 26 поља са пет локација у северној и западно/централној Србији (тј. локације у близини Сомбора (SO), Нових Карловаца (НК), Ваљева (VA), Мионице (MI) и Чачка (CA)), при чему је у нека поља у протеклом периоду додаван стајњак, док у друга није. У другом потпоглављу, **Фунгистаза земљишта према *Fusarium graminearum***, описан је сој гљиве *Fusarium* који је коришћен током овог истраживања, заједно са припремом инокулума ове гљиве и изолацијом ДНК. Након тога, објашњени су кораци у процени фунгистазе земљишта, укључујући стерилизацију земљишта, инокулацију, инкубацију, изолацију ДНК и примену квантитативног PCR (qPCR) са прајмерима специфичним за *F. graminearum*, који су коришћени за квантификацију количине *F. graminearum* Fg1 ДНК како у аутоклавираним, тако и у неаутоклавираним земљиштима. У трећем потпоглављу, **In planta тест супресивности**, описано је припремање суспензије спора *F. graminearum*, као и поставка теста супресивности. У четвртном потпоглављу, **Анализа ризосферног диверзитета прокариота и гљива путем метабаркодиранија**, описано је одвајање ризосфера пшенице из претходног теста супресивности, заједно са изоловањем ризосферне ДНК, 16S rRNA и ITS секвенцирањем и обрадом података. Пето потпоглавље, **Формирање колекције аутохтоних биоконтролних бактерија**, обухватало је опис припреме ризосферног екстракта, изолације бактерија на различитим селективним и неселективним подлогама, тест конфронтације са *F. graminearum*, као и идентификације бактерија. Шесто потпоглавље, **Анализа диверзитета ризосферних *Pseudomonas* путем метабаркодиранија**, описује неколико корака укључујући изолацију ризосферне ДНК, секвенцирање *groD* гена, коришћењем *groD* прајмера из Manriquez (2021) по први пут, и обраду података. У седмом потпоглављу, **Формирање колекције *Pseudomonas***, описана је изолација и идентификација изолата *Pseudomonas*. У осмом потпоглављу, **Секвенцирање и анотација генома одабраних биоконтролних и *Pseudomonas* изолата**, описане су изолација ДНК, секвенцирање генома, асемблинг и анотација. Девето потпоглавље, **Карактеризација својстава стимулације биљног раста биоконтролних и *Pseudomonas* изолата**, укључује неколико поднаслова који описују поступке који се користе за процену капацитета бактеријских изолата да производе сидерофоре, цијановодоник, литичке ензиме, фитохормоне, АЦЦ деаминазу, да солубилизују фосфате, да производе испарљива органска једињења (VOC) која инхибирају раст *F. graminearum* или да производе ексудате који инхибирају клијање спора гљиве. Десето потпоглавље, **In planta оглед са одабраним биоконтролним и *Pseudomonas* изолатима**, описује оглед постављен са циљем

процене капацитета бактеријских сојева да заштите пшеницу од болести трулежи стабла изазване гљивом *F. graminearum*. Једанаесто потпоглавље, **Методe које се користе за идентификацију нових врста**, састоји се од филогенетских анализа, као и морфолошке, биохемијске и физиолошке карактеризације новоописаних врста. Коначно, дванаесто потпоглавље, **Статистичка анализа**, објашњава статистичке методе које су коришћене за анализу варијансе и упоређивање средњих вредности добијених података, употребом R 4.2.1. софтвера (<https://www.r-project.org>).

Резултати. Резултати овог истраживања су јасно представљени кроз седам потпоглавља, са више поднаслова, са одговарајућим јасним и сажетим текстуалним тумачењима, табелама и сликама које илуструју резултате истраживања. У првом потпоглављу, **Теренско истраживање**, представљене су локације на којима су узоркована земљишта, укључујући и резултате упитника које су попунили пољопривредници. У другом потпоглављу, **Фунгистаза земљишта према *Fusarium graminearum***, представљено је 10 фунгистатичних земљишта пронађених у Србији, од којих је седам претходно третирано стајњаком, а њихова распрострањеност је била ограничена на западне и централне делове земље. На локацијама у близини Мионице (земљишта MI2, MI3, MI4 и MI5), стајњак је идентификован као значајан фактор који подстиче фунгистазу. Земљишта MI2 и MI3, третирана стајњаком, су била фунгистатична, док земљишта MI4 и MI5, нетретирана стајњаком, нису била фунгистатична. Слична запажања су уочена и код земљишта узоркованим у близини Чачка. Међутим, додавање стајњака у земљиште код Сомбора, Нових Карловаца и Ваљева није подстакло фунгистазу. У трећем потпоглављу, **Супресивност земљишта из Мионице према појави полагања пшенице изазваном гљивом *Fusarium graminearum***, четири земљишта из Мионице су изабрана за *in planta* тест супресивности, при чему је показано да су земљишта MI2, MI3 и MI5 супресивна, док земљиште MI4 није супресивно. Подаци добијени након спроведеног теста фунгистазе и супресивности омогућили су дефинисање три категорије земљишта: (i) земљишта MI2 и MI3 су била фунгистатична и супресивна, (ii) земљиште MI4 није било фунгистатично ни супресивно, док (iii) земљиште MI5 није било фунгистатично, али је било супресивно. У четвртном потпоглављу, **Диверзитет ризосферне заједнице прокариота и гљива у земљиштима из Мионице**, представљени су резултати метабаркодирања три категорије земљишта, који су показали да разлика у алфа диверзитету прокариота није била значајна, док гљиве у земљишту MI5 (нефунгистатично, супресивно) показују ниже *Shannon* и *Pielou* индексе. Поред тога, структура микробне заједнице је углавном зависила од поља из ког је заједница узоркована, са скромним, али значајним, ефектом инокулације. Пето потпоглавље, **Таксономски састав ризосферне заједнице у земљиштима из Мионице**, показује да ризосфере пшенице пореклом из три категорије земљишта имају исте главне прокариотске филуме и већину најзаступљенијих таксона, иако је неколико таксона било специфично за свако земљиште. Поред тога, инокулација земљишта са *F. graminearum* је утицала на микробну заједницу ризосфере, али често са ефектима специфичним за свако земљиште. Што се тиче заједнице гљива, у три категорије земљишта су пронађени представници филума *Ascomycota*, *Basidiomycota* и *Mortierellomycota*, док су таксони из реда *Chytridiomycota* пронађени само у земљиштима MI4 и MI5. Инокулација земљишта са *F. graminearum* је утицала на ризосферну заједницу гљива. У шестом потпоглављу, **Фунгистатично земљиште као извор ризосферних бактерија са биоконтролним својствима према *Fusarium graminearum***, описана је изолација 244 бактерије из фунгистатичних и нефунгистатичних земљишта и *in vitro* тест конфронтације са *F. graminearum*, што је довело до идентификације 23 изолата са потенцијалном биоконтролном активношћу према овом патогену. Међу ова 23 изолата, 10 је изоловано из фунгистатичних, а 13 из нефунгистатичних земљишта. Секвенцирањем генома откривено је да из фунгистатичних земљиштима три соја припадају роду *Pseudomonas*, један роду *Kosakonia*,

четири соја роду *Bacillus* и два роду *Priestia*. У нефунгистатичним земљиштима, седам сојева припадало је роду *Pseudomonas*, два соја роду *Burkholderia*, два соја роду *Bacillus*, један роду *Brevibacillus* и један роду *Chryseobacterium*. Секвенцирање целог генома је такође открило осам нових геномских врста. Анотација генома, заједно са функционалним тестовима, открила је да сојеви из фунгистатичних и нефунгистатичних земљишта поседују гене и функције укључене у биоконтролу и стимулацију раста биљака. Распрострањеност ових корисних особина била је одређена таксономском припадношћу сојева. Такође је примећено да само VOC произведени од стране сојева изолованих из нефунгистатичног земљишта инхибирају раст мицелије *F. graminearum*, док ексудати сојева из фунгистатичног и из нефунгистатичног земљишта имају способност да инхибирају клијање конидија гљиве. Коначно, седам сојева одабраних на основу резултата теста конфронтације, способности бактеријских сојева да инхибирају раст мицелије гљиве путем производње VOC или способности бактеријских ексудата да инхибирају клијање конидија гљиве, коришћено је у огледу у стакленику; биосинтетички генски кластери пронађени у њиховим геномима су ручно анотирани. Резултати су показали да је само један сој, односно *Pseudomonas GS-5 IT194MI4* (из нефунгистатичног земљишта) побољшао клијање пшенице и пружио заштиту од болести трулежи стабла, али на рачун биомасе изданака и садржаја хлорофила. Свих седам сојева садржало је биосинтетичке генске кластере који кодирају производњу сидерофора и антибиотика. У седмом потпоглављу, ***Аутохтони Pseudomonas у земљиштима супресивним према болестима изазваним гљивом Fusarium graminearum***, метабаркодирање земљишта у близини Мионице, коришћењем *rpoD* гена групе *P. fluorescens*, је указало да се заједница *Pseudomonas* разликује између различитих земљишта. Укупно 406 потенцијалних представника рода *Pseudomonas*, добијених из свих осам експерименталних услова (четири земљишта инокулисана или неинокулисана са *F. graminearum*), окарактерисано је на основу *rpoD* (или *rrs*) гена. Карактеризација *rpoD* гена је успела са 185 изолата, дајући 65 различитих секвенци *rpoD*. Укупно 29 *Pseudomonas* из сва четири MI земљишта и експерименталних услова (инокулисано или неинокулисано са *F. graminearum*) је подвргнуто секвенцирању целог генома, чиме је потврђена њихова припадност роду *Pseudomonas* и откривено је 16 нових геномских врста. Две од ових нових геномских врста (свака са по два соја из различитих земљишта) су формално описане и за њих су предложена имена *P. serbica* и *P. serbooccidentalis*. Анотација генома и функционална карактеризација 29 *Pseudomonas* открила је да су њихови корисни гени и функције равномерно распоређени међу сојевима, без обзира на експерименталне услове (поље порекла, инокулација са *F. graminearum*, супресивни статус земљишта и претходна примена стајњака). Сојеви *Pseudomonas* из сва четири MI земљишта су имали способност да инхибирају развој мицелије *F. graminearum*, кроз производњу VOC, док су само сојеви из MI5 земљишта (нефунгистатично и супресивно) имали способност да инхибирају клијање конидија гљиве. Ниједан од изолата *Pseudomonas* није допринео заштити пшенице од *F. graminearum*. Ручна анотација генома ових 29 *Pseudomonas* открила је равномерну дистрибуцију биосинтетичких генских кластера потенцијално укључених у биоконтролу.

Дискусија. Резултати су дискутовани у четири потпоглавља. У првом потпоглављу, ***Фунгистаза и земљишта супресивна према болестима изазваним гљивом Fusarium***, резултати добијени током овог истраживања упоређени су са подацима из литературе. Објашњења је фунгистаза која је документована у одређеним земљиштима у која је додат стајњак, а такође су предложена објашњења за земљишта која нису испољавала фунгистазу. Поред тога, разматран је супресивни карактер земљишта из Мионице, као и диверзитет и таксономски састав прокариота и гљива у овим земљиштима. У другом потпоглављу, ***Фунгистатична земљишта као извор бактерија са биоконтролним својствима против Fusarium graminearum***, објашњена је корисност конфронтацијског теста као првог корака у селекцији биоконтролних агенаса. Гени, чији су производи укључени у биоконтролу и

поспешивање раста биљака и који су пронађени у аутохтоним бактеријским сојевима из овог истраживања, разматрани су и упоређени са подацима из литературе. Такође је објашњено зашто неки сојеви дају добре резултате у *in vitro* условима, али не и у експериментима са биљком и у пољу, наглашавајући сложеност интеракција између биљака и микроорганизама. У трећем потпоглављу, ***Pseudomonas* у супресивним и несупресивним земљиштима**, разматран је значај рода *Pseudomonas* у супресивним земљиштима. Метабаркодинг анализа рода *Pseudomonas*, пореклом из супресивних и несупресивних земљишта, упоређена је са другим доступним подацима из литературе. Геномски и функционални потенцијал врста рода *Pseudomonas*, пореклом из супресивних и несупресивних земљишта, је упоређен и истакнуто је да су њихови капацитети слични и зависе од таксономске врсте, као и да супресивни статус земљишта може бити последица релативне бројности одређених врста рода *Pseudomonas* у супресивним земљиштима или резултат различите експресије гена укључених у биоконтролу, у поређењу са несупресивним земљиштима. Овде су описане геномске и функционалне карактеристике две нове врсте, *P. serbica* и *P. serboccidentalis*, а ови резултати су објављени у часопису *Systematic and Applied Microbiology*, категорије M22 (Todorović et al., 2023b). Врсте рода *Pseudomonas* које су тестиране у огледу са биљком, али при чему ниједан сој није заштитио пшеницу од *F. graminearum*, разматране су и упоређене са подацима из литературе. У четвртном потпоглављу, ***Секундарни метаболити у супресивности земљишта према Fusarium graminearum***, биосинтетички генски кластери, пронађени у геномима биоконтролних сојева и *Pseudomonas*, објашњени су као важни и као потенцијално укључени у супресију болести. Поред тога, објашњено је да се ови метаболити можда уопште не синтетишу, и описани су кораци потребни да би се показао њихов утицај на супресију болести.

Закључак. Закључци су правилно изведени и произилазе из добијених резултата. Земљишта која су фунгистатична и супресивна према *F. graminearum* су први пут идентификована у Србији, а стајњак се показао као значајан фактор који подстиче фунгистазу на пољима у околини Мионице, али не и на другим локацијама. Друго, показано је да фунгистатична земљишта такође могу бити супресивна, као и да супресивна и несупресивна земљишта садрже исте главне филуме прокариота и гљива, као и већину најзаступљенијих таксона, при чему је неколико таксона специфично за свако испитивано земљиште. Треће, показало се да и фунгистатична и нефунгистатична земљишта могу бити извор бактерија са антагонистичким својствима према *F. graminearum*, као и да је секвенцирање целог генома користан приступ за стицање увида у биоконтролни потенцијал и таксономски статус антагонистичких сојева. Четврто, описане су две нове врсте *Pseudomonas*, односно *P. serbica* и *P. serboccidentalis*. Такође, показано је да врсте рода *Pseudomonas*, пореклом из супресивних и несупресивних земљишта, могу испољавати сличан биоконтролни капацитет. У закључку, подаци добијени током овог истраживања могу послужити као основа за даља истраживања земљишта супресивних према болестима изазваним гљивом *F. graminearum*, и као основа за проучавање микробиома ризосфере, а то све је резултирало колекцијом темељно окарактерисаних бактеријских сојева са значајним апликативним потенцијалом.

Литература. У дисертацији су наведена 562 литературна извора. Референце су цитиране на исправан начин, актуелне су и релевантне за проучавани проблем.

Прилози. Прилози садрже резултате овог истраживања представљене у виду пет потпоглавља која одговарају пет научних радова, а садрже и општи закључак. Од тога, два научна рада, која одговарају потпоглављима 1 и 4А, објављена су у часописима *Systematic and Applied Microbiology* и *Frontiers in Plant Science* 2023. године; један научни рад, који одговара потпоглављу 2, предат је за објављивање у часопис *Applied Soil Ecology* у септембру 2023. године; преостала два научна рада, која одговарају потпоглављима 3 и 4Б, биће прослеђена часописима до краја 2023. године.

5. Остварени резултати и научни допринос дисертације

Током овог истраживања, први пут су у Србији документована земљишта фунгистатична и супресивна према болестима пшенице изазваним гљивом *F. graminearum*. Такође, по први пут су проучавани феномени фунгистазе и супресивности на истим пољима, а добијени подаци могу послужити као основа за даља истраживања земљишта супресивних према болестима изазваним гљивом *F. graminearum* и као основа за проучавање микробиома ризосфере, тако надограђујући истраживања која су већ спроведена на земљиштима супресивним према болестима изазваним гљивом *Fusarium* у другим деловима света, у различитим климатским условима и са различитим примењеним пољопривредним праксама. Такође, током овог истраживања, показано је да и фунгистатична и нефунгистатична земљишта садрже бактеријске сојеве са биоконтролним капацитетом, као и да врсте рода *Pseudomonas*, пореклом из супресивних и несупресивних земљишта, показују исти потенцијал за супресију патогена.

Поред тога, изузетно важан резултат овог истраживања је формирање колекције темељно окарактерисаних бактеријских сојева који имају велики потенцијал за употребу у одрживој биљној производњи. Такође, две нове врсте, *Pseudomonas serbica* и *Pseudomonas serboccidentalis*, у потпуности су окарактерисане и валидно објављене, у складу са смерницама Међународног кодекса номенклатуре прокариота. Коначно, истраживање као што је ово представља мали, али веома значајан корак ка смањењу губитака приноса и економских губитака, као и у заштити здравља људи и животиња, које је угрожено микотоксинима произведеним од стране гљиве *Fusarium*.

6. Објављени и саопштени резултати

Todorović, I., Moëgne-Loccoz, Y., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J., & Muller, D. (2023a). Microbial diversity in soils suppressive to *Fusarium* diseases. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1228749. doi: 10.3389/fpls.2023.1228749

Todorović, I., Abrouk, D., Kyselková, M., Lavire, C., Rey, M., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J., Moëgne-Loccoz, Y., & Muller, D. (2023b). Two novel species isolated from wheat rhizospheres in Serbia: *Pseudomonas serbica* sp. nov. and *Pseudomonas serboccidentalis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 46(4), 126425. doi: 10.1016/j.syapm.2023.126425

Todorović, I., Moëgne-Loccoz, Y., Raičević, V., Muller, D., & Jovičić-Petrović, J. (2023c). In I. Dimkić, & V. Venturi (Eds.), Abstracts from the Workshop “Trends in Microbial Solutions for Sustainable Agriculture” (p. 70). University of Belgrade. ISBN: 978-86-7078-178-8

7. Закључак и предлог комисије

Докторска дисертација Ирене Тодоровић под називом „Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*“ представља оригиналан научни рад и савремену студију из области микробиологије животне средине. Спроведено истраживање је у потпуности у складу са планом који је одобрен у предлогу дисертације. На основу систематски прегледаних података из литературе, кандидаткиња је јасно дефинисала циљеве истраживања. Кандидаткиња је успешно обавила експериментални део истраживања, применом адекватне и савремене методологије, а добијени резултати су анализирани, детаљно презентовани и упоређени са резултатима других аутора. Дисертација је адекватно организована и форматирана, а из добијених резултата логично произилазе закључци.

Имајући у виду све изнето, а нарочито остварене резултате и њихов оригиналан научни и практични значај, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Ирене Тодоровић под називом „Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидаткињи да јавно брани докторску дисертацију.

Београд-Земун
Дана 28.12.2023. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Игор Кљујев, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у
Београду
(Ужа научна област: Еколошка
микробиологија)

др Alain Sarniguet, научни саветник
*INRAE - French National Research Institute for
Agriculture, Food and the Environment, UMR
1345 Beaucozé, Institute of Research in
Horticulture and Seeds*
(Ужа научна област: Фитопатологија)

др Вера Карличић, виши научни сарадник
Пољопривредни факултет, Универзитет у
Београду
(Ужа научна област: Еколошка
микробиологија)

др Marie Simonin, истраживач сарадник
*INRAE - National Research Institute for
Agriculture, Food and the Environment, UMR
1345 Beaucozé, Institute of Research in
Horticulture and Seeds*
(Ужа научна област: Еколошка
микробиологија)

др Смиља Теодоровић, редовни професор
Криминалистичко-полицијски универзитет
(Ужа научна област: Биологија и генетика)

др Florence Hommais, редовни професор
Универзитет *Claude Bernard Lyon1*,
UMR 5240 – MAP
(Ужа научна област: Бактеријска геномика и
генетика)

др Лидија Ђокић, виши научни сарадник
Институт за молекуларну генетику и
генетичко инжењерство, Универзитет у
Београду
(Ужа научна област: Молекуларна
биологија)

др Daniel Muller, доцент
Универзитет *Claude Bernard Lyon1*,
UMR 5557 – Ecologie microbienne
(Ужа научна област: Еколошка
микробиологија)

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
Датум: 15.12.2023.

Предмет: Изјава о оригиналности докторске дисертације „Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*”, аутора Ирене Тодоровић

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и Извештаја из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације: „**Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum***”, аутора Ирене Тодоровић, константујемо да утврђено подударање износи 19%. Овај степен подударности последица је личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, цитата, а у највећој мери претходно публикованих резултата истраживања докторанда, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. овог Правилника.

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

Београд, 15.12.2023. године

Ментори:
др Јелена Јовичић-Петровић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет

др Daniel Muller, доцент
Универзитет *Claude Bernard Lyon1, UMR 5557 - Ecologie
microbienne*, Француска

**FACULTY OF AGRICULTURE
UNIVERSITY OF BELGRADE**

Belgrade-Zemun

Date: December 28, 2023

TO THE TEACHING AND SCIENTIFIC COUNCIL OF THE FACULTY

Subject: *A report by the Committee for evaluation of the doctoral dissertation of candidate Irena Todorović, M.Eng.*

By the decision of the Teaching and Scientific Council of the Faculty of Agriculture, University of Belgrade, number 32/23-7.2. from December 27th, 2023, a Committee was appointed to evaluate the doctoral dissertation entitled “**Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum***” by candidate Irena Todorović, M.Eng. Based on the review and analysis of the doctoral dissertation, the Committee consisting of Dr Igor Kljujev, full professor, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Dr Vera Karličić, senior research associate, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Dr Smilja Teodorović, full professor, University of Criminal Investigation and Police Studies, Dr Lidija Đokić, senior research associate, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Dr Alain Sarniguet, principal research fellow, French National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment, Institute of Research in Horticulture and Seeds, Dr Marie Simonin, research associate, French National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment, Institute of Research in Horticulture and Seeds, Dr Florence Hommais, full professor, University Claude Bernard Lyon1, and Dr Daniel Muller, assistant professor, University Claude Bernard Lyon1, submits to the Teaching and Scientific Council of the Faculty of Agriculture the following

REPORT

1. General information about the candidate and doctoral dissertation

General information about the candidate. Irena Todorović was born on April 27th, 1995 in Belgrade, Republic of Serbia. She graduated from Zemun High School in 2014. The same year she enrolled in the undergraduate studies at the Faculty of Biology, University of Belgrade, study program Biology, module Ecology. She graduated on September 17th, 2018, with a grade point average 9.09/10, earning the title Graduated biologist. During her undergraduate studies, she was the Coordinator of the Student Congress “Simplast” and Deputy President of the Student Parliament, as well as students’ representative. She was also engaged in vocational student practices, as well as in various other informal education practices. During the 2018/19 school year, she was enrolled in the Master’s Program at the Faculty of Agriculture, University of Belgrade, study program Food Technology, module Food and Environmental Microbiology. She completed the program with a grade point average 9.67/10 and defended a master thesis entitled “Possibilities for the application of *Bacillus megaterium* inoculum and *Aspergillus piperis* metabolites in seed biopriming” on July 4th, 2019 with grade 10/10, earning the title Master engineer of technology. During the year 2019/2020, she was granted a French Government Scholarship for a joint PhD program at the University Claude Bernard Lyon1 (Doctoral school Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation) and University of Belgrade (Faculty of Agriculture, study program Agricultural sciences), as well as

“Dositeja” Scholarship from the Foundation for Young Talents in the Republic of Serbia for the best students studying abroad. During her PhD studies, she completed all eight exams at the Faculty of Agriculture, University of Belgrade, with a grade point average 9.25/10, as well as two trainings at the University Claude Bernard Lyon1 with success. By the decision of the Teaching and Scientific Council of the Faculty of Agriculture, University of Belgrade (number 32/11-5.1., from October 26th, 2022) and the Council of Scientific Fields of Biotechnical Sciences of the University of Belgrade (number 61206-4366/2-22, from November 8th, 2022), her PhD project proposal was accepted and she obtained an approval to conduct a doctoral dissertation, entitled “Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum*”. Jelena Jovičić-Petrović, Ph.D., associate professor at the Faculty of Agriculture, University of Belgrade, and Daniel Muller, Ph.D., assistant professor at University Claude Bernard Lyon1, Lyon, France, were appointed as PhD supervisors. Thus far, as a first author, Irena Todorović published one scientific article from the category M21a and one from the category M22. In 2021, she participated at the 12th Eastern European Young Water Professionals Conference, Water Research and Innovations in Digital Era, where she gave an oral presentation (category M33), while in 2023, she participated at the workshop “Trends in Microbial Solutions for Sustainable Agriculture”, where she presented her research in the form of a poster presentation (category M34). Irena Todorović speaks, reads and writes English (C2/C2 level) and French (B2/C2 level) languages.

General information about the doctoral dissertation. Doctoral dissertation submitted by Irena B. Todorović, M.Eng, entitled “Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum*”, was written in accordance with the Guidelines for the formatting of a doctoral dissertation at the University of Belgrade, Guidelines for doctoral dissertation at the University Claude Bernard Lyon1, Agreement for the implementation of the joint supervision of a PhD thesis, signed on April 21, 2021, as well as in accordance with the thesis proposal approved by the Teaching and Scientific Council of the Faculty of Agriculture, University of Belgrade and the Council of Scientific Fields of Biotechnical Sciences of the University of Belgrade. The doctoral dissertation contains titles pages in English, Serbian and French, information about supervisors and Committee members, extensive abstracts in English, Serbian and French, table of contents and the main text organized in chapters. The dissertation contains a total of 439 pages of written text, including 35 figures, 29 tables, and 562 cited literature sources.

The doctoral dissertation contains eight basic chapters: Introduction (p. 1-2), Bibliographical synthesis (p. 3-30), Research objectives (p. 31), Material and methods (p. 32-51), Results (p. 52-125), Discussion (p. 126-139), Conclusions (p. 140-142) and References (p. 143-180). The above chapters contain several sections. At the end of the dissertation text, there are Supplementary Material (p. 181-434), Biography (p. 435), Declaration of authorship (p. 436), Declaration of commonality of the printed and electronic versions of the doctoral dissertation (p. 437) and Declaration of use (p. 438-439).

2. The subject and objectives of the doctoral dissertation

Species from the fungal genus *Fusarium* are typical soil microorganisms which are among the most destructive phytopathogens. They produce a wide variety of mycotoxins, which may be present in feed and food products. The mycotoxinogenic pathogen *Fusarium graminearum* causes significant economic losses in wheat crops throughout the world, with limited efficient control methods available. However, certain soil microorganisms may successfully inhibit phytopathogens, thus impeding their development and consequently reducing subsequent plant infection, all of which leads to defining soils that are suppressive to disease. Soil suppressiveness is essentially a phenomenon mediated by soil microorganisms, since sterilization processes turn suppressive soils into

non-suppressive. Additionally, agronomic practices that increase microbial activity, such as the use of organic amendments, may enhance suppressiveness. In suppressive soils, disease suppression occurs despite the presence of the host plant, phytopathogen and environmental conditions favorable for the disease development. Two types of soil suppressiveness have been described: general (involving the entire soil microbiota that restrict pathogen(s) growth or development, and in the case of affected fungal propagules, referred to as fungistasis) and specific (involving one or several specific microbial populations that restrict pathogen-caused disease), contrary to non-suppressive (conducive) soils, where disease regularly develops. Suppressive soils represent a reservoir of promising biocontrol agents which could provide effective plant protection against various soil-borne phytopathogens. This potential is of great importance when considering phytopathogens like *F. graminearum*, which have been causing an increasing damage to crops in the on-going climate change context. It is known that soils suppressive to Fusarium diseases affecting various crops exist worldwide, and that there are biocontrol agents isolated from such suppressive soils. Furthermore, representatives of a range of bacterial groups carry out functions that lead to the suppression of *Fusarium*-caused diseases. For example, species from the genera *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Streptomyces* are well known to play a role in the suppression of *Fusarium*-caused diseases through various biocontrol mechanisms (i.e., antagonism, competition, parasitism and the induction of systemic resistance in plants). In addition, these bacteria also exhibit a number of plant-growth promoting properties, such as phosphorus solubilization, indole-3-acetic acid (IAA) production or 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase production, therefore facilitating plant growth. Apart from the aforementioned species, it is known that species from the genus *Pseudomonas* have a wide range of phytobeneficial functions and play an important role in the rhizosphere. Moreover, *Pseudomonas* species may modulate plant growth through phytohormones production, and alter the bioavailability of nutrients, by producing ACC deaminase, solubilizing phosphates, fixing nitrogen and denitrifying. In order to reveal these different modes of action of phytobeneficial bacteria, genome analysis represents a useful approach because not only does it allow characterization of these beneficial functional traits, but also bacterial identification. However, beyond these specific bacterial groups that affect pathogen and disease development, it has been shown that higher functional and genetic diversity of the whole microbial community in soil positively contributes to soil suppressiveness.

Given the importance of suppressive soils (that have not previously been identified in Serbia) and the emerging pathogen *F. graminearum*, the general objective of this project was to gain a better understanding of fungistasis and suppressiveness phenomena, and to assess usefulness of suppressive and fungistatic soils as sources of bacteria with biocontrol potential. In this context, the first objective of this research was to identify soils that are fungistatic and suppressive to *F. graminearum* in Serbia, investigate the relationship between manure amendments and the occurrence of fungistasis/suppressiveness, and compare chosen fungistatic and suppressive soils based on their fungal and prokaryotic rhizosphere diversity. The second objective was to assess the potential of soils fungistatic to *F. graminearum* as sources of biocontrol agents. This involved isolation of bacteria of contrasted taxonomy, their characterization based on genomic and functional traits, and assessment of their wheat phytoprotective capacity against *F. graminearum*. The third objective of this work was to identify the genomic and functional particularities of *Pseudomonas* bacteria in suppressive and non-suppressive soils.

3. Hypotheses

The general hypothesis of this project was that suppressive soils may be found worldwide and that soils with manure amendments are more likely to display fungistasis and even disease suppressiveness. This general hypothesis was subdivided into three specific hypotheses: The first

hypothesis was that *Fusarium*-suppressive soils, which occur widely, can be identified by screening of soils with limited disease problems (based on farmers' observations) or soils that have undergone organic matter-based management, aiming to enhance microbial diversity. The second hypothesis was that soil suppressiveness is driven by biotic factors, and that fungistatic (and suppressive) soils represent a reservoir of promising antagonists against a soil-borne pathogen *F. graminearum*. The third hypothesis was that genomic and functional analysis of fluorescent *Pseudomonas* isolates from suppressive and non-suppressive soils can be useful for exploring soil suppressiveness mechanisms.

In this work, soils fungistatic and suppressive to *F. graminearum* have been identified for the first time in Serbia. The first hypothesis has not been confirmed, as suppressive and fungistatic status of soils did not correlate with the addition of manure amendments in all investigated soils. The second hypothesis was confirmed, as fungistatic and suppressive soils served as a source of promising biocontrol agents, however, some promising strains have also been documented in non-fungistatic and non-suppressive soils. The third hypothesis has been rejected, as *Pseudomonas* strains from both suppressive and non-suppressive soils displayed similar biocontrol capacities.

4. Brief description of the dissertation content

Introduction. In this chapter, the importance of biological control and suppressive soils has been outlined, focusing on bacterial genera that contribute to the suppression of *Fusarium*-caused diseases.

Bibliographical synthesis. This chapter consists of five sections and presents a summary of the current knowledge on suppressive soils and biocontrol agents against *Fusarium*. In the first section, ***Soil suppressiveness***, current knowledge on soil suppressiveness has been presented, together with types of soil suppressiveness, and the importance of rhizosphere bacteria in soil suppressiveness. In the second section, ***Significance of pathogenic Fusarium and soils suppressive to Fusarium diseases***, focus was placed on the main control methods available, occurrence of soils suppressive to *Fusarium* diseases, effects of farming practices on soils suppressive to *Fusarium* diseases, and finally, on *F. graminearum*. A modified form of this section has been published as a review paper in an M21a journal *Frontiers in Plant Science* (Todorović et al. 2023a). In the third section, ***Biocontrol agents against Fusarium and their modes of action***, bacterial and fungal strains known to act against *Fusarium*, together with their modes of action, have been reviewed. In the fourth section, ***Plant-growth promoting modes of action of beneficial bacteria***, all the prokaryotic mechanisms contributing to plant fitness have been described. Finally, in the fifth section, ***The importance of Pseudomonas in biological control and plant-growth promotion***, a review of *Pseudomonas* modes of action that contribute to phytoprotection, has been outlined.

Objectives. Objectives of this research were: 1) to identify soils that are fungistatic and suppressive to *F. graminearum* in Serbia, investigate the relationship between manure amendments and the occurrence of fungistasis/suppressiveness, and compare chosen fungistatic and suppressive soils based on their fungal and prokaryotic rhizosphere diversity; 2) to assess the potential of soils fungistatic to *F. graminearum* as sources of biocontrol agents, which involved the isolation of bacteria of contrasted taxonomy, their characterization based on genomic and functional traits, and assessment of their wheat phytoprotective capacity against *F. graminearum*; 3) to identify the genomic and functional particularities of *Pseudomonas* bacteria in suppressive vs. non-suppressive soils, motivated by the fact that *Pseudomonas* may contribute to plant protection against *Fusarium* diseases and play a role in soil suppressiveness to these diseases, although biocontrol *Pseudomonas* have also been documented in non-suppressive soils.

Material and methods. In this chapter, material and methods used have been described in 12 sections. In the first section, ***Soil sampling***, there is a description of sampling of the 26 fields from

five locations in northern and western/central Serbia (i.e., locations near Sombor (SO), Novi Karlovci (NK), Valjevo (VA), Mionica (MI) and Čačak (CA)), with contrasting manure application histories for each location. In the second section, ***Soil fungistasis to Fusarium graminearum***, *Fusarium* strain used throughout this research has been described, together with the preparation of fungal inoculum and DNA extraction. Finally, several steps for evaluating soil fungistasis have been explained, including soil sterilization, inoculation, incubation, DNA extraction and a quantitative PCR (qPCR) approach with *F. graminearum*-specific primers, used to quantify the amount of *F. graminearum* Fg1 DNA present in both sterilized and non-sterilized soils. In the third section, ***In planta suppressiveness assay***, preparation of *F. graminearum* spore suspension, as well as the set-up of the suppressiveness assay have been described. In the fourth section, ***Analysis of prokaryotic and fungal rhizosphere diversity through metabarcoding approach***, separation of rhizospheres of wheat plants from the suppressiveness assay has been described, together with the isolation of the rhizosphere DNA, 16S rRNA and ITS sequencing and data processing. The fifth section, ***Formation of indigenous biocontrol bacterial collection***, included description of preparation of the rhizosphere extract, isolation of bacteria on different selective and non-selective media, a confrontation test with *F. graminearum*, as well as bacterial identification. The sixth section, ***Analysis of rhizosphere Pseudomonas diversity through metabarcoding approach***, describes several steps including isolation of rhizosphere DNA, sequencing of the *rpoD* gene, using the *rpoD* primers from Manriquez (2021) for the first time, and data processing. In the seventh section, ***Formation of Pseudomonas collection***, isolation and identification of *Pseudomonas* isolates have been described. In the eighth chapter, ***Genome sequencing and genome annotation of selected biocontrol and Pseudomonas isolates***, DNA extraction, genome sequencing, assembling and annotation have been described. The ninth section, ***Plant growth promoting (PGP) characterization of biocontrol and Pseudomonas isolates***, includes several parts that describe procedures used to assess the capacity of bacterial isolates to produce siderophores, hydrogen cyanide, lytic enzymes, phytohormones, ACC deaminase, to solubilize phosphates, to produce VOCs that inhibit *F. graminearum* growth or to produce exudates that inhibit fungal spore germination. The tenth section, ***In planta protection assay with chosen biocontrol and Pseudomonas isolates***, describes steps followed to assess capacity of bacterial strains to protect wheat from crown-rot disease caused by *F. graminearum*. The eleventh section, ***Methods used for identifying novel species***, consists of phylogenetic analyses, as well as morphological, biochemical and physiological characterization of newly described species. Finally, the twelfth section, ***Statistical analyses***, explains statistical methods used to analyze variance and compare means of the obtained data, all performed using the R 4.2.1. software (<https://www.r-project.org>).

Results. The results of this research are presented clearly through seven sections, each with several subtitles, with appropriate clear and concise textual interpretations, tables and figures that illustrate the results of the research. In the first section, ***Field survey***, soil locations, including the results of farmers' questionnaire, have been presented. In the second section, ***Soil fungistasis to Fusarium graminearum***, 10 fungistatic soils found in Serbia were presented, seven of which had previously received manure, and their distribution was restricted to the western/central parts of the country. At locations near Mionica (soils MI2, MI3, MI4 and MI5), manure was identified as a significant factor promoting fungistasis. Soils MI2 and MI3, which had received manure, exhibited fungistasis, while soils MI4 and MI5 which were non-manured, did not show fungistasis. A similar trend was observed in the case of soils sampled near Čačak. However, the addition of manure amendments in soils near Sombor, Novi Karlovci and Valjevo was not associated with fungistasis. In the third section, ***Suppressiveness of soils from Mionica against Fusarium graminearum-induced wheat damping-off***, the four soils from Mionica were chosen for an *in planta* suppressiveness assay, revealing that soils MI2, MI3 and MI5 were suppressive, while soil MI4 was non-suppressive. Fungistasis and suppressiveness assay data enabled defining three soil categories: (i) soils MI2 and

MI3 were fungistatic and suppressive, (ii) soil MI4 was non-fungistatic and non-suppressive, while (iii) soil MI5 was non-fungistatic but suppressive. In the fourth section, ***Diversity of the prokaryotic and fungal rhizospheric communities in soils from Mionica***, metabarcoding data analysis of the three soil categories was presented, indicating that most of the differences in the prokaryotic alpha diversity were not significant, whereas fungi in soil MI5 (non-fungistatic, suppressive) displayed lower Shannon and Pielou indices. In addition, microbial community structure depended mostly on the field of origin, with a modest, but significant, effect of inoculation. Fifth section, ***Taxonomic rhizosphere community composition in soils from Mionica***, revealed that the wheat rhizosphere of the three soils shared the main prokaryotic phyla and the majority of the most abundant taxa, although several taxa were soil-specific. Additionally, soil inoculation with *F. graminearum* impacted the rhizosphere microbial community, but often with soil-specific effects. As for the fungal community, the three soils harbored representatives from the phyla *Ascomycota*, *Basidiomycota*, and *Mortierellomycota*, while taxa from the order *Chytridiomycota* were found only in soils MI4 and MI5. For the fungal community, soil inoculation with *F. graminearum* impacted the rhizosphere community. In the sixth section, ***Fungistatic soils as a source of rhizosphere bacteria with biocontrol properties against Fusarium graminearum***, the isolation of 244 bacteria from fungistatic and non-fungistatic soils and an *in vitro* confrontation assay with *F. graminearum* were described, which led to the identification of 23 isolates with potential biocontrol activity against this fungal pathogen. Among these 23 isolates, 10 originated from fungistatic and 13 from non-fungistatic soils. Whole-genome sequencing revealed that, in the fungistatic soils, three strains belonged to the genus *Pseudomonas*, one to the genus *Kosakonia*, four strains to the genus *Bacillus* and two to the genus *Priestia*. In the non-fungistatic soils, seven strains belonged to the genus *Pseudomonas*, two strains to the genus *Burkholderia*, two strains to the genus *Bacillus*, one to the genus *Brevibacillus*, and one to the genus *Chryseobacterium*. Whole-genome sequencing also revealed eight novel genomospecies. Genome annotation, together with functional assays, revealed that isolates from both fungistatic and non-fungistatic soils possessed genes and functions involved in biocontrol or plant-growth promotion. The distribution of these phyto-beneficial traits was largely taxa-specific. It was also observed that only VOCs produced by strains from non-fungistatic soils inhibited mycelial growth of *F. graminearum*, while exudates from isolates from both fungistatic and non-fungistatic soils had the ability to inhibit fungal conidia germination. Finally, seven strains selected based on the results of the confrontation assay, the ability of strains to inhibit fungal mycelial growth through the production of VOCs or the ability of bacterial exudates to inhibit fungal conidia germination, were used in a greenhouse phytoprotection plant assay; the biosynthetic gene clusters found in their genomes were manually curated. Results indicated that only one strain, namely *Pseudomonas* GS-5 IT194MI4 (from non-fungistatic soil) enhanced wheat germination and provided protection from crown-rot disease. However, this came at the expense of shoot biomass and chlorophyll rate. All seven strains displayed BGCs coding for siderophores and antibiotics. In the seventh section, ***Indigenous Pseudomonas in soils suppressive to Fusarium graminearum***, metabarcoding analysis of the soils near Mionica, targeting the *rpoD* gene of the *P. fluorescens* group, was presented and indicated that *Pseudomonas* subcommunity differed between different soils. A total of 406 putative *Pseudomonas* obtained from all eight conditions (four soils that have or have not been inoculated with *F. graminearum*) were characterized based on the *rpoD* (or *rrs*) gene. Characterization of the *rpoD* gene succeeded with 185 isolates, yielding 65 different *rpoD* sequences. Altogether 29 *Pseudomonas* from all four MI soils and conditions (inoculated or non-inoculated with *F. graminearum*) were subjected to whole-genome sequencing, thus confirming their affiliation to the *Pseudomonas* genus and revealing 16 novel genomospecies. Two of these novel genomospecies (each with two strains from different soils) were formally described and the names *P. serbica* and *P. serboccidentalis* were proposed for them. Genome annotation and functional characterization of the 29 *Pseudomonas* revealed that their phyto-beneficial

genes and functions are spread evenly among strains, regardless of the experimental conditions (field of origin, inoculation with *F. graminearum*, suppressiveness status and previous manure application). *Pseudomonas* strains from all four MI soils had the ability to inhibit *F. graminearum* mycelia development through the production of VOCs, while only strains from MI5 soil (non-fungistatic and suppressive) had the ability to inhibit fungal conidia germination. None of the *Pseudomonas* isolates conferred wheat protection from *F. graminearum*. Manual curation of BGCs found in genomes of these 29 *Pseudomonas* revealed even distribution of biosynthetic gene clusters potentially involved in biocontrol.

Discussion. The results have been discussed in four sections. In the first section, *Fungistasis and soil suppressiveness to Fusarium graminearum diseases*, results obtained during this research have been compared to the literature data. Fungistasis documented in certain manured soils has been explained and explanations have been proposed for soils that did not display fungistasis. Furthermore, suppressive character of some soils from Mionica has also been discussed, together with prokaryotic and fungal diversity and composition in these soils. In the second section, *Fungistatic soils as a source of bacteria with biocontrol properties against Fusarium graminearum*, usefulness of the confrontation assay as a first screening procedure has been explained. Genes whose products are involved in biocontrol and plant-growth promotion, found in the indigenous bacterial strains from this study, have been discussed and compared to the literature data. Furthermore, it has been explained why some strains perform well in *in vitro* conditions, but fail in *in planta* and field experiments, outlining the complexity of interactions between plant and microorganisms. In the third section, *Pseudomonas in suppressive vs. non-suppressive soils*, the importance of *Pseudomonas* in suppressive soils was discussed. Metabarcoding analysis of *Pseudomonas* populations in suppressive vs. non-suppressive soils was compared with other available data from the literature. Genomic and functional potential of *Pseudomonas* in suppressive vs. non-suppressive soils has been compared and it was outlined that their capacities are similar, and species-dependent, and that suppressive soil status might be a result of the relative abundance of *Pseudomonas* in suppressive soils or different expression of biocontrol genes, when compared to non-suppressive soils. Here, the genomic and functional characteristics of two novel species, *P. serbica* and *P. serboccidentalis*, have been described and these results published in an M22 journal *Systematic and Applied Microbiology* (Todorović et al. 2023b). *Pseudomonas* that have been tested in an *in planta* assay, but which did not protect wheat plant from *F. graminearum*, have been discussed and compared to the data from the literature. In the fourth section, *Secondary metabolites in soil suppressiveness to Fusarium graminearum*, the presence of Biosynthetic gene clusters found in the genomes of biocontrol and *Pseudomonas* strains have been explained as important, and as possible contributors to disease suppression. Furthermore, it was explained that these metabolites may not be excreted at all, and steps needed in order to verify their involvement in disease suppression have been described.

Conclusions. The conclusions are correctly drawn and derive from the obtained results. Soils fungistatic and suppressive to *F. graminearum* disease have been identified for the first time in Serbia, and manure was shown to be a significant factor promoting fungistasis in fields near Mionica, but not at other locations. Secondly, it was also demonstrated that fungistatic soils may also be suppressive, and that suppressive and non-suppressive soils shared the main prokaryotic and fungal phyla, as well as the majority of the most abundant taxa, yet several taxa were soil-specific. Thirdly, it was shown that both fungistatic and non-fungistatic soils may be a source of bacteria with antagonistic properties against *F. graminearum* and that whole-genome sequencing is a useful approach to gaining insight into the biocontrol potential and taxonomic status of antagonistic strains. Fourthly, two novel *Pseudomonas* species were described, i.e., *P. serbica* and *P. serboccidentalis*. Furthermore, it was also shown that *Pseudomonas* species in both suppressive and non-suppressive soils might display similar biocontrol functions. In conclusion, the data obtained during this research may serve as a foundation

for further research on soils suppressive to *F. graminearum* diseases and a basis for rhizosphere microbiome studies, resulting in a collection of thoroughly characterized bacterial strains with significant applicative potential.

References. The dissertation lists 562 literature sources. References are cited in the correct manner, they are current and relevant for the studied problem.

Supplementary material. Supplementary material consists of research results presented in the form of five chapters that correspond to five scientific publications and a general conclusion. Out of these, two publications, corresponding to chapters 1 and 4A, have been published in *Systematic and Applied Microbiology* and *Frontiers in Plant Science* in 2023; one publication, corresponding to chapter 2, has been submitted for publication to the *Applied Soil Ecology* in September, 2023; the remaining two publications, corresponding to chapters 3 and 4B, will be submitted to journals by the end of 2023.

5. Results and scientific contribution

During this research, soils fungistatic and suppressive to *F. graminearum* disease of wheat have been documented in Serbia for the first time. Also, for the first time, both soil fungistasis and suppressiveness were studied for the same fields, and the data obtained may serve as a foundation for further research on soils suppressive to *F. graminearum* diseases and a base for rhizosphere microbiome studies, adding up to the research already conducted on soils suppressive to *Fusarium* diseases in other parts of the world, in different climatic conditions and with different agricultural practices. Moreover, during the course of this dissertation, it has been shown that both fungistatic and non-fungistatic soils harbor bacterial strains with biocontrol capacities and that *Pseudomonas* from both suppressive and non-suppressive soils exhibit the same potential for pathogen suppression.

Furthermore, an immensely important result of this research is the formation of a collection of profoundly characterized bacterial strains that have a vast potential to be used in sustainable agriculture. Additionally, two novel species, *Pseudomonas serbica* and *Pseudomonas serboccidentalis*, were fully characterized and validly published, following the guidelines provided by the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Finally, research such as this one represents a small, but very significant, step towards decreased crop and economical losses, as well as the protection of human and animal health compromised by *Fusarium* mycotoxins.

6. Publications

Todorović, I., Moëgne-Loccoz, Y., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J., & Muller, D. (2023a). Microbial diversity in soils suppressive to *Fusarium* diseases. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1228749. doi: 10.3389/fpls.2023.1228749

Todorović, I., Abrouk, D., Kyselková, M., Lavire, C., Rey, M., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J., Moëgne-Loccoz, Y., & Muller, D. (2023b). Two novel species isolated from wheat rhizospheres in Serbia: *Pseudomonas serbica* sp. nov. and *Pseudomonas serboccidentalis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *46*(4), 126425. doi: 10.1016/j.syapm.2023.126425

Todorović, I., Moëgne-Loccoz, Y., Raičević, V., Muller, D., & Jovičić-Petrović, J. (2023c). In I. Dimkić, & V. Venturi (Eds.), Abstracts from the Workshop “Trends in Microbial Solutions for Sustainable Agriculture” (p. 70). University of Belgrade. ISBN: 978-86-7078-178-8

7. Conclusion and Committee's proposal

Irena Todorović's doctoral dissertation, entitled "**Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum***", represents an original scientific paper and a contemporary study in the environmental microbiology scientific field. Conducted research is completely in accordance with the plan that was approved in the dissertation proposal. Based on the systematically reviewed literature data, the candidate clearly defined the objectives of the research. The candidate successfully completed experimental research by applying adequate and modern methodology, and the obtained results were analyzed, thoroughly presented and found to correlate with the findings of other authors. The dissertation is adequately organized and formatted, and the conclusions logically arise from the obtained results.

Taking into account the abovementioned, and particularly obtained results and their scientific and applicative contribution, the Committee positively evaluates Irena Todorović's doctoral dissertation, entitled "**Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum***", and suggests to The Teaching and Scientific Council of the Faculty of Agriculture, University of Belgrade to accept this positive evaluation and enable public defense of the dissertation.

Belgrade, December 28, 2023

COMMITTEE MEMBERS

Dr Igor Kljujev, full professor
Faculty of Agriculture, University of Belgrade
(Scientific field: Environmental microbiology)

Dr Alain Sarniguet, principal research fellow
French National Research Institute for
Agriculture, Food and the Environment, UMR
1345 Beaucouzé, Institute of Research in
Horticulture and Seeds, France
(Scientific field: Phytopathology)

Dr Vera Karličić, senior research associate
Faculty of Agriculture, University of Belgrade
(Scientific field: Environmental microbiology)

Dr Marie Simonin, research associate
INRAE - National Research Institute for
Agriculture, Food and the Environment, UMR
1345 Beaucouzé, Institute of Research in
Horticulture and Seeds, France
(Scientific field: Environmental microbiology)

Dr Smilja Teodorović, full professor
University of Criminal Investigation and Police
Studies
(Scientific field: Biology and genetics)

Dr Florence Hommais, full professor
University Claude Bernard Lyon 1,
UMR 5240 – MAP, France
(Scientific field: Bacterial genomics and genetics)

Dr Lidija Đokić, senior research associate
Institute of Molecular Genetics and Genetic
Engineering, University of Belgrade
(Scientific field: Molecular biology)

Dr Daniel Muller, assistant professor
University Claude Bernard Lyon1,
UMR 5557 – Ecologie microbienne, France
(Scientific field: Environmental microbiology)

**TEACHING AND SCIENTIFIC COUNCIL
FACULTY OF AGRICULTURE
UNIVERSITY OF BELGRADE**

Date: December 15, 2023

SUBJECT: Statement on the originality of the doctoral dissertation “Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum*” by the author Irena Todorović

Based on the Rulebook on the procedure for checking the originality of doctoral dissertations defended at the University of Belgrade as well as the report of the iThenticate software, used for checking the originality of doctoral dissertation: “**Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum***” by the author Irena Todorović, we state that the determined overlap in the text is 19%. The degree of compatibility is a result of personal names, the bibliographical data on the used literature, the so-called general places, citations, and mostly result of previously published research results of the PhD student, which arose from the dissertation, which is in accordance with the Rulebook Article No.9.

Based on above stated, and in accordance with the Article No. 8, paragraph 2 of the Rulebook on the procedure for verification of the originality of doctoral dissertations defended at the University of Belgrade, we declare that the report indicates the originality of the doctoral dissertation, and the required procedure of preparation for its defense can continue.

Belgrade, December 15, 2023

Supervisors:

dr Jelena Jovičić-Petrović, associate professor
University of Belgrade – Faculty of Agriculture

dr Daniel Muller, assistant professor
University Claude Bernard 1,
UMR 5557 – Ecologie microbienne, France

**FACULTÉ D'AGRICULTURE
UNIVERSITÉ DE BELGRADE**

Belgrade-Zemun

Date: 28 décembre 2023

AU CONSEIL PÉDAGOGIQUE ET SCIENTIFIQUE DE LA FACULTÉ

Objet: *Un rapport du Comité d'évaluation de la thèse de doctorat de la candidate Irena Todorović, Master ingénieur de technologie*

Par décision du Conseil pédagogique et scientifique de la Faculté d'agriculture de l'Université de Belgrade, numéro 32/23-7.2. du 27 décembre 2023, un Comité a été nommé pour évaluer la thèse de doctorat intitulée **“Populations bactériennes indigènes dans la résistance du sol contre *Fusarium graminearum*”** de la candidate Irena Todorović, Master ingénieur de technologie. Sur la base de l'examen et de l'analyse de la thèse de doctorat, le comité composé du Igor Kljujev, Ph. D., professeur, Faculté d'agriculture, Université de Belgrade, Vera Karličić, Ph. D., professeure associée, Faculté d'agriculture, Université de Belgrade, Smilja Teodorović, Ph. D., professeure, Université d'investigation criminelle et d'études policières, Belgrade, Lidija Đokić, Ph. D., professeure, Institut de génétique moléculaire et de génie génétique, Université de Belgrade, Alain Sarniguet, Ph. D., directeur de recherche, INRAE - Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, UMR 1345 Beaucozézé – IRHS - Institut de Recherche en Horticulture et Semences, Marie Simonin, Ph. D., chargée de recherche, INRAE - Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, UMR 1345 Beaucozézé – IRHS - Institut de Recherche en Horticulture et Semences, Florence Hommais, Ph. D., professeure, Université Claude Bernard Lyon1, et Daniel Muller, Ph. D., maître de conférences, Université Claude Bernard Lyon1, soumet au Conseil pédagogique et scientifique de la Faculté d'agriculture ce qui suit

RAPPORT

1. Informations générales sur le candidat et la thèse de doctorat

Informations générales sur le candidat. Irena Todorović est née le 27 avril 1995 à Belgrade, en République de Serbie. Elle est diplômée du lycée de Zemun en 2014. La même année, elle s'est inscrite en licence à la Faculté de biologie de l'Université de Belgrade, programme d'études Biologie, module Écologie. Elle a obtenu son diplôme le 17 septembre 2018, avec une moyenne générale de 9,09/10, obtenant le titre de biologiste diplômée. Au cours de ses études de premier cycle, elle a été coordonnatrice du congrès étudiant “Simplast” et vice-présidente du Parlement étudiant, ainsi que représentante des étudiants. Elle a également été engagée dans des pratiques d'étudiants en formation professionnelle, ainsi que dans diverses autres pratiques d'éducation informelle. Au cours de l'année scolaire 2018/19, elle a été inscrite au programme de maîtrise de la Faculté d'agriculture de l'Université de Belgrade, programme d'études Technologie alimentaire,

module Microbiologie alimentaire et environnementale. Elle a terminé le programme avec une moyenne générale de 9,67/10 et a soutenu un mémoire de maîtrise intitulé “Possibilities for the application of *Bacillus megaterium* inoculum and *Aspergillus piperis* metabolites in seed biopriming” le 4 juillet 2019 avec la note de 10/10, obtenant le titre de Master ingénieur de technologie. Au cours de l'année 2019/2020, elle a obtenu une bourse du gouvernement français pour un programme doctoral co-tutelle à l'Université Claude Bernard Lyon1 (École doctorale Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation) et à l'Université de Belgrade (Faculté d'Agriculture, programme d'études Sciences agronomiques), ainsi que la bourse “Dositeja” de la Fondation pour les jeunes talents de la République de Serbie pour les meilleurs étudiants étudiant à l'étranger. Au cours de ses études de doctorat, elle a réussi les huit examens de la Faculté d'Agriculture de l'Université de Belgrade, avec une moyenne générale de 9,25/10, ainsi que deux formations à l'Université Claude Bernard Lyon1 avec succès. Par décision du Conseil pédagogique et scientifique de la Faculté d'agriculture de l'Université de Belgrade (numéro 32/11-5.1., du 26 octobre 2022) et du Conseil des domaines scientifiques des sciences biotechniques de l'Université de Belgrade (numéro 61206-4366/2-22, du 8 novembre 2022), sa proposition de projet de doctorat a été acceptée et elle a obtenu l'approbation pour mener une thèse de doctorat intitulée “Populations bactériennes indigènes dans la résistance du sol contre *Fusarium graminearum*”. Jelena Jovičić-Petrović, Ph. D., professeure associée à la Faculté d'agriculture de l'Université de Belgrade, et Daniel Muller, Ph. D., maître de conférences à l'Université Claude Bernard Lyon1, France, ont été nommés directeurs de thèse. Jusqu'à présent, en tant que premier auteur, Irena Todorović a publié un article scientifique de la catégorie M21a et un autre de la catégorie M22. En 2021, elle a participé à la “12th Eastern European Young Water Professionals Conference, Water Research and Innovations in Digital Era”, où elle a fait une présentation orale (catégorie M33), tandis qu'en 2023, elle a participé à la séminaire “Trends in Microbial Solutions for Sustainable Agriculture”, où elle a présenté ses recherches sous forme de poster (catégorie M34). Irena Todorović parle, lit et écrit l'anglais (niveau C2/C2) et le français (niveau B2/C2).

Informations générales sur la thèse de doctorat. La thèse de doctorat soumise par Irena B. Todorović, Master ingénieur de technologie, intitulée “Populations bactériennes indigènes dans la résistance du sol contre *Fusarium graminearum*”, a été rédigée conformément aux règles pour le formatage d'une thèse de doctorat à l'Université de Belgrade, règles pour la thèse de doctorat à l'Université Claude Bernard Lyon1, Convention pour la mise en œuvre de la co-tutelle d'une thèse de doctorat, signée le 21 avril 2021, ainsi que conformément au projet de thèse approuvé par le Conseil pédagogique et scientifique de la Faculté d'agriculture, Université de Belgrade et le Conseil des domaines scientifiques des sciences biotechniques de l'Université de Belgrade. La thèse de doctorat comporte une page de titres en anglais, serbe et français, des informations sur les directeurs de thèse et les membres du comité, des résumés détaillés en anglais, serbe et français, une table des matières, ainsi que le texte principal organisé en chapitres. Au total, la thèse compte 439 pages de texte écrit, incluant 35 figures, 29 tableaux et la citation de 562 sources littéraires

La thèse de doctorat contient huit chapitres fondamentaux : Introduction (p. 1-2), Synthèse bibliographique (p. 3-30), Objectifs de recherche (p. 31), Matériel et méthodes (p. 32-51), Résultats (p. 52-125), Discussion (p. 126-139), Conclusions (p. 140-142) et Références (p. 143-180). Les chapitres ci-dessus contiennent plusieurs sections. À la fin du texte de la thèse, il y a du matériel supplémentaire (p. 181-434), une biographie (p. 435), une déclaration de paternité (p. 436), une déclaration de caractère commun des versions imprimées et électroniques de la thèse de doctorat (p. 437) et Déclaration d'utilisation (p. 438-439).

2. Le sujet et les objectifs de la thèse de doctorat

Les espèces du genre *Fusarium*, des microorganismes fongiques courants dans les sols, comptent parmi les phytopathogènes les plus destructeurs. Ils produisent une grande variété de mycotoxines, pouvant se retrouver dans les aliments pour animaux et les produits alimentaires. Le pathogène mycotoxigène *Fusarium graminearum* engendre d'importantes pertes économiques dans les cultures de blé à travers le monde, avec des méthodes de contrôle efficaces limitées. Cependant, certains microorganismes du sol peuvent réussir à inhiber les phytopathogènes, entravant ainsi leur développement et réduisant les infections ultérieures des plantes. Cela conduit à définir des sols résistants aux maladies. La résistance des sols est essentiellement un phénomène médié par les microorganismes du sol, puisque la stérilisation transforme les sols résistants en sols sensibles. Les pratiques agricoles qui augmentent l'activité microbienne, comme l'amendements organiques, peuvent renforcer le pouvoir résistant du sol. Dans les sols résistants, la maladie est supprimée malgré la présence de la plante hôte, du phytopathogène et des conditions environnementales favorables au développement de la maladie. On distingue deux types de résistance des sols : la résistance générale, qui implique l'ensemble du microbiote du sol limitant la croissance ou le développement d'agents pathogènes (comme dans le cas de la fongistase, où les propagules fongiques sont affectées), et la résistance spécifique, qui implique une ou plusieurs populations microbiennes spécifiques limitant les maladies causées par des agents pathogènes. À la différence des sols non résistants (dits sensibles), où les maladies se développent régulièrement. Les sols résistants constituent un réservoir d'agents de lutte biologique prometteurs, capables de fournir une protection efficace aux plantes contre divers phytopathogènes présents dans le sol. Ce potentiel revêt une grande importance, surtout face à des phytopathogènes tel que *F. graminearum*, qui causent des dommages croissants aux cultures dans le contexte actuel du changement climatique. On sait que des sols résistants aux maladies causées par *Fusarium* existent dans le monde entier, affectant diverses cultures, et que des agents de lutte biologique sont isolés de ces sols. En outre, des représentants de divers groupes bactériens remplissent des fonctions qui conduisent à la résistance aux maladies causées par le *Fusarium*. Par exemple, les espèces des genres *Bacillus*, *Paenibacillus* et *Streptomyces* sont bien connues pour jouer un rôle dans la résistance contre des maladies causées par *Fusarium*, grâce à divers mécanismes de contrôle biologique tel que l'antagonisme, compétition, parasitisme et induction d'une résistance systémique chez les plantes. Ces bactéries présentent également un certain nombre de propriétés favorisant la croissance des plantes, telles que la solubilisation du phosphore, la production d'acide indole-3-acétique (AIA) ou la production de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, facilitant ainsi la croissance des plantes. Outre les espèces mentionnées ci-dessus, il est établi que les espèces du genre *Pseudomonas* possèdent une multitude de fonctions phyto-bénéfiques et jouent un rôle important dans la rhizosphère. De plus, les espèces de *Pseudomonas* peuvent moduler la croissance des plantes en produisant des phytohormones et elles peuvent modifier la biodisponibilité des nutriments, par exemple en produisant de l'ACC désaminase, en solubilisant les phosphates, en fixant l'azote et/ou en dénitrifiant. Pour élucider ces divers modes d'action des bactéries bénéfiques pour les plantes, l'analyse génomique est précieuse. Elle permet non seulement de caractériser ces traits fonctionnels bénéfiques, mais également d'identifier les bactéries elles-mêmes. Cependant, au-delà de ces groupes bactériens spécifiques qui influent sur le développement des agents pathogènes et des maladies, il a été démontré que la plus grande diversité fonctionnelle et génétique de l'ensemble de la communauté microbienne du sol contribue positivement à la résistance du sol.

Compte tenu de l'importance des sols résistants, qui n'ont pas encore été identifiés en Serbie, et du pathogène émergent *F. graminearum*, l'objectif général de ce projet était de mieux comprendre les phénomènes de fongistase et de résistance, et d'évaluer l'utilité des sols résistants et fongistatiques comme les sources de bactéries ayant un potentiel de biocontrôle. Dans ce contexte, le premier objectif

de cette recherche était d'identifier les sols fongistatiques et résistants de *F. graminearum* en Serbie, d'étudier la relation entre les amendements du fumier et l'apparition de fongistase/résistance, et de comparer les sols fongistatiques et résistants choisis en fonction de leur diversité des rhizosphères fongiques et procaryotes. Le deuxième objectif était d'évaluer le potentiel des sols fongistatiques envers *F. graminearum* comme sources d'agents de biocontrôle. Cela impliquait l'isolement de bactéries de taxonomie contrastée, leur caractérisation basée sur des traits génomiques et fonctionnels et l'évaluation de leur capacité phytoprotectrice du blé contre *F. graminearum*. Le troisième objectif de ce travail était d'identifier les particularités génomiques et fonctionnelles de la bactérie *Pseudomonas* dans des sols résistants et non résistants.

3. Hypothèses

L'hypothèse générale de ce projet était que des sols résistants pouvaient être identifiés à l'échelle mondiale et que les sols enrichis de fumier étaient plus susceptibles de manifester des propriétés fongistatiques et résistantes aux maladies. Cette hypothèse générale a été subdivisée en trois hypothèses spécifiques : La première hypothèse était que les sols résistants à *Fusarium*, largement répandus, pouvaient être identifiés en examinant ceux présentant des problèmes de maladie limités, sur la base des observations des agriculteurs, ou ayant fait l'objet d'une gestion axée sur la matière organique pour améliorer la diversité microbienne. La deuxième hypothèse était que le pouvoir résistant du sol était déterminé par des facteurs biotiques et que les sols fongistatiques (et résistants) servant de réservoir d'antagonistes prometteurs contre un pathogène du sol, *F. graminearum*. La troisième hypothèse était que l'analyse génomique et fonctionnelle de *Pseudomonas* fluorescents isolés de sols résistants et non résistants pouvait être utile pour explorer les mécanismes de résistance des sols.

Dans ce travail, des sols fongistatiques et résistants à *F. graminearum* ont été identifiés pour la première fois en Serbie. La première hypothèse a été infirmée, car le statut résistant et fongistatique des sols n'est pas corrélé à l'ajout d'amendements de fumier dans tous les sols étudiés. La deuxième hypothèse a été validée, car les sols fongistatiques et résistants ont servi de sources prometteuses pour des agents de lutte biologique. Cependant, certaines souches prometteuses ont également été isolés des sols non fongistatiques et non résistants. La troisième hypothèse a été rejetée, car les souches de *Pseudomonas* de sols résistants et sensibles présentaient des capacités de biocontrôle similaires.

4. Brève description du contenu de la thèse

Introduction. Dans ce chapitre, l'importance de la lutte biologique et des sols résistants a été soulignée, en se concentrant sur les genres bactériens qui contribuent à la résistance des maladies causées par *Fusarium*.

Synthèse bibliographique. Ce chapitre se compose de cinq sections et présente un résumé des connaissances actuelles sur les sols résistants et les agents de lutte biologique contre *Fusarium*. Dans la première section, ***Pouvoir résistant des sols***, les connaissances actuelles sur le pouvoir résistant des sols ont été présentées, ainsi que les types de pouvoir résistant des sols et l'importance des bactéries de la rhizosphère dans le pouvoir résistant des sols. Dans la deuxième section, ***Importance du Fusarium pathogène et des sols résistants des maladies du Fusarium***, l'accent a été mis sur les principales méthodes de contrôle disponibles, la présence de sols résistants des maladies du *Fusarium*, les effets des pratiques agricoles sur les sols résistants des maladies du *Fusarium* et enfin, sur *F. graminearum*. Une forme modifiée de cette section a été publiée sous forme d'article de synthèse dans la revue M21a *Frontiers in Plant Science* (Todorović et al. 2023a). Dans la troisième

section, *Les agents de biocontrôle contre le Fusarium et leurs modes d'action*, les souches bactériennes et fongiques connues pour agir contre le *Fusarium*, ainsi que leurs modes d'action, ont été passés en revue. Dans la quatrième section, *Modes d'action des bactéries bénéfiques favorisant la croissance des plantes*, tous les mécanismes procaryotes contribuant à la croissance des plantes ont été décrits. Enfin, dans la cinquième section, *L'importance de Pseudomonas dans la lutte biologique et la promotion de la croissance des plantes*, une revue des modes d'action de *Pseudomonas* qui contribuent à la phytoprotection a été présentée.

Objectifs. Les objectifs de cette recherche étaient les suivants: 1) d'identifier les sols fongistatiques et résistants à *F. graminearum* en Serbie, étudier la relation entre les amendements du fumier et l'apparition de fongistase/résistance, et comparer les sols fongistatiques et résistants choisis en fonction de leurs diversité fongiques et procaryotique de la rhizosphère; 2) d'évaluer le potentiel de sols fongistatique de *F. graminearum* en tant que sources d'agents de biocontrôle, ce qui impliquait l'isolement de bactéries de taxonomie contrastée, leur caractérisation basée sur des traits génomiques et fonctionnels, et l'évaluation de leur capacité phytoprotectrice du blé contre *F. graminearum*; 3) d'identifier les particularités génomiques et fonctionnelles des bactéries *Pseudomonas* dans les sols résistants et non résistants, motivées par le fait que *Pseudomonas* peut contribuer à la protection des plantes contre les maladies causées par *Fusarium* et jouer un rôle dans la résistance de ces maladies dans les sols, bien que les *Pseudomonas* de lutte biologique a également été documentée dans des sols non résistants.

Matériel et méthodes. Dans ce chapitre, le matériel et les méthodes utilisés ont été décrits en 12 sections. Dans la première section, *Échantillonnage du sol*, il y a une description de l'échantillonnage des 26 champs de cinq endroits du nord et de l'ouest/centre de la Serbie (c'est-à-dire des emplacements près de Sombor (SO), Novi Karlovci (NK), Valjevo (VA), Mionica (MI) et Čačak (CA)), avec des historiques d'épandage de fumier contrastés pour chaque emplacement. Dans la deuxième section, *Fongistase du sol à Fusarium graminearum*, la souche de *Fusarium* utilisée tout au long de cette recherche a été décrite, ainsi que la préparation d'inoculum fongique et l'extraction d'ADN. Enfin, plusieurs étapes d'évaluation de la fongistase du sol ont été expliquées, notamment la stérilisation du sol, l'inoculation, l'incubation, l'extraction de l'ADN et une approche de PCR quantitative (qPCR) avec des amorces spécifiques de *F. graminearum*, utilisées pour quantifier la quantité d'ADN de *F. graminearum* Fg1 présente dans les sols stérilisés et non stérilisés. Dans la troisième section, *In planta test de résistance*, la préparation de la suspension de spores de *F. graminearum*, ainsi que la mise en place du test de résistance ont été décrites. Dans la quatrième section, *Analyse de la diversité des procaryotes et fongiques par l'approche métabarcoding*, la séparation des rhizosphères des plants de blé du test de résistance a été décrite, ainsi que l'isolement de l'ADN de la rhizosphère, séquençage du l'ARNr 16S et ITS et du traitement des données. La cinquième section, *Formation de collection de bactéries indigènes de biocontrôle*, comprenait la description de la préparation de l'extrait de rhizosphère, l'isolement des bactéries sur différents milieux sélectifs et non sélectifs, un test de confrontation avec *F. graminearum*, ainsi que l'identification bactérienne. La sixième section, *Analyse de la diversité de la rhizosphère Pseudomonas grâce à l'approche métabarcoding*, décrit plusieurs étapes, notamment l'isolement de l'ADN de la rhizosphère, le séquençage du gène *rpoD*, en utilisant pour la première fois les amorces *rpoD* de Manriquez (2021), et le traitement des données. Dans la septième section, *La formation de la collection de Pseudomonas*, l'isolement et l'identification des isolats de *Pseudomonas* ont été décrits. Dans le huitième chapitre, *Le séquençage du génome et l'annotation du génome d'isolats sélectionnés de biocontrôle et de Pseudomonas*, l'extraction de l'ADN, le séquençage, l'assemblage et l'annotation du génome ont été décrits. La neuvième section, *Caractérisation des isolats de biocontrôle et de Pseudomonas favorisant la croissance des plantes*, comprend plusieurs parties décrivant les procédures utilisées pour évaluer la capacité des isolats bactériens à produire des

sidérophores, du cyanure d'hydrogène, des enzymes lytiques, des phytohormones, de l'ACC désaminase, à solubiliser les phosphates, pour produire des Composés organiques volatils (VOC) qui inhibent la croissance de *F. graminearum* ou pour produire des exsudats qui inhibent la germination des spores fongiques. La dixième section, ***Test de protection des plantes avec des isolats de biocontrôle et de Pseudomonas choisis***, décrit les étapes suivies pour évaluer la capacité des souches bactériennes à protéger le blé contre la pourriture du collet causée par *F. graminearum*. La onzième section, ***Méthodes utilisées pour identifier les nouvelles espèces***, comprend des analyses phylogénétiques, ainsi qu'une caractérisation morphologique, biochimique et physiologique des espèces nouvellement décrites. Enfin, la douzième section, ***Analyses statistiques***, explique les méthodes statistiques utilisées pour analyser la variance et comparer les moyennes des données obtenues, toutes réalisées à l'aide sous R 4.2.1. (<https://www.r-project.org>).

Résultats. Les résultats de cette recherche sont présentés clairement à travers sept sections, chacune avec plusieurs sous-titres, avec des interprétations textuelles claires et concises, des tableaux et des figures qui illustrent les résultats de la recherche. Dans la première section, ***Enquête sur le terrain***, les emplacements des sols, y compris les résultats du questionnaire destiné aux agriculteurs, ont été présentés. Dans la deuxième section, ***Fongistase du sol à Fusarium graminearum***, dix sols fongistatiques identifiés en Serbie ont été présentés, dont sept étaient amendés en fumier. Leur distribution était limitée aux régions occidentales et centrales du pays. Près de Mionica (sols MI2, MI3, MI4 et MI5), le fumier a été identifié comme un facteur favorisant la fongistase. Les sols MI2 et MI3, ayant reçu du fumier, étaient fongistatiques, tandis que les sols MI4 et MI5, non amendés, ne présentaient pas de propriétés fongistatiques. Une tendance similaire a été observée près de Čačak. Cependant, l'ajout de fumier dans les sols proches de Sombor, Novi Karlovci et Valjevo n'a pas été associé à fongistase. Dans la troisième section, ***Le caractère résistant des sols de Mionica contre la fonte des semis du blé induit par Fusarium graminearum***, les quatre sols de Mionica ont été choisis pour un essai de résistance *in planta*, révélant que les sols MI2, MI3 et MI5 étaient résistants, tandis que le sol MI4 était sensible à la fusariose du blé. Les données de fongistase et de résistance ont permis de définir trois catégories de sols : (i) les sols MI2 et MI3 fongistatiques et résistants, (ii) le sol MI4 non fongistatique et non résistant, tandis que (iii) le sol MI5 non fongistatique mais résistant. Dans la quatrième section, ***Diversité des communautés rhizosphériques procaryotes et fongiques dans les sols de Mionica***, l'analyse métabarcodage des procaryotes et ITS fongiques des trois catégories de sols a été présentée, indiquant que la plupart des différences dans la diversité alpha procaryote n'étaient pas significatives, alors que les champignons dans le sol MI5 (non fongistatique, résistant) affichaient des indices de Shannon et Pielou inférieurs à ceux des autres sols. De plus, la structure du microbiote dépendait principalement du sol d'origine, avec un effet modeste mais significatif de l'inoculation. La cinquième section, ***Composition de la communauté taxonomique de la rhizosphère dans les sols de Mionica***, a révélé que la rhizosphère du blé des trois sols partageait les principaux phylums procaryotes et la majorité des taxons les plus abondants, bien que plusieurs taxons soient spécifiques au sol. De plus, l'inoculation du sol avec *F. graminearum* a eu un impact sur le microbiote de la rhizosphère, mais souvent avec des effets spécifiques au sol. Quant à la communauté fongique, les trois sols abritaient des représentants des phylums *Ascomycota*, *Basidiomycota* et *Mortierellomycota*, tandis que les taxons de l'ordre des *Chytridiomycota* n'étaient trouvés que dans les sols MI4 et MI5. Pour la communauté fongique, l'inoculation du sol avec *F. graminearum* a eu un impact sur la communauté rhizosphérique. Dans la sixième section, ***Les sols fongistatiques comme source de bactéries de la rhizosphère ayant des propriétés de biocontrôle contre Fusarium graminearum***, l'isolement de 244 bactéries provenant de sols fongistatiques et non fongistatiques et un test de confrontation *in vitro* avec *F. graminearum* ont été décrits, ce qui a conduit à l'identification de 23 isolats ayant une activité potentielle de biocontrôle contre ce champignon pathogène. Parmi ces 23 isolats, 10 provenaient de sols fongistatiques et 13 de sols non

fongistatiques. Le séquençage du génome entier a révélé que, dans les sols fongistatiques, trois souches appartenaient au genre *Pseudomonas*, une au genre *Kosakonia*, quatre souches au genre *Bacillus* et deux au genre *Priestia*. Dans les sols non fongistatiques, sept souches appartenaient au genre *Pseudomonas*, deux souches au genre *Burkholderia*, deux souches au genre *Bacillus*, une au genre *Brevibacillus* et une au genre *Chryseobacterium*. Le séquençage du génome entier a également révélé huit nouvelles espèces génomiques. L'annotation du génome, ainsi que les analyses fonctionnelles, ont révélé que les isolats provenant de sols fongistatiques et non fongistatiques possédaient des gènes et des fonctions impliqués dans le biocontrôle ou la promotion de la croissance des plantes. La distribution de ces caractères phyto-bénéfiques était en grande partie spécifique aux taxons. Il a été observé que seuls les VOC produits par des souches provenant de sols non fongistatiques inhibaient la croissance mycélienne de *F. graminearum*, tandis que les exsudats d'isolats provenant de sols fongistatiques et non fongistatiques avaient la capacité d'inhiber la germination des conidies fongiques. Enfin, sept souches sélectionnées en fonction des résultats de l'essai de confrontation, de la capacité des souches à inhiber la croissance mycélienne fongique par la production de VOC ou de la capacité des exsudats bactériens à inhiber la germination des conidies fongiques, ont été utilisées dans un essai de phytoprotection en serre ; les groupes de gènes biosynthétiques trouvés dans leurs génomes ont été annotés manuellement. Les résultats ont indiqué qu'une seule souche, à savoir *Pseudomonas GS-5 IT194MI4* (provenant d'un sol non fongistatique), a amélioré la germination du blé et a assuré une protection contre la pourriture du collet. Cependant, cela s'est fait au détriment de la biomasse des pousses et du taux de chlorophylle. Les sept souches hébergent des gènes biosynthétiques codant pour les sidérophores et les antibiotiques. Dans la septième section, *Pseudomonas indigènes dans les sols résistants de Fusarium graminearum*, une analyse de métabarcodes des sols près de Mionica, ciblant le gène *rpoD* du groupe *P. fluorescens*, a été présentée et a indiqué que la sous-communauté de *Pseudomonas* différait entre les différents sols. En parallèle, 406 *Pseudomonas* putatifs ont été isolés des huit conditions, comprenant quatre sols ayant été inoculés ou non avec *F. graminearum*. La caractérisation basée sur le gène *rpoD* (ou *rrs*) a réussi pour 185 isolats, produisant 65 séquences *rpoD* distinctes. De ce nombre, 29 *Pseudomonas* provenant des quatre sols et des conditions inoculées ou non avec *F. graminearum* ont été sélectionnés pour un séquençage du génome entier, confirmant ainsi leur appartenance au genre *Pseudomonas* et révélant 16 nouvelles espèces génomiques. Deux de ces espèces (chacune avec deux souches provenant de sols différents) ont été formellement décrites sous les noms de *P. serbica* et *P. serboccidentalis*. L'analyse génomique et la caractérisation fonctionnelle des 29 *Pseudomonas* ont démontré que leurs gènes et fonctions bénéfiques pour les plantes sont uniformément répartis entre les souches, indépendamment des conditions expérimentales (origine du champ, inoculation avec *F. graminearum*, statut résistant et application antérieure de fumier). Les souches de *Pseudomonas* provenant des quatre sols MI avaient la capacité d'inhiber le développement des mycéliums de *F. graminearum* grâce à la production de VOC, tandis que seules les souches du sol MI5 (non fongistatiques et résistants) avaient la capacité d'inhiber la germination des conidies fongiques. Aucun des isolats de *Pseudomonas* n'a conféré une protection au blé contre *F. graminearum*. L'annotation manuelle des gènes dans les génomes de ces 29 *Pseudomonas* a révélé une répartition uniforme des groupes de gènes biosynthétiques potentiellement impliqués dans le biocontrôle.

Discussion. Les résultats ont été discutés en quatre sections. Dans la première section, *Fongistase et pouvoir résistant du sol contre les maladies causées par Fusarium*, les résultats obtenus au cours de cette recherche ont été comparés aux données de la littérature. La fongistase documentée dans certains sols fumés ont été expliquées et des explications ont été proposées pour les sols qui ne présentaient pas de fongistase. En outre, le caractère résistant de certains sols de Mionica a également été discuté, ainsi que la diversité et la composition procaryotes et fongiques de ces sols. Dans la deuxième section, *Les sols fongistatiques comme source de bactéries ayant des propriétés*

de biocontrôle contre *Fusarium graminearum*, l'utilité du test de confrontation comme première procédure de criblage a été expliquée. Les gènes dont les produits sont impliqués dans le biocontrôle et la promotion de la croissance des plantes, trouvés dans les souches bactériennes indigènes de cette étude, ont été discutés et comparés aux données de la littérature. En outre, il a été expliqué pourquoi certaines souches fonctionnent bien dans des conditions *in vitro*, mais échouent dans les expériences sur plante et sur le terrain, soulignant la complexité des interactions entre les plantes et les microorganismes. Dans la troisième section, ***Pseudomonas dans les sols résistants et non résistants***, l'importance de *Pseudomonas* dans les sols résistants a été discutée. L'analyse des métabarcodes des populations de *Pseudomonas* dans des sols résistants et sensibles a été comparée à d'autres données disponibles dans la littérature. Le potentiel génomique et fonctionnel de *Pseudomonas* dans des sols résistants et sensibles a été comparé et il a été souligné que leurs capacités sont similaires et dépendent de l'espèce, et que l'état résistant du sol pourrait être le résultat de l'abondance relative de *Pseudomonas* dans les sols résistants ou une expression différente des gènes de biocontrôle, par rapport aux sols sensibles. Ici, les caractéristiques génomiques et fonctionnelles de deux nouvelles espèces, *P. serbica* et *P. serboccidentalis*, ont été décrites et ces résultats publiés dans une revue M22 *Systematic and Applied Microbiology* (Todorović et al. 2023b). Les *Pseudomonas* qui ont été testés dans un essai *in planta*, mais qui n'ont pas protégé les plants de blé contre *F. graminearum*, ont été discutés et comparés aux données de la littérature. Dans la quatrième section, ***Métabolites secondaires dans la résistance du sol contre Fusarium graminearum***, la présence de groupes de gènes biosynthétiques trouvés dans les génomes des souches de biocontrôle et de *Pseudomonas* a été expliquée comme étant importante et comme contribuant possiblement à la résistance de la maladie. En outre, il a été expliqué que ces métabolites pourraient ne pas être du tout excrétés, et les étapes nécessaires pour vérifier leur implication dans la résistance de la maladie ont été décrites.

Conclusions. Les conclusions sont correctement tirées et découlent des résultats obtenus. Des sols fongistatiques et résistants de la maladie de *F. graminearum* ont été identifiés pour la première fois en Serbie, et le fumier s'est révélé être un facteur important favorisant la fongistase dans les champs proches de Mionica, mais pas ailleurs. Deuxièmement, il a également été démontré que les sols fongistatiques pouvaient également être résistants et que les sols résistants et sensibles partageaient les principaux phylums procaryotes et fongiques, ainsi que la majorité des taxons les plus abondants, mais que plusieurs taxons étaient spécifiques au sol. Troisièmement, il a été démontré que les sols fongistatiques et non fongistatiques peuvent être une source de bactéries ayant des propriétés antagonistes contre *F. graminearum* et que le séquençage du génome entier est une approche utile pour mieux comprendre le potentiel de biocontrôle et le statut taxonomique des souches antagonistes. Quatrièmement, deux nouvelles espèces de *Pseudomonas* ont été décrites, à savoir *P. serbica* et *P. serboccidentalis*. En outre, il a également été démontré que les espèces de *Pseudomonas* présentes dans des sols résistants et non résistants pourraient présenter des fonctions de biocontrôle similaires. En conclusion, les données obtenues au cours de cette recherche peuvent servir de base à des recherches plus approfondies sur les sols résistants des maladies à *F. graminearum* et à des études sur le microbiome de la rhizosphère, aboutissant à une collection de souches bactériennes soigneusement caractérisées avec un potentiel applicatif important.

Les références. La thèse répertorie 562 sources littéraires. Les références sont citées de manière correcte, elles sont actuelles et pertinentes pour le problème étudié.

Matériel supplémentaire. Le matériel supplémentaire est constitué de résultats de recherche présentés sous la forme de cinq chapitres qui correspondent à cinq publications scientifiques et d'une conclusion générale. Parmi celles-ci, deux publications, correspondant aux chapitres 1 et 4A, ont été publiées dans *Systematic and Applied Microbiology* et *Frontiers in Plant Science* en 2023; une publication, correspondant au chapitre 2, a été soumise pour publication à *Applied Soil Ecology* en

septembre 2023; les deux publications restantes, correspondant aux chapitres 3 et 4B, seront soumises aux revues d'ici fin 2023.

5. Résultats et contribution scientifique

Au cours de cette recherche, des sols fongistatiques et résistants de la maladie du blé à *F. graminearum* ont été documentés pour la première fois en Serbie. En outre, pour la première fois, la fongistase et le pouvoir résistant du sol ont été étudiés pour les mêmes champs, et les données obtenues pourraient servir de base à des recherches plus approfondies sur les sols résistants des maladies de *F. graminearum* et de base pour des études sur le microbiome de la rhizosphère, totalisant ainsi les recherches déjà menées sur les sols résistants des maladies de *Fusarium* dans d'autres parties du monde, dans différentes conditions climatiques et avec différentes pratiques agricoles. De plus, au cours de cette thèse, il a été démontré que les sols fongistatiques et non fongistatiques hébergent des souches bactériennes dotées de capacités de biocontrôle et que les *Pseudomonas* des sols résistants et non résistants présentent le même potentiel de suppression des pathogènes.

En outre, un résultat extrêmement important de cette recherche est la formation d'une collection de souches bactériennes profondément caractérisées qui ont un vaste potentiel pour être utilisées dans l'agriculture durable. De plus, deux nouvelles espèces, *Pseudomonas serbica* et *Pseudomonas serboccidentalis*, ont été entièrement caractérisées et validement publiées, conformément aux lignes directrices fournies par le Code international de nomenclature des procaryotes. Enfin, des recherches comme celle-ci représentent un petit pas, mais très significatif, vers une diminution des pertes de récoltes et économiques, ainsi que vers la protection de la santé humaine et animale compromise par les mycotoxines de *Fusarium*.

6. Publications

Todorović, I., Moëgne-Loccoz, Y., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J., & Muller, D. (2023a). Microbial diversity in soils suppressive to *Fusarium* diseases. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1228749. doi: 10.3389/fpls.2023.1228749

Todorović, I., Abrouk, D., Kyselková, M., Lavire, C., Rey, M., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J., Moëgne-Loccoz, Y., & Muller, D. (2023b). Two novel species isolated from wheat rhizospheres in Serbia: *Pseudomonas serbica* sp. nov. and *Pseudomonas serboccidentalis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 46(4), 126425. doi: 10.1016/j.syapm.2023.126425

Todorović, I., Moëgne-Loccoz, Y., Raičević, V., Muller, D., & Jovičić-Petrović, J. (2023c). In I. Dimkić, & V. Venturi (Eds.), Abstracts from the Workshop "Trends in Microbial Solutions for Sustainable Agriculture" (p. 70). University of Belgrade. ISBN: 978 -86-7078-178-8

7. Conclusion et proposition de la Comité

La thèse de doctorat d'Irena Todorović, intitulée "Populations bactériennes indigènes dans la résistance du sol contre *Fusarium graminearum*", représente un manuscrit scientifique original et une étude contemporaine dans le domaine scientifique de la microbiologie environnementale. La recherche menée est entièrement conforme au plan approuvé dans le projet de thèse. Sur la base des données bibliographiques systématiquement revues, le candidat a clairement défini les objectifs de la

recherche. Le candidat a réalisé avec succès des recherches expérimentales en appliquant une méthodologie adéquate et moderne, et les résultats obtenus ont été analysés, présentés de manière approfondie et jugés en corrélation avec les conclusions d'autres auteurs. La thèse est organisée et formatée de manière adéquate, et les conclusions découlent logiquement des résultats obtenus.

Compte tenu mentionnés ci-dessus et particulièrement des résultats obtenus et de leur contribution scientifique et applicative, le Comité évalue positivement la thèse de doctorat d'Irena Todorović intitulée "Populations bactériennes indigènes dans la résistance du sol contre *Fusarium graminearum*" et propose au Conseil pédagogique et scientifique de la Faculté de l'Agriculture de l'Université de Belgrade d'accepter cette évaluation positive et de permettre la soutenance publique de la thèse.

Belgrade,

Date: 28 décembre 2023

LES MEMBRES DU COMITÉ

Igor Kljujev, Ph. D., professeur
Faculté d'agriculture, Université de Belgrade
(Domaine scientifique: Microbiologie
environnementale)

Alain Sarniguet, Ph. D., directeur de recherche
INRAE - Institut national de recherche pour
l'agriculture, l'alimentation et l'environnement,
UMR 1345 Beaucozé – IRHS - Institut de
Recherche en Horticulture et Semences
(Domaine scientifique: Phytopathologie)

Vera Karličić, Ph. D., professeure associée
Faculté d'agriculture, Université de Belgrade
(Domaine scientifique: Microbiologie
environnementale)

Marie Simonin, Ph. D., chargée de recherche
INRAE - Institut national de recherche pour
l'agriculture, l'alimentation et l'environnement,
UMR 1345 Beaucozé – IRHS - Institut de
Recherche en Horticulture et Semences
(Domaine scientifique: Microbiologie
environnementale)

Smilja Teodorović, Ph. D., professeure
Université d'investigation criminelle et d'études
policières, Belgrade
(Domaine scientifique: Biologie et génétique)

Florence Hommais, Ph. D., professeure
Université Claude Bernard Lyon1,
UMR 5240 – MAP
(Domaine scientifique: Génomique et génétique
bactériennes)

Lidija Đokić, Ph. D., professeure
Institut de génétique moléculaire et de génie
génétique, Université de Belgrade
(Domaine scientifique: Biologie moléculaire)

Daniel Muller, Ph. D., maître de conférences
Université Claude Bernard Lyon1,
UMR 5557 – Ecologie microbienne
(Domaine scientifique: Microbiologie
environnementale)

**CONSEIL PÉDAGOGIQUE ET SCIENTIFIQUE DE LA FACULTÉ
FACULTÉ D'AGRICULTURE
UNIVERSITÉ DE BELGRADE
Date: 15 décembre 2023**

Objet: Déclaration sur l'originalité de la thèse de doctorat "Populations bactériennes indigènes dans la résistance du sol contre *Fusarium graminearum*", de la candidate Irena Todorović

Sur la base du Règlement sur la procédure de contrôle de l'originalité des thèses de doctorat soutenues à l'Université de Belgrade et du rapport du programme iThenticate, qui a vérifié l'originalité de la thèse de doctorat: "**Populations bactériennes indigènes dans la résistance du sol contre *Fusarium graminearum***", par Irena Todorović, nous confirmons que le match établi est de 19%. Ce degré de coïncidence est une conséquence des noms de personnes, des données bibliographiques sur la littérature utilisée, les données générales, les citations et, dans la plus grande mesure, les résultats de recherche précédemment publiés de la doctorante, résultant de sa thèse, conformément à l'article 9 du présent Règlement.

Sur la base de tout ce qui précède et conformément à l'article 8, paragraphe 2 du Règlement sur la procédure de contrôle de l'originalité des thèses de doctorat soutenues à l'Université de Belgrade, nous déclarons que le rapport indique l'originalité de la thèse de doctorat et la procédure de préparation de sa défense peut se poursuivre.

Belgrade, 15 décembre 2023

Directeurs de thèse:
Jelena Jovičić-Petrović, Ph. D., professeure associée
Faculté d'agriculture, Université de Belgrade

Daniel Muller, Ph. D., maître de conférences
Université Claude Bernard Lyon1, UMR 5557 - Ecologie
microbienne, France
