

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Tamara G. Krstić Tomić

**Karakterizacija sezonske promene  
mikrobioma šećerne repe i korelacija sa  
biokontrolnim potencijalom dobijenih izolata**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Tamara G. Krstić Tomić

**Characterization of seasonal changes in the  
sugar beet microbiome and their correlation  
with the biocontrol potential of the obtained  
isolates**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

**Mentor:**

---

dr Jelena Lozo, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

**Članovi komisije:**

---

dr Slaviša Stanković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

---

dr Tanja Berić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

---

dr Nataša Joković, redovni profesor  
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu

---

dr Marijana Pešaković, naučni savetnik  
Institut za voćarstvo, Čačak

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## **Zahvalnica**

*Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije realizovana su na Katedri za biohemiju i molekularnu biologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Jelene Lozo. Deo eksperimenata sproveden je i na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Nišu, kao i na Institutu za voćarstvo Čačak, u Čačku.*

*Na prvom mestu, izražavam najdublju zahvalnost svom mentoru, prof. dr Jeleni Lozo, na ukazanom poverenju, stručnom vođenju, nesebičnoj podršci i razumevanju tokom svih faza izrade doktorske disertacije. Hvala Vam na vremenu koje ste posvećivali mom radu, na svakom savetu, sugestiji i konstruktivnoj kritici, koji su značajno doprineli kvalitetu ove disertacije i mom profesionalnom razvoju. Posebno sam zahvalna na slobodi i poverenju koje ste mi pružali u radu, ali i na spremnosti da u svakom trenutku pomognete kada bih se susrela sa nedoumicama i izazovima. Vaše znanje, iskustvo i posvećenost predstavljali su mi dragocen oslonac tokom čitavog ovog procesa.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Slaviši Stankoviću, na savetima, saradnji, kao i na vremenu i trudu koji ste uložili u realizaciju ovog istraživanja. Vaše sugestije i iskustvo bili su od velikog značaja za prevazilaženje brojnih izazova sa kojima sam se susretala tokom rada.*

*Posebno se zahvaljujem prof. dr Nataši Joković na nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalnog dela istraživanja, korisnim savetima, diskusijama i prenetom znanju. Hvala na strpljenju, spremnosti da pomognete i svakom razgovoru koji je doprinosa boljem razumevanju problema i rezultata.*

*Članovima komisije, prof. dr Tanji Berić i dr Marijani Pešaković, zahvaljujem se na vremenu posvećenom pažljivom čitanju i razmatranju ove disertacije, kao i na korisnim sugestijama, komentarima i konstruktivnim kritikama koje su doprinele njenom unapređenju.*

*Zahvaljujem se svim kolegama koji su bili deo mog puta tokom doktorskih studija, na pomoći, podršci, razmeni znanja i iskustava, ali i na svim razgovorima i trenucima koji su ovaj period učinili lepšim. Posebno hvala Jovani Todorović, Mariji Nedeljković, Aleksandri Mesaroš i Anđeli Dubroji Krstić na prijateljstvu, razumevanju i podršci, koji su mi u mnogim trenucima značili više nego što se može izraziti rečima.*

*Hvala i mojim prijateljima, koji su bili uz mene tokom svih faza doktorskih studija. Hvala vam na razumevanju kada nisam imala vremena, na strpljenju kada sam bila preopterećena obavezama, na ohrabrenju u teškim trenucima i na tome što ste umeli da me podsetite da život postoji i van laboratorije i rada. Hvala vam što ste moje uspehe doživljavali kao svoje i što ste bili tu i kada je bilo lako i kada nije.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima i sestri, na bezuslovnoj ljubavi, razumevanju, ohrabrenju, podršci i poverenju koje ste mi pružali tokom čitavog ovog perioda. Hvala vam što ste verovali u mene, i što ste me svojim prisustvom podsećali da nijedan profesionalni uspeh nema pravu vrednost bez ljudi sa kojima možemo da ga podelimo. Bez vaše podrške ovaj put bi bio mnogo teži.*

*Suprugu i ćerki dugujem posebnu zahvalnost za ljubav, strpljenje i podršku tokom svih godina doktorskih studija. Hvala vam što ste imali razumevanja za sve nespavane noći, rokove, odsustva, obaveze i trenutke kada mi je posao bio u prvom planu. Hvala što ste bili uz mene i što ste svaki uspeh učinili još lepšim.*

*Svima koji su bili deo ovog puta - hvala.*

# Karakterizacija sezonske promene mikrobioma šećerne repe i korelacija sa biokontrolnim potencijalom dobijenih izolata

## Sažetak

Mikrobiom šećerne repe predstavlja izvor bakterijske raznovrsnosti i funkcionalno različitih mikroorganizama koji mogu doprineti rastenju i zaštiti biljke. U ovom istraživanju analizirana je sezonska dinamika bakterijskog mikrobioma šećerne repe primenom metoda zavisnih i nezavisnih od kultivacije, kao i funkcionalne osobine izolovanih bakterija. Izolacijom na konvencionalnim i podlogama sa biljnim ekstraktima dobijeno je 635 bakterijskih izolata, dok je mikrobiom okarakterisan sekvenciranjem gena za *16S rRNA*. Rezultati su pokazali izraženu sezonsku dinamiku i komplementarnost pristupa zavisnog i nezavisnog od kultivacije. Dok je sastav mikrobioma na nivou razdela bio relativno stabilan, sezonske promene bile su izraženije na nivou rodova i vrsta, naročito u filosferi. Podloge sa biljnim ekstraktima omogućile su izolaciju taksona koji nisu detektovani metabarkodiranjem, uključujući izolate sa osobinama značajnim za promociju rastenja biljke i biokontrolu. Odabrani sojevi *Bacillus safensis* MRh275, *B. pseudomycoides* JRh226 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266, kao i konzorcijum T2 (MRh275 i JRh266), pokazali su biokontrolni potencijal prema *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21 u *in planta* uslovima. Efikasnost biokontrole zavisila je od soja i načina primene. Direktna primena bila je povezana sa izraženijim smanjenjem razvoja lezija, dok je indirektna primena, odnosno priprema semena, izraženije modulirala redoks odgovor biljke, aktivnost antioksidativnih enzima i fenilalanin amonijum-lijaze, kao i ekspresiju gena povezanih sa odbranom biljke. Rezultati ukazuju na značaj bakterijskog mikrobioma šećerne repe kao izvora funkcionalno raznovrsnih mikroorganizama sa potencijalom za pripremu semena kao oblik biokontrole.

**Ključne reči:** šećerna repa, bakterijski mikrobiom, metabarkodiranje, bakterije koje podstiču rastenje biljaka, biološka kontrola, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Mikrobiologija

# Characterization of seasonal changes in the sugar beet microbiome and their correlation with the biocontrol potential of the obtained isolates

## Abstract

The sugar beet microbiome is a source of bacterial diversity and functionally diverse microorganisms that may contribute to plant growth and protection. This study investigated the seasonal dynamics of the sugar beet bacterial microbiome using culture-dependent and culture-independent approaches, as well as the functional traits of bacterial isolates. We obtained 635 bacterial isolates using conventional and plant extract-based media, and we characterized the microbiome by sequencing the *16S rRNA* gene. The results revealed pronounced seasonal dynamics and complementarity between culture-dependent and culture-independent approaches. Although microbiome composition at the phylum level was relatively stable, seasonal changes were more pronounced at the genus and species levels, particularly in the phyllosphere. Plant extract-based media enabled the isolation of taxa not detected by metabarcoding, including isolates with traits relevant to plant growth promotion and biocontrol. The selected strains *Bacillus safensis* MRh275, *B. pseudomycoides* JRh226, and *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266, as well as consortium T2 (MRh275 and JRh266), showed biocontrol potential against *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21 under *in planta* conditions. Biocontrol efficacy depended on the strain and application method. Direct application was associated with a more pronounced reduction in lesion development, whereas indirect application, i.e., seed treatment, led to more pronounced modulation of the plant redox response, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities, and the expression of genes associated with plant defense. The results highlight the importance of the sugar beet bacterial microbiome as a source of functionally diverse microorganisms with seed priming potential for biocontrol.

**Keywords:** sugar beet, bacterial microbiome, metabarcoding, plant growth-promoting bacteria, biological control, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Microbiology

# Sadržaj

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| UVOD.....                                                                              | 1  |
| Šećerna repa ( <i>Beta vulgaris</i> L.).....                                           | 1  |
| Biljni mikrobiom.....                                                                  | 2  |
| Metode proučavanja biljnog mikrobioma .....                                            | 3  |
| Mikroorganizmi koji promoviraju rastenje biljaka .....                                 | 4  |
| Povećanje dostupnosti i usvajanja hranljivih materija.....                             | 5  |
| Sinteza i regulacija biljnih hormona.....                                              | 5  |
| Povećana tolerancija na nepovoljne uslove sredine .....                                | 6  |
| Zaštita biljke od patogenih mikroorganizama .....                                      | 6  |
| Biološka kontrola kao pristup zaštiti biljaka.....                                     | 7  |
| Pseudomonas syringae kao biljni patogen .....                                          | 8  |
| Odbrambeni mehanizmi biljaka prema bakterijskim patogenima .....                       | 8  |
| Urođeni imunski odgovor biljaka.....                                                   | 8  |
| Sistemska otpornost biljaka.....                                                       | 9  |
| Biohemijski odgovor biljaka tokom infekcije.....                                       | 10 |
| Molekularna regulacija odbrambenih odgovora biljaka .....                              | 12 |
| Signalni put salicilne kiseline .....                                                  | 12 |
| Signalni put jasmonske kiseline.....                                                   | 13 |
| Signalni put etilena.....                                                              | 14 |
| Signalni put abscisinske kiseline.....                                                 | 14 |
| Međusobna interakcija hormonskih signalnih puteva .....                                | 15 |
| CILJEVI.....                                                                           | 16 |
| MATERIJAL I METODE.....                                                                | 17 |
| Uzorkovanje biljnog materijala.....                                                    | 17 |
| Priprema uzorka za izolaciju bakterija.....                                            | 17 |
| Izbor i priprema hranljivih podloga za izolaciju bakterija iz biljnog mikrobioma ..... | 17 |
| Morfološke karakteristike kolonija .....                                               | 19 |
| Diferencijalno bojenje bakterija po Gramu.....                                         | 19 |
| Biohemijska karakterizacija bakterija .....                                            | 19 |
| Produkcija egzoenzima.....                                                             | 19 |
| Antimikrobna aktivnost .....                                                           | 20 |
| Antibakterijski potencijal bakterija .....                                             | 20 |
| Antifungalni potencijal bakterija .....                                                | 20 |
| Ispitivanje uticaja bakterija na klijavost semena.....                                 | 20 |
| Karakterizacija osobina povezanih sa promocijom rasta biljaka .....                    | 21 |
| Produkcija cijanovodonika.....                                                         | 21 |
| Solubilizacija fosfata .....                                                           | 21 |

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Sinteza egzopolisaharida.....                                                                                               | 21 |
| Produkcija siderofora.....                                                                                                  | 21 |
| Detekcija sinteze indol-3-sirćetne kiseline.....                                                                            | 22 |
| Ispitivanje sposobnosti fiksacije azota.....                                                                                | 22 |
| Merenje aktivnosti 1-aminociklopropan-1-karboksilat deaminaze preko koncentracije $\alpha$ -ketobutirata .....              | 23 |
| Testovi pokretljivosti.....                                                                                                 | 24 |
| Određivanje sposobnosti formiranja biofilma u mikrotitarskim pločama .....                                                  | 24 |
| Molekularne metode .....                                                                                                    | 25 |
| Izolacija genomske DNK za identifikaciju bakterijskih sojeva.....                                                           | 25 |
| Lančana reakcija polimeraze - PCR.....                                                                                      | 26 |
| Horizontalna elektroforeza ukupne DNK .....                                                                                 | 26 |
| Prečišćavanje PCR produkata i analiza sekvenci.....                                                                         | 26 |
| Izolacija ukupne DNK iz rizosfere i filofsfe za sekvenciranje nove generacije .....                                         | 27 |
| Sekvenciranje DNK i analiza podataka .....                                                                                  | 27 |
| Analiza diverziteta.....                                                                                                    | 27 |
| Ispitivanje biokontrolnog potencijala izabranih izolata .....                                                               | 28 |
| Selekcija biokontrolnih sojeva i provera međusobne antagonističke aktivnosti.....                                           | 28 |
| Određivanje krive rasta.....                                                                                                | 28 |
| Formiranje konzorcijuma.....                                                                                                | 28 |
| Utvrđivanje biokontrolnog potencijala izabranih sojeva na biljkama šećerne repe .....                                       | 28 |
| Priprema enzimskih ekstrakata i kvantifikacija proteina .....                                                               | 29 |
| Kvantifikacija vodonik peroksida u listovima šećerne repe.....                                                              | 29 |
| Određivanje aktivnosti ukupne peroksidaze i superoksid dismutaze .....                                                      | 30 |
| Analiza aktivnosti fenilalanin amonijum-lijaze .....                                                                        | 30 |
| Izolacija ukupne RNK iz biljnog materijala, tretman DNazom i reverzna transkripcija.....                                    | 30 |
| Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu - qPCR.....                                                   | 31 |
| Statistička obrada i analiza podataka .....                                                                                 | 31 |
| REZULTATI.....                                                                                                              | 32 |
| Izolacija i karakterizacija bakterija mikrobioma šećerne repe sa potencijalom za stimulaciju biljnog rastenja .....         | 32 |
| Analiza sezonske promene rizobioma i filobioma šećerne repe primenom metabarkodiranja <i>16S rRNA</i> gena.....             | 34 |
| Poređenje kultivaciono-zavisnog i kultivaciono-nezavisnog pristupa u detekciji bakterija sa PGP osobinama .....             | 39 |
| Odabir bakterijskih sojeva i formiranje konzorcijuma sa biokontrolnim potencijalom .....                                    | 44 |
| Uticaj pojedinačnih bakterijskih izolata i konzorcijuma na razvoj lezija u uslovima indirektno i direktne biokontrole ..... | 48 |
| Odgovor biljaka na biokontrolne tretmane kroz akumulaciju vodonik peroksida.....                                            | 49 |
| Uticaj biokontrolnih tretmana na aktivnost antioksidativnih enzima peroksidaze i superoksid-dismutaze .....                 | 50 |

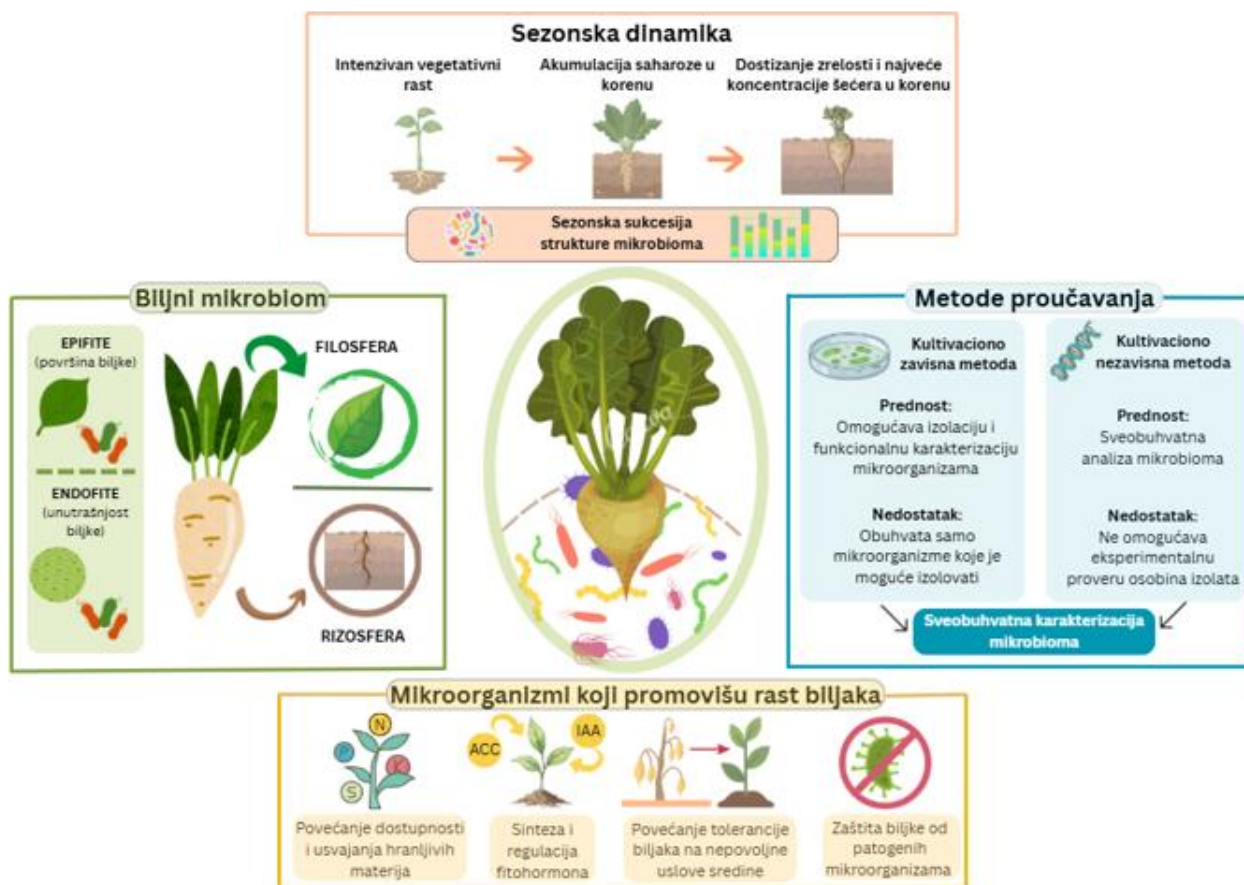
|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Uticaj biokontrolnih tretmana na aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze .....                        | 52 |
| Ekspresija gena povezanih sa odbrambenim odgovorom biljke nakon primene biokontrolnih tretmana..... | 54 |
| DISKUSIJA .....                                                                                     | 57 |
| ZAKLJUČCI.....                                                                                      | 67 |
| LITERATURA.....                                                                                     | 69 |
| PRILOZI.....                                                                                        | 82 |

# UVOD

## Šećerna repa (*Beta vulgaris* L.)

Šećerna repa (*Beta vulgaris* L.) predstavlja jednu od najznačajnijih industrijskih biljnih vrsta koje se gaje u područjima sa umerenom klimom. Potiče od divlje morske repe (*Beta maritima* L.), vrste prirodno rasprostranjene duž obala Mediterana i Atlantskog okeana, koja se smatra pretkom svih gajenih formi roda *Beta* (Wolfgang et al., 2023). Po obimu proizvodnje, šećerna repa se svrstava među najznačajnije ratarske kulture na globalnom nivou. Njen ekonomski značaj prvenstveno proizlazi iz visokog sadržaja saharoze u zadebljalom korenu, koji najčešće iznosi između 16 i 20 procenata sveže mase, što omogućava efikasnu industrijsku preradu (Draycott, 2006). Šećerna repa je dvogodišnja biljka, ali se gaji kao jednogodišnja. Tokom prve godine vegetacije šećerna repa prolazi kroz nekoliko jasno definisanih razvojnih faza koje karakterišu značajne morfološke i fiziološke promene (Slika 1). Nakon nicanja i formiranja početne lisne rozete, biljka ulazi u period intenzivnog vegetativnog rasta tokom kojeg dolazi do ubrzanog razvoja nadzemne biomase i korenovog sistema. Sredinom vegetacione sezone započinje intenzivna akumulacija rezervnih materija, pre svega saharoze, u zadebljalom korenu, dok se u završnim fazama razvoja povećava sadržaj šećera i dostiže zrelost biljke (Jammer et al., 2020). Nakon perioda izloženosti niskim temperaturama dolazi do prelaska u generativnu fazu razvoja, kada se tokom druge godine formiraju stablo, cvetovi i seme. U poljoprivrednoj proizvodnji biljke se beru na kraju prve vegetacione sezone, jer cvetanje i formiranje semena dovode do značajnog smanjenja sadržaja šećera u korenu, čime se umanjuje kvalitet dobijene sirovine (Dhiman et al., 2025; Wolfgang et al., 2023).

Evropska unija predstavlja jedan od vodećih regiona u proizvodnji šećerne repe na globalnom nivou. Prema podacima Eurostata, tokom 2024. godine proizvedeno 121,6 miliona tona šećerne repe na prostoru Evropske unije. Među vodećim proizvođačima bili su Nemačka, Francuska, Poljska i Holandija, koje su zajedno činile približno tri četvrtine ukupne proizvodnje šećerne repe u ovom regionu (Eurostat, 2025). Povoljni agroekološki uslovi omogućavaju uspešno gajenje šećerne repe i na području Srbije, gde ona predstavlja jednu od najznačajnijih industrijskih kultura. Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku, u Srbiji je tokom 2025. godine proizvedeno 1806349 tona šećerne repe, uz prosečan prinos od 52,5 t/ha, dok je ova kultura bila zastupljena na površini od 34382 ha (RZS, 2026). Ova vrsta može uspešno da se gaji na različitim tipovima zemljišta, naročito na zemljištima sa pH vrednošću bliskom neutralnoj, što doprinosi njenoj širokoj rasprostranjenosti (Subić et al., 2018). Pored toga, odlikuje se relativno visokim stepenom tolerancije prema promenama temperaturnih uslova, periodima ograničene dostupnosti vode i drugim abiotičkim stresnim faktorima, zbog čega se smatra pouzdanom kulturom za proizvodnju velike količine biomase i ostvarivanje stabilnih prinosa (Ikeda et al., 2023). Pored svog ekonomskog značaja, šećerna repa ima važnu ulogu i u konceptu održive poljoprivredne proizvodnje. Nusproizvodi nastali tokom prerade korena, poput repinih rezanaca, koriste se kao kvalitetna stočna hrana, dok se biljni ostaci mogu upotrebiti za obogaćivanje zemljišta organskom materijom ili za proizvodnju energije iz biomase (bioetanola i biogasa). Na taj način povećava se efikasnost iskorišćavanja biljnih resursa, smanjuje količina otpada i doprinosi primeni principa cirkularne ekonomije u savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji (Subić et al., 2018).



Slika 1. Prikaz organizacije i sezone dinamike mikrobioma šećerne repe, pristup njegovom proučavanju i uloge mikroorganizama koji su sastavni deo biljnog mikrobioma u promociji rastenja i zaštiti biljke od patogena

## Biljni mikrobiom

Biljke u prirodnim ekosistemima funkcionišu kao složeni biološki sistemi koji su u stalnoj interakciji sa raznovrsnim mikroorganizmima. Skup svih mikroorganizama koji naseljavaju biljno telo, uključujući bakterije, arhee, gljive, viruse i protiste, definiše se kao biljni mikrobiom. Ova zajednica pokazuje izraženu dinamičnost, pri čemu njen sastav i funkcionalni potencijal zavise od biljne vrste, genetičke osnove domaćina, fenološke faze razvoja i uslova spoljašnje sredine, uključujući biotičke i abiotičke stresore (Andreote & Pereira e Silva, 2017; Chen et al., 2024). Prostorna organizacija biljnog mikrobioma može se posmatrati kroz različite ekološke niše, među kojima se posebno izdvajaju rizosfera i filosfera (Slika 1). Rizosfera predstavlja zonu zemljišta pod direktnim uticajem korenovog sistema, gde se intenzivne razmene između biljke, mikroorganizama i zemljišta odvijaju posredstvom korenovih eksudata. Filosfera, nasuprot tome, obuhvata nadzemne biljne organe, listove, stabljike i reproduktivne strukture, koji su izloženi spoljašnjim atmosferskim uslovima (Dlamini et al., 2022).

Pored prostorne podeljenosti, mikroorganizmi povezani sa biljkama diferenciraju se i prema načinu interakcije sa domaćinom na epifitne i endofitne forme (Slika 1). Epifite kolonizuju površinu biljnih organa i formiraju zajednice koje su direktno izložene promenljivim abiotičkim uslovima sredine, dok endofite naseljavaju unutrašnja biljna tkiva, često bez izazivanja vidljivih simptoma kod biljaka, a poseduju i potencijal da pozitivno utiču na fiziološke funkcije biljke (Bacon & White, 2016; T. Gomes et al., 2018). Na osnovu ovako definisane prostorne i funkcionalne organizacije biljnog mikrobioma, postaje jasno da mikroorganizmi ne predstavljaju samo pasivne kolonizatore biljnih površina, već aktivne učesnike u složenim ekološkim i biohemijskim procesima. Njihove aktivnosti direktno oblikuju transformaciju i dostupnost hranljivih elemenata, čime se uspostavlja čvrsta funkcionalna povezanost između strukture mikrobioma i fiziološkog statusa biljke (Trivedi et al., 2020).

Rizosferna zona predstavlja jedno od najaktivnijih mikrobioloških staništa u zemljištu, u kojem se odvijaju intenzivne interakcije između biljke i mikroorganizama. Ključni pokretač ovih interakcija su korenovi eksudati i proces rizodepozicije, putem kojih biljke u okolno zemljište izlučuju širok spektar organskih jedinjenja, uključujući jednostavne šećere, aminokiseline, organske kiseline i sekundarne metabolite. Ove supstance oblikuju specifične mikrobijalne zajednice i utiču na njihovu strukturu i funkcionalnost, čime se uspostavljaju selektivne i dinamične veze između biljke i mikroorganizama (Dlamini et al., 2022; Niu et al., 2020). Filosfera predstavlja izrazito stresno okruženje u kojem su dostupnost hranljivih materija i vode ograničene, dok su organizmi izloženi UV zračenju, temperaturnim oscilacijama i oksidativnom stresu. Uprkos tome, ona je naseljena kompleksnom zajednicom mikroorganizama čija struktura zavisi od biljnog domaćina, geografskog porekla i sezonskih promena (C. He et al., 2023). Mikroorganizmi koji uspevaju da opstanu u ovim uslovima razvijaju različite adaptivne strategije, uključujući sintezu pigmenata, egzopolisaharida i biosurfaktanata, koji omogućavaju zaštitu od isušivanja i poboljšano prijanjanje na biljne površine (Bashir et al., 2022). Mikrobijalne zajednice u rizosferi i filosferi imaju centralnu ulogu u održavanju biljne produktivnosti i zdravstvenog statusa domaćina. Među njima se posebno izdvajaju bakterije koje promovišu rastenje biljaka (eng. **Plant Growth-Promoting**, PGP), kao i organizmi koji deluju kao agensi biološke kontrole (eng. **Biological Control Agents**, BCA). BCA mogu delovati direktno, kroz produkciju antimikrobnih jedinjenja i parazitiranje na patogenima, ili indirektno, putem kompeticije za resurse i indukcije odbrambenih mehanizama biljke (Niu et al., 2020; Valente et al., 2025). Pored ovih mehanizama, PGP mikroorganizmi doprinose rastenju biljaka i kroz povećanje dostupnosti hranljivih elemenata. U okviru sistema biljka-mikroorganizam, mikroorganizmi učestvuju u procesima fiksacije azota, mobilizacije fosfora i kalijuma, kao i u usvajanju gvožđa, čime direktno utiču na dostupnost hranljivih materija i rastenje biljaka (Ajeethan et al., 2026). U širem ekološkom kontekstu, ovakve višestruke funkcionalne uloge mikroorganizama ukazuju na to da se njihova interakcija sa biljkama ne može posmatrati izolovano, već kao deo jedinstvenog biološkog sistema. Savremeni koncept holobionta posmatra biljku i njene pridružene mikroorganizme kao integrisanu funkcionalnu celinu. Zato se mikrobiom prepoznaje kao ključni faktor u adaptaciji biljaka i njihovoj otpornosti, što ga čini značajnim elementom savremenih strategija održive poljoprivrede (Wolfgang et al., 2023).

Endofitne i epifitne zajednice, iako prostorno razdvojene, čine funkcionalno povezane komponente ukupnog biljnog mikrobioma. Endofite doprinose homeostazi domaćina kroz produkciju fitohormona, regulaciju oksidativnog stresa i povećanje tolerancije na abiotičke stresore, dok epifite pre svega učestvuju u zaštiti spoljašnjih biljnih struktura i interakcijama sa okruženjem. Na taj način endofitne i epifitne zajednice doprinose formiranju stabilnog i funkcionalnog biljnog mikrobioma (Brader et al., 2017; Hardoim et al., 2008).

## Metode proučavanja biljnog mikrobioma

Istraživanje biljnog mikrobioma obuhvata primenu različitih mikrobioloških kultivacionih metoda i molekularnih metoda nezavisnih od kultivacije mikroorganizama sa ciljem identifikacije, karakterizacije i funkcionalne analize mikroorganizama povezanih sa biljkama (Slika 1). Razvoj savremenih tehnika omogućio je značajno unapređenje razumevanja strukture, diverziteta i funkcionalnog značaja zajednica mikroorganizama koje naseljavaju rizosferu, filosferu i unutrašnja biljna tkiva (Compant et al., 2019). Tradicionalni pristupi zasnivaju se na izolaciji i kultivaciji mikroorganizama na različitim hranljivim podlogama i u različitim uslovima gajenja. Međutim, dugo je već poznato da standardne sintetičke podloge bogate nutrijentima ne odražavaju prirodne uslove koji vladaju u biljnom okruženju, zbog čega značajan deo mikroorganizama ostaje neuspešno kultivisan u laboratorijskim uslovima. Kao odgovor na ovaj problem razvijene su podloge zasnovane na biljnim ekstraktima, biljnim sokovima i homogenatima, koje bolje simuliraju nutritivne uslove prisutne u biljci i njenoj neposrednoj okolini (Shi et al., 2009). Pored sastava podloge, uspešnost izolacije može se unaprediti postupkom sterilizacije koji podrazumeva odvojenu sterilizaciju podloga i sredstva za očvršćavanje u kombinaciji sa produženim vremenom inkubacije (Kato et al., 2018),

izborom različitih sredstava za očvršćavanje podloga (agar ili fitagel) (Mourad et al., 2018), kao i dodatkom ekstrakta rizosfere ili filosfere (T. Nguyen et al., 2018). Ovakvi pristupi omogućili su izolaciju brojnih do tada nekultivisanih ili retko kultivisanih bakterijskih taksona.

Iako kultivacione metode imaju ključnu ulogu u proučavanju fizioloških i funkcionalnih osobina mikroorganizama, njihov glavni nedostatak jeste ograničena mogućnost detekcije ukupne raznovrsnosti mikroorganizama koji čine biljni mikrobiom. Zbog toga su poslednjih decenija razvijene metode nezavisne od kultivacije koje omogućavaju direktnu analizu genetičkog materijala izdvojenog iz uzoraka biljke ili zemljišta. Među njima se posebno izdvaja metabarkodiranje zasnovano na sekvenciranju gena za *16S rRNA*, koje predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda za analizu sastava bakterijskih zajednica. Ovaj pristup omogućava identifikaciju velikog broja mikroorganizama, uključujući i one koji se ne mogu kultivisati u laboratorijskim uslovima, pružajući detaljan uvid u strukturu i diverzitet biljnog mikrobioma. Ipak, metabarkodiranje ima i određena ograničenja. Varijabilan broj kopija gena *16S rRNA* kod različitih bakterijskih taksona može uticati na tačnost procene njihove relativne zastupljenosti, a taksonomska identifikacija često je ograničena na nivo roda. Pored toga, rezultati mogu zavistiti od izbora analiziranog hipervarijabilnog regiona i referentne baze podataka korišćene za taksonomsku anotaciju sekvenci (Francioli et al., 2021; Johnson et al., 2019).

Savremena istraživanja biljnog mikrobioma sve više se zasnivaju na kombinaciji kultivacionih i metoda koje ne zavise od kultivacije. Dok ove druge omogućavaju detaljnu analizu diverziteta mikrobni zajednica, kultivacija ostaje nezamenljiva za izolaciju mikroorganizama, eksperimentalnu potvrdu njihovih osobina i razvoj bioloških preparata za održivu poljoprivrednu proizvodnju.

## Mikroorganizmi koji promovišu rastenje biljaka

Mikroorganizmi koji kolonizuju biljke ostvaruju brojne funkcionalne aktivnosti koje imaju značajan uticaj na rastenje, razvoj i zdravstveno stanje biljke. Zahvaljujući različitim mehanizmima delovanja, oni učestvuju u poboljšanju ishrane biljaka, regulaciji fizioloških procesa i povećanju otpornosti na biotičke i abiotičke stresne faktore. Ove osobine se u literaturi najčešće označavaju kao karakteristike koje promovišu rastenje biljaka i predstavljaju jedan od najznačajnijih aspekata interakcije biljaka i njihovog mikrobioma.

Funkcije PGP mikroorganizama mogu se grupisati u nekoliko osnovnih kategorija (Slika 1):

- povećanje dostupnosti i usvajanja hranljivih materija,
- sinteza i regulacija biljnih hormona,
- povećanje tolerancije biljaka na nepovoljne uslove sredine,
- zaštita biljke od patogenih mikroorganizama (Bashir et al., 2022; Santoyo, 2022).

Pored primene pojedinačnih PGP mikroorganizama, poslednjih godina sve veću pažnju privlači upotreba konzorcijuma, koji predstavljaju kombinaciju dva ili više mikroorganizama. Polazi se od pretpostavke da jedan mikroorganizam retko poseduje sve mehanizme neophodne za efikasnu stimulaciju rastenja biljaka i zaštitu od različitih stresnih faktora, dok konzorcijumi mogu objediniti više korisnih PGP aktivnosti. Zahvaljujući međusobnim interakcijama članova konzorcijuma, uključujući razmenu metabolita, koordinaciju metaboličkih procesa i efikasnije korišćenje dostupnih resursa, moguće je ostvariti komplementarne ili sinergističke efekte koji doprinose uspešnjoj kolonizaciji rizosfere, većoj funkcionalnoj stabilnosti i efikasnijem promovisanju rastenja biljaka. Istovremeno, efikasnost mikrobni konzorcijuma u velikoj meri zavisi od kompatibilnosti mikroorganizama koji ga sačinjavaju njihovih članova, stabilnosti međusobnih interakcija i sposobnosti održavanja funkcionalne aktivnosti u rizosferi, pri čemu antagonistički odnosi između mikroorganizama mogu umanjiti očekivane pozitivne efekte. Zbog toga se razvoj mikrobijalnih konzorcijuma danas smatra jednim od najperspektivnijih pravaca u razvoju bioloških preparata za održivu poljoprivredu (Negi et al., 2024; A. Singh et al., 2023; Timofeeva et al., 2023).

## Povećanje dostupnosti i usvajanja hranljivih materija

Mikroorganizmi imaju značajnu ulogu u obezbeđivanju i povećanju usvajanja esencijalnih biogenih elemenata, pre svega azota, fosfora i gvožđa. Njihova aktivnost obuhvata različite biohemijske procese, uključujući fiksaciju atmosferskog azota, razgradnju organske materije i sintezu enzima koji omogućavaju mineralizaciju i transformaciju hranljivih materija u oblike pristupačne biljkama. Poseban značaj u ovom procesu imaju ekstracelularni enzimi koje mikroorganizmi oslobađaju u okolinu, a koji učestvuju u razgradnji kompleksnih organskih jedinjenja, poput celuloze, hemiceluloze, proteina i organskih fosfornih jedinjenja. Njihovom aktivnošću dolazi do oslobađanja mineralnih oblika hranljivih elemenata, čime se povećava njihova dostupnost biljkama i istovremeno ubrzava kruženje materije u rizosferi (Luo et al., 2017). S obzirom na to da biljke mogu usvajati fosfor isključivo u obliku ortofosfatnih jona ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  i  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), transformacije ovog elementa posredstvom mikroorganizama imaju poseban značaj za njegovu biološku dostupnost. Mikroorganizmi koji poseduju sposobnost solubilizacije fosfata omogućavaju oslobađanje fosfora mineralizacijom organskih jedinjenja i rastvaranjem teško rastvorljivih mineralnih formi, pri čemu se najveća efikasnost postiže u interakciji sa mikoriznim i drugim korisnim mikroorganizmima (Wolfgang et al., 2023).

Pored fosfora, gvožđe predstavlja jedan od ključnih mikroelemenata neophodnih za pravilno funkcionisanje brojnih fizioloških procesa u biljkama. U uslovima njegove ograničene dostupnosti, kako biljke tako i mikroorganizmi sintetišu siderofore, sekundarne metabolite niske molekulske mase koji poseduju izražen afinitet prema  $\text{Fe}^{3+}$  jonima. Siderofore omogućavaju mobilizaciju gvožđa iz slabo rastvorljivih jedinjenja, kao što su  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  i  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , čineći ga dostupnim za usvajanje. Osim gvožđa, ovi molekuli mogu vezivati i druge metalne jone, uključujući bakar, nikl i cink, što dodatno doprinosi adaptaciji mikroorganizama na nepovoljne uslove sredine i njihovom potencijalu u procesima bioremedijacije (Shah et al., 2021; Valente et al., 2025).

Pored direktnog uticaja na dostupnost hranljivih materija, mikroorganizmi rizosfere učestvuju u kompeticiji sa patogenima za ograničene resurse i istovremeno podstiču usvajanje mikroelemenata neophodnih za odvijanje metaboličkih procesa u biljci. Na taj način mikrobiom doprinosi očuvanju nutritivne ravnoteže i optimalnom funkcionisanju biljnog organizma, što se pozitivno odražava na vitalnost, rastenje i prinos biljaka (Petrović et al., 2024).

## Sinteza i regulacija biljnih hormona

Jedan od najznačajnijih mehanizama putem kojih mikroorganizmi stimulišu rastenje i razvoj biljaka jeste sinteza biljnih hormona. Na taj način mikroorganizmi predstavljaju dodatni, egzogeni izvor regulatora rasta, koji deluje uporedo sa endogenom produkcijom fitohormona u biljnim tkivima. Auksini, citokinini, giberelini, abscisinska kiselina i etilen učestvuju u regulaciji brojnih fizioloških i biohemijskih procesa, uključujući deobu i izduživanje ćelija, razvoj organa, kao i adaptaciju biljaka na različite uslove sredine (Glick, 2012).

Procenjuje se da veliki deo rizosfernih mikroorganizama poseduje sposobnost sinteze indol-3-sirćetne kiseline (eng. **I**ndole-3-**A**cetic **A**cid, IAA), fiziološki najaktivnijeg predstavnika grupe auksina, čija je uloga pre svega povezana sa razvojem korenovog sistema i izduživanjem ćelija. Značajan broj rizosfernih bakterija takođe proizvodi citokinine, koji regulišu procese deobe ćelija, razvoj listova, sintezu hlorofila i održavanje apikalne dominacije. Giberelini su uključeni u kontrolu klijanja semena, izduživanja stabla i razvoja plodova, a mogu ih sintetisati i bakterije i gljive. Posebnu ulogu u adaptaciji biljaka na stresne uslove ima abscisinska kiselina (eng. **A**Bscisic **A**cid, ABA), koja posreduje u odgovoru na sušu i povećanu koncentraciju soli, prvenstveno kroz regulaciju otvaranja i zatvaranja stoma. Nasuprot tome, povećana produkcija etilena često je povezana sa inhibicijom rasta i ubrzanim starenjem biljaka izloženih stresu. Međutim, brojni PGP mikroorganizmi poseduju enzim ACC (eng. 1-**A**minoCyclopropane-1-**C**arboxylate) deaminazu, koji razgrađuje

prekursor etilena i na taj način ublažava njegove negativne efekte na rastenje biljaka (Bashir et al., 2022; Valente et al., 2025; Z. Zhang et al., 2025).

Zahvaljujući navedenim mehanizmima, članovi biljnog mikrobioma aktivno učestvuju u održavanju hormonske ravnoteže biljke, što doprinosi intenzivnijem rastenju, boljem razvoju korenovog sistema i većoj otpornosti biljke na nepovoljne uslove sredine. Pored toga, sinteza biljnih hormona deluje komplementarno sa drugim PGP aktivnostima, poput mobilizacije hranljivih materija, omogućavajući efikasnije korišćenje dostupnih resursa i uspešniju adaptaciju biljke na promenljive uslove gajenja (Petrović et al., 2024; Z. Zhang et al., 2025).

### Povećana tolerancija na nepovoljne uslove sredine

Mikrobiom ima važnu ulogu u povećanju otpornosti biljke na različite abiotičke stresne faktore, kao što su nedostatak vode, povišen salinitet, ekstremne temperature i intenzivno ultraljubičasto zračenje. Mikroorganizmi prisutni u rizosferi stimulišu sintezu različitih osmoregulatornih jedinjenja, uključujući betain i rastvorljive šećere, koji omogućavaju očuvanje ćelijske homeostaze u uslovima vodnog deficita (Rslan et al., 2025). Istovremeno, oni učestvuju u održavanju jonske ravnoteže regulišući odnos  $K^+$  i  $Na^+$  jona, čime se smanjuju štetni efekti akumulacije natrijuma i obezbeđuje stabilnost membranskih i enzimskih sistema (Wolfgang et al., 2023).

Dodatni mehanizam zaštite predstavlja formiranje biofilma na površini korena, čime se poboljšava adhezija bakterija, modifikuju se mikrolokalni uslovi u rizosferi, povećava se otpornost biljke na nepovoljne uslove sredine i dostupnost mikroelemenata. U uslovima stresa izazvanim povećanim salinitetom, formiranje biofilma predstavlja važan adaptivni mehanizam, s obzirom na to da mikroorganizmi koji formiraju biofilm mogu menjati hemijske karakteristike neposrednog okruženja korena i tako smanjiti nepovoljne efekte povećane koncentracije soli. Ovi procesi omogućavaju održavanje stabilnog rasta i produktivnosti čak i u uslovima izraženog stresa (Petrović et al., 2024; Rslan et al., 2025).

Za razliku od rizosfernih mikroorganizama, mikroorganizmi filofere izloženi su direktnom delovanju atmosferskih faktora, usled čega su razvili specifične adaptivne mehanizme. Sintezom ekstracelularnih polisaharida omogućavaju formiranje zaštitnih agregata koji ublažavaju posledice dehidracije, povišenih temperatura i osmotskog stresa. Istovremeno, proizvode fitohormone i osmoprotektivne supstance, poput prolina, glicin-betaina, holina i rastvorljivih šećera, koje dodatno povećavaju sposobnost biljke da se izbori sa nepovoljnim uslovima. Jedan od najznačajnijih stresnih faktora u filosferi predstavlja ultraljubičasto zračenje, koje dovodi do formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i oštećenja genetičkog materijala. Pojedini mikroorganizmi sposobni su da sintetišu zaštitne pigmente i aktiviraju antioksidativne enzime, kao što su katalaza i superoksid dismutaza, čime se značajno ublažavaju negativni efekti UV zračenja (Bashir et al., 2022).

### Zaštita biljke od patogenih mikroorganizama

Mikrobiom biljaka predstavlja važnu komponentu prirodnog sistema odbrane od biljnih patogenih mikroorganizama. U savremenoj poljoprivredi sve veća pažnja usmerena je ka razvoju održivih metoda zaštite useva, prvenstveno zbog potrebe za smanjenjem primene hemijskih sredstava za zaštitu biljaka, koja imaju negativne posledice po životnu sredinu i zdravlje ljudi. U tom kontekstu, značajan potencijal pokazuju mikroorganizmi koji ispoljavaju antagonističko delovanje prema patogenima i koriste se kao agensi biološke kontrole. Istraživanja ukazuju da kombinacija više kompatibilnih sojeva, poznata kao konzorcijum za upotrebu u biološkoj kontroli često ostvaruje veći nivo zaštite biljaka u poređenju sa primenom pojedinačnih sojeva, zahvaljujući komplementarnom delovanju različitih mehanizama biološke kontrole (Niu et al., 2020; Noorani et al., 2025).

## Biološka kontrola kao pristup zaštiti biljaka

Biološka kontrola je način zaštite biljaka u kojem se koriste živi organizmi ili njihovi produkti kako bi se smanjio razvoj i štetno delovanje biljnih patogena. U okviru ovog pristupa posebno mesto zauzimaju mikroorganizmi koji mogu da deluju kao agensi biološke kontrole, uključujući bakterije, gljive i druge korisne mikroorganizme. Njihova primena predstavlja jednu od mogućnosti za razvoj održivih strategija zaštite biljaka i smanjenje zavisnosti od konvencionalnih hemijskih sredstava za zaštitu biljaka (El-Saadony et al., 2022). Efikasnost biološke kontrole zavisi od sposobnosti biokontrolnog agensa da uspostavi odgovarajuću interakciju sa biljkom, patogenom i mikrobiološkim okruženjem, zbog čega izbor odgovarajućeg soja, uslovi sredine i način primene imaju značajan uticaj na konačan efekat biološke zaštite (Köhl et al., 2019).

U zavisnosti od načina na koji ostvaruju zaštitni efekat, delovanje biokontrolnih mikroorganizama može se posmatrati kroz direktne i indirektne mehanizme biološke kontrole. Direktna biološka kontrola podrazumeva neposredno delovanje biokontrolnog agensa na patogene, pri čemu se njegov rastenje, razvoj ili sposobnost kolonizacije biljke ograničavaju direktnom interakcijom između mikroorganizma i patogena. Jedan od važnih mehanizama jeste antibioza, koja se ostvaruje produkcijom različitih antimikrobnih jedinjenja, uključujući antibiotike, bakteriocine, lipopeptide, biosurfaktante i druge sekundarne metabolite. Pored toga, direktno suzbijanje patogena može biti posledica produkcije hidrolitičkih enzima koji razgrađuju komponente ćelijskog zida patogena. Kod pojedinih biokontrolnih mikroorganizama moguća je i direktna interakcija sa patogenom u vidu parazitizma ili hiperparazitizma. Parazitizam je direktna interakcija između dva organizma u kojoj jedan organizam dobija hranljive materije od drugog. Ako je organizam koji služi kao domaćin takođe parazit, na primer biljni patogen, takva interakcija se naziva hiperparazitizam (Dlamini et al., 2022; Köhl et al., 2019; Maake & Sibisi, 2025; Noorani et al., 2025). Indirektni antagonizam ne podrazumeva direktno uništavanje patogena, već stvaranje uslova koji ograničavaju njegovu sposobnost kolonizacije i razvoja i ne zahteva neposrednu interakciju između biokontrolnog agensa i patogena. Jedan od takvih mehanizama je kompeticija za prostor i hranljive materije, pri čemu PGP mikroorganizmi zauzimaju ekološke niše i troše raspoložive resurse, smanjujući mogućnost uspostavljanja zajednice patogena u biljnom okruženju. Osim toga, određeni mikroorganizmi koji promovišu rastenje biljaka mogu doprineti zaštiti domaćina aktiviranjem njegovih odbrambenih mehanizama. Jedan od najznačajnijih procesa ovog tipa jeste indukovana sistemska otpornost (eng. **Induced Systemic Resistance – ISR**), kojom se biljka dovodi u stanje pojačane pripravnosti za odgovor na buduće napade patogena. Aktivacija ISR podrazumeva složene biohemijske i molekularne promene, uključujući regulaciju ekspresije gena povezanih sa odbranom biljaka, pri čemu ključnu ulogu imaju signalni putevi biljnih hormona i različiti regulatorni proteini uključeni u odbrambene reakcije (Backer et al., 2018; Dlamini et al., 2022; Mauch-Mani et al., 2017).

Direktni i indirektni mehanizmi biološke kontrole nisu međusobno isključivi, već jedan biokontrolni mikroorganizam može istovremeno koristiti više mehanizama, čiji se efekti međusobno dopunjuju. Zbog složenosti interakcija između biljke, patogena i biokontrolnog agensa, efikasnost biološke kontrole često predstavlja rezultat kombinovanog delovanja više procesa, a ne samo jednog mehanizma. Razumevanje ovih mehanizama značajno je za izbor i karakterizaciju potencijalnih biokontrolnih agenasa, kao i za razvoj odgovarajućih formulacija i načina njihove primene (Köhl et al., 2019).

U savremenim pristupima biološkoj kontroli sve veća pažnja posvećuje se i primeni kombinacija više kompatibilnih mikroorganizama, odnosno mikrobijalnih konzorcijuma. Za razliku od pojedinačnih sojeva, konzorcijumi mogu objediniti različite osobine i mehanizme delovanja njihovih članova, čime se potencijalno postiže stabilniji i efikasniji efekat biološke kontrole. Interakcije između članova konzorcijuma mogu doprineti boljoj kolonizaciji biljke ili rizosfere, povećanju kompetitivnosti prema patogenima i efikasnijem suzbijanju bolesti. Zbog toga se **Multi-Strain Biological Control Agents** razmatraju kao jedan od perspektivnih pristupa unapređenju efikasnosti biološke kontrole, posebno u

uslovima složenih interakcija koje karakterišu biljni mikrobiom i zemljišni ekosistem (Niu et al., 2020).

## Pseudomonas syringae kao biljni patogen

*Pseudomonas syringae* predstavlja jedan od najznačajnijih i najrasprostranjenijih biljnih patogena. Ova Gram-negativna, aerobna, pokretna bakterija sa polarnom flagelom, odlikuje se izraženom ekološkom prilagodljivošću, što joj omogućava opstanak na površini biljaka kao epifita, ali i kolonizaciju biljnih tkiva nakon ostvarivanja infekcije (Hirano & Upper, 2000). Do danas je opisan veliki broj patovara koji zajedno inficiraju preko 500 biljnih vrsta, uključujući brojne ratarske, povrtarske, voćarske i ukrasne kulture, zbog čega *P. syringae* ima veliki ekonomski značaj u poljoprivrednoj proizvodnji (López-Pagán et al., 2025; Morris et al., 2013). Patogenost vrste *P. syringae* zasniva se na složenoj interakciji sa biljkom domaćinom. Bakterija najčešće dospeva na biljku putem kiše, vode za navodnjavanje, aerosola ili zaraženog semena, nakon čega kolonizuje površinu lista i ostvaruje ulazak u biljno tkivo kroz prirodne otvore, poput stoma, ili kroz mehaničke povrede (Xin et al., 2018). Jedan od najvažnijih faktora virulentnosti predstavlja sekretorni sistem tip III (eng. Type III Secretion System, T3SS), kojim bakterija direktno unosi efektorne proteine u citoplazmu biljnih ćelija, pri čemu oni inhibiraju odbrambene mehanizme domaćina. Time se omogućava uspešna kolonizacija i razvoj bolesti (López-Pagán et al., 2025). Pored toga, pojedini patovari proizvode biljne toksine, formiraju biofilm, produkuju siderofore dok regulatorni mehanizmi, uključujući transkripcione faktore i signalne molekule, kontrolišu ekspresiju gena virulentnosti i omogućavaju adaptaciju bakterije različitim uslovima spoljašnje sredine i uspešan razvoj bolesti (J. Huang et al., 2022).

*Pseudomonas syringae* pv. *aptata* pripada kompleksu vrste *P. syringae* i predstavlja specijalizovani patovar prilagođen infekciji biljaka iz roda *Beta*, prvenstveno šećerne repe (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* convar. *vulgaris* var. *altissima*). Pored šećerne repe, može inficirati i druge domaćine, uključujući cveklu (*B. vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*), blitvu (*B. vulgaris* subsp. *cicla*), kao i pojedine biljne vrste iz drugih rodova poput dinje (*Cucumis melo* var. *cantalupo*). Ovo ukazuje na relativno širok spektar domaćina u poređenju sa drugim patovarima, što može doprineti njegovoj širokoj rasprostranjenosti. Populacije *P. syringae* pv. *aptata* pokazuju izraženu genetičku raznovrsnost, koja može uticati na virulentnost izolata, njihovu sposobnost adaptacije različitim uslovima sredine i dinamiku širenja bolesti (Nikolić et al., 2018). *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* je uzročnik lisne pegavosti šećerne repe. Bolest se manifestuje pojavom sitnih tačaka na listu, koje odlikuje svetlo smeđi centar i obod crne boje. Ove zone se vremenom mogu spajati i dovesti do prevremenog sušenja lisne mase. Razvoju bolesti pogoduju vlažni vremenski uslovi, česte padavine i umerene temperature, koje omogućavaju efikasno širenje bakterije i infekciju biljaka, pri čemu dolazi do značajnog smanjenja fotosintetske površine, što negativno utiče na prinos i kvalitet korena (Nikolić et al., 2023).

## Odbrambeni mehanizmi biljaka prema bakterijskim patogenima

### Urođeni imunski odgovor biljaka

Biljke su tokom evolucije razvile složen i višeslojan sistem odbrane koji im omogućava da prepoznaju prisustvo patogena i efikasno ograniče njihovu kolonizaciju. Ishod interakcije između biljke i patogena zavisi od sposobnosti biljke da pravovremeno prepozna prisustvo patogena i aktivira odgovarajuće signalne puteve koji dovode do odbrambenog odgovora (Ali et al., 2024; Jones & Dangl, 2006). Prvu liniju odbrane predstavljaju fizičke i hemijske barijere koje sprečavaju ulazak mikroorganizama u biljno tkivo. U njih se ubrajaju voštani sloj kutikule, kutikularni lipidi, ćelijski zid, kao i brojna antimikrobna jedinjenja i sekundarni metaboliti koji otežavaju uspostavljanje infekcije (Ali et al., 2024; Movahedi et al., 2022). Međutim, brojni biljni patogeni razvili su mehanizme kojima prevazilaze ove prepreke, zbog čega biljke aktiviraju indukovane odbrambene

reakcije zasnovane na prepoznavanju molekula karakterističnih za patogene ili njihovih efektornih proteina (Ngou et al., 2022a; X. Q. Yu et al., 2024).

Koncept biljnog imuniteta dugo je objašnjavao „cik-cak“ modelom koji su predložili Jones & Dangl (2006), a koji opisuje dinamičnu evolutivnu interakciju između biljke i patogena. Ovaj model prikazuje uzastopne faze prepoznavanja patogena i njegovih efektor, kao i pokušaje patogena da suzbije biljni imunski odgovor. Prema ovom modelu, prvi nivo odbrane aktivira se prepoznavanjem konzerviranih molekularnih obrazaca karakterističnih za mikroorganizme, čime se pokreće imunitet izazvan obrascima (eng. **Pattern-Triggered Immunity**, PTI). Kao odgovor na ovaj odbrambeni mehanizam, patogeni luče efektorne proteine kojima teže da suzbiju imunski odgovor biljke i omoguće uspešnu kolonizaciju domaćina. Biljke, međutim, poseduju intracelularne receptore koji prepoznaju pojedine efekte i aktiviraju snažniji oblik odbrane, poznat kao imunitet izazvan efektorima (eng. **Effector-Triggered Immunity**, ETI). Iako su PTI i ETI prvobitno smatrani funkcionalno odvojenim granama biljnog imuniteta, novija istraživanja ukazuju da ne predstavljaju potpuno odvojene mehanizme, već međusobno povezane komponente jedinstvenog imunskog sistema biljaka koje kroz koordinisano delovanje obezbeđuju efikasnu zaštitu od širokog spektra patogena (Ngou, et al., 2022b).

Imunitet izazvan obrascima predstavlja prvi indukovani nivo biljne odbrane koji se aktivira nakon prepoznavanja konzerviranih molekularnih obrazaca povezanih sa mikroorganizmima ili endogenih signala oštećenja putem receptora lokalizovanih na ćelijskoj membrani, poznatih kao receptori za prepoznavanje obrazaca. Ovi receptori, koji uključuju receptore slične kinazama i receptore slične proteinima, omogućavaju brzo detektovanje prisustva potencijalnog patogena i pokretanje niza signalnih događaja koji uključuju aktivaciju MAP kinaza, porast intracelularnog  $Ca^{2+}$ , produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i transkripciono reprogramiranje, odnosno promene u ekspresiji gena uključenih u odbrambeni odgovor biljke. Kao rezultat ovih procesa dolazi do jačanja ćelijskog zida, akumulacije antimikrobnih jedinjenja i uspostavljanja lokalnog odbrambenog stanja koje ograničava dalju kolonizaciju patogena (Hou et al., 2019; Nabi et al., 2024; Ngou et al., 2022b; X. Q. Yu et al., 2024).

Imunitet izazvan efektorima (ETI) predstavlja drugi, specifičniji nivo biljne odbrane koji se aktivira kada intracelularni receptori iz klase NLR (eng. **Nucleotide-binding Leucine-rich repeat Receptors**) prepoznaju prisustvo efektornih proteina koje patogen unosi u biljne ćelije radi suzbijanja PTI odgovora. ETI se obično karakteriše intenzivnijom aktivacijom odbrambenih signalnih puteva u poređenju sa PTI, što uključuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, akumulaciju antimikrobnih jedinjenja i aktivaciju različitih signalnih molekula, uključujući salicilnu kiselinu, koji posreduju u daljoj modulaciji imunskog odgovora. U mnogim slučajevima ETI je praćen i lokalizovanom programiranom ćelijskom smrću poznatom kao hipersenzitivna reakcija. Na taj način se ograničava dalje širenje patogena i doprinosi uspostavljanju dugotrajnije otpornosti biljke (Islam et al., 2024; Nabi et al., 2024; Yuan et al., 2021).

## Sistemska otpornost biljaka

Pored lokalnih odbrambenih reakcija koje se aktiviraju na mestu infekcije, biljke su sposobne da razviju i sistemski odbrambeni odgovor, koji dovodi do povećane otpornosti udaljenih, nezahvaćenih delova biljke. Ovaj fenomen, poznat kao sistemska otpornost biljaka, predstavlja važan nivo odbrane kojim se biljka dovodi u stanje povećane pripravnosti, omogućavajući brži i efikasniji odgovor na naknadni napad patogena. U zavisnosti od mikroorganizma koji pokreće sistemski odbrambeni odgovor, razlikuju se dva osnovna oblika sistemske otpornosti. Sistemska stečena otpornost (eng. **Systemic Acquired Resistance SAR**) indukuje se nakon infekcije patogenim mikroorganizmima, dok se indukovana sistemska otpornost (eng. **Induced Systemic Resistance, ISR**) uspostavlja kao posledica interakcije biljke sa korisnim, nepatogenim mikroorganizmima. Iako se razlikuju prema načinu aktivacije i signalnim putevima, oba mehanizma doprinose uspostavljanju povećane otpornosti biljke prema širokom spektru patogena (Pieterse et al., 2014; Vlot et al., 2021).

Aktivacija sistemske stečene otpornosti zasniva se prvenstveno na akumulaciji salicilne kiseline, koja predstavlja centralni signalni molekul u uspostavljanju i održavanju ovog oblika odbrane. Kao odgovor na lokalnu infekciju, signal se prenosi u udaljena, neinficirana tkiva, gde dolazi do transkripcione aktivacije brojnih odbrambenih gena i uspostavljanja dugotrajnog stanja povećane otpornosti. Jedno od karakterističnih obeležja SAR jeste indukcija sinteze proteina povezanih sa patogeneom, koji doprinose ograničavanju razvoja patogena. Pored salicilne kiseline, novija istraživanja ukazuju da u regulaciji i održavanju SAR značajnu ulogu imaju i pipekolna kiselina i njen bioaktivni derivat N-hidroksipipekolna kiselina, koji učestvuju u sistemskom prenosu odbrambenih signala i pojačavanju imunskog odgovora (Durrant & Dong, 2004; Vlot et al., 2021).

Pored sistemske stečene otpornosti, biljke razvijaju i ISR, koja se uspostavlja nakon interakcije korenovog sistema sa korisnim mikroorganizmima iz rizosfere. Za razliku od SAR, koja se aktivira nakon lokalne infekcije patogenom, ISR nastaje kao posledica kolonizacije korena nepatogenim ili mutualističkim mikroorganizmima i predstavlja važan mehanizam kojim se povećava sposobnost biljke da se efikasnije odbrani od naknadnog napada patogena. Ovaj fenomen prvi put je opisan početkom devedesetih godina prošlog veka, kada je pokazano da inokulacija korena nepatogenim sojevima roda *Pseudomonas* može sistemski povećati otpornost biljaka prema različitim biljnim patogenima. Kasnija istraživanja potvrdila su postojanje ISR kod velikog broja biljnih vrsta, kao i značajnu ulogu različitih korisnih mikroorganizama u njegovom uspostavljanju (Pieterse et al., 2014; Vlot et al., 2021). U okviru ovog procesa može doći do uspostavljanja stanja pripremljenosti (eng. priming), koje podrazumeva povećanu spremnost biljke da nakon naknadnog izlaganja patogenu aktivira snažnije odbrambene odgovore. Ovakav način regulacije predstavlja resursno efikasan oblik otpornosti, koji omogućava biljci da uskladi ulaganje u odbranu sa rastenjem i razvojem (Vlot et al., 2021; Pieterse et al., 2014).

Najznačajniji mikroorganizmi koji pokreću ISR obuhvataju bakterije rizosfere, među kojima se posebno izdvajaju rodovi *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* i *Azospirillum*, kao i gljive koje podstiču rastenje biljaka, prvenstveno rod *Trichoderma*. Pored stimulacije rastenja i razvoja biljaka, ovi korisni mikroorganizmi povećavaju otpornost domaćina prema širokom spektru biotrofnih, hemibiotrofnih i nekrotrofnih fitopatogena, uključujući gljive, bakterije i viruse, a kod pojedinih biljnih vrsta doprinose i povećanoj otpornosti prema nematodama i insektima, kao i većoj toleranciji na abiotičke stresove (Charpe et al., 2025; Y. Yu et al., 2022).

Iako se SAR i ISR razlikuju po načinu aktivacije i regulatornim mehanizmima, oba oblika sistemske otpornosti predstavljaju komplementarne komponente biljnog imunskog sistema. Njihovim istovremenim delovanjem ostvaruje se efikasnija i dugotrajnija zaštita biljaka od različitih biotičkih i abiotičkih stresnih faktora, što ukazuje na njihov značaj u očuvanju zdravstvenog stanja biljaka i razvoju savremenih strategija biološke zaštite (Vlot et al., 2021).

## Biohemijski odgovor biljaka tokom infekcije

Tokom izlaganja biotičkom ili abiotičkom stresu, biljke aktiviraju kompleksne biohemijske mehanizme koji omogućavaju prepoznavanje signala stresa i pokretanje odbrambenih odgovora. Jedan od najranijih odgovora biljnih ćelija na prisustvo stresa jeste produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. **R**eactive **O**xxygen **S**pecies, ROS), uključujući superoksidni anjon, hidroksilni radikal i vodonik peroksid. Ovaj proces, poznat kao oksidativni prasak, predstavlja ključni deo inicijalne odbrambene reakcije biljke. ROS molekuli imaju dvostruku ulogu u biljkama. Sa jedne strane, oni deluju kao signalni molekuli koje učestvuju u regulaciji različitih fizioloških procesa, uključujući aktivaciju odbrambenih mehanizama, programiranu ćelijsku smrt i zatvaranje stoma. Sa druge strane, njihova prekomerna akumulacija može dovesti do oksidativnog stresa i oštećenja ćelijskih struktura, uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline. Zbog toga je njihova koncentracija strogo regulisana kroz antioksidativni sistem biljke (Ali et al., 2024; Charpe et al., 2025; Y. Yu et al., 2022).

Među reaktivnim kiseoničnim vrstama, vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) zauzima posebno mesto zbog svoje relativne stabilnosti, odsustva nesparenih elektrona i umerenog reaktivnog potencijala u poređenju sa drugim ROS molekulima. Za razliku od visoko reaktivnih radikala,  $H_2O_2$  pokazuje duži poluživot i sposobnost difuzije kroz ćelijske membrane, kao i kretanje na veće unutarćelijske i međućelijske udaljenosti. Zahvaljujući navedenim osobinama,  $H_2O_2$  ima ulogu u prenosu signala stresa i učestvuje u regulaciji brojnih fizioloških procesa u biljkama, uključujući rastenje, metabolizam i adaptivne odgovore na biotičke i abiotičke stresne uslove. Pored signalne uloge,  $H_2O_2$  ima i izraženu funkcionalnu ulogu u odbrani biljaka, gde doprinosi jačanju ćelijskog zida, indukciji odbrambenih gena i uspostavljanju hipersenzitivnog odgovora, čime ograničava širenje patogena u inficiranom tkivu. Na taj način,  $H_2O_2$  učestvuje u formiranju lokalizovanih odbrambenih barijera i omogućava brzo aktiviranje zaštitnih mehanizama u okolnim, neinficiranim ćelijama. Međutim, uprkos svojoj važnoj funkciji,  $H_2O_2$  predstavlja i potencijalno toksičan molekul. Pri povišenim koncentracijama, naročito tokom oksidativnog stresa, može dovesti do oksidativnog oštećenja ključnih biomolekula, uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline, što može narušiti integritet ćelijskih struktura i negativno uticati na procese poput klijanja i rasta biljaka. Zbog toga je njegova koncentracija u ćeliji strogo regulisana kroz balans između produkcije i uklanjanja, kako bi se očuvala redoks homeostaza i omogućilo njegovo delovanje kao signalnog, ali ne i štetnog molekula (Anjum et al., 2022; Fatima et al., 2023).

Kontrola nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta u biljnoj ćeliji ostvaruje se delovanjem kompleksnog antioksidativnog sistema. Ovaj sistem omogućava preciznu regulaciju koncentracije ROS, sprečavajući njihovu akumulaciju do nivoa koji može izazvati oksidativna oštećenja, ali istovremeno omogućavajući njihovo učešće u signalnim procesima. Među enzimskim komponentama antioksidativnog sistema posebno su značajni superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaze, koji deluju komplementarno u uklanjanju ROS. Superoksid dismutaza predstavlja prvu liniju odbrane, jer katalizuje dismutaciju superoksidnog anjona ( $O_2^-$ ) u vodonik peroksid i molekulski kiseonik. Ova reakcija je od ključnog značaja, s obzirom na to da je superoksidni anjon visoko reaktivan i sposoban da izazove direktna oštećenja proteinskih kompleksa, posebno onih koji sadrže gvožđe i sumpor, kao i da pokrene lančane reakcije stvaranja drugih ROS. Nastali  $H_2O_2$  predstavlja centralni intermedijer u redoks metabolizmu biljke, pri čemu katalaza i peroksidaze imaju ključnu ulogu u njegovoj razgradnji. Katalaza katalizuje direktnu konverziju dva molekula  $H_2O_2$  u vodu i kiseonik, pri čemu predstavlja visoko efikasan sistem detoksikacije u uslovima povećane akumulacije ROS, posebno u peroksizomima gde nastaju velike količine vodonik peroksida tokom fotorespiracije i drugih oksidativnih procesa. Peroksidaze, za razliku od katalaze, koriste  $H_2O_2$  kao oksidacioni supstrat u različitim reakcijama, čime omogućavaju njegovu kontrolisanu upotrebu u ćeliji. Pored navedene funkcije, peroksidaze imaju i važnu strukturnu ulogu u biljnim odbrambenim reakcijama, jer učestvuju u procesima jačanja ćelijskog zida, uključujući lignifikaciju, formiranje veza između fenolnih jedinjenja i učvršćivanje vanćelijskog matriksa. Ovi procesi dovode do povećanja mehaničke otpornosti tkiva i predstavljaju važnu fizičku barijeru protiv prodora patogena (Cannea & Padiglia, 2025; Haider et al., 2026; Y. Yu et al., 2022).

Pored ROS metabolizma, važan deo biohemijskog odgovora biljaka predstavlja fenilpropanoidni put, kao jedan od najvažnijih sekundarnih metaboličkih puteva u biljkama, koji povezuje primarni metabolizam sa biosintezom brojnih jedinjenja uključenih u rastenje, razvoj i odbrambene odgovore. Ključni i početni korak ovog puta katalizuje enzim fenilalanin amonijum-lijaza (eng. Phenylalanine Ammonia-Lyase, PAL), koji omogućava deaminaciju L-fenilalanina i predstavlja ulaznu tačku za preusmeravanje toka ugljenika ka sintezi sekundarnih metabolita. PAL zauzima centralno mesto u regulaciji fenilpropanoidnog metabolizma, jer kontroliše biosintezu različitih fenolnih jedinjenja, uključujući flavonoide, lignin i fitoaleksine, koji imaju ključnu ulogu u adaptaciji biljaka na stresne uslove. Ovi metaboliti doprinose jačanju strukturnih barijera, neutralizaciji reaktivnih kiseoničnih vrsta i inhibiciji razvoja patogena, čime PAL indirektno učestvuje u povećanju otpornosti biljaka prema širokom spektru biotičkih i abiotičkih stresova (Ninkuu et al., 2025; X. Wu et al., 2025).

## Molekularna regulacija odbrambenih odgovora biljaka

Aktivacija urođenog imunskog odgovora biljaka nakon prepoznavanja patogena pokreće složenu mrežu signalnih puteva koji omogućavaju koordinisanu regulaciju odbrambenih reakcija na molekularnom nivou. Iako su PTI i ETI ključni za inicijalno prepoznavanje patogena i aktivaciju imunskog odgovora, efikasnost odbrane u velikoj meri zavisi od precizne regulacije ekspresije gena uključenih u sintezu odbrambenih proteina, sekundarnih metabolita i signalnih molekula. Ovaj proces podrazumeva transkripciono i metaboličko reprogramiranje ćelije, kojim se usklađuju različiti fiziološki procesi neophodni za ograničavanje razvoja patogena, uključujući produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, aktivaciju antioksidativnog sistema, biosintezu fenolnih jedinjenja i jačanje ćelijskog zida. Istovremeno, aktivacija odbrambenih mehanizama zahteva značajne fiziološke i metaboličke promene, uključujući preraspodelu resursa, regulaciju ćelijske smrti i modifikaciju rastenja i razvoja biljke. Zbog toga je precizna koordinacija hormonskih signalnih puteva od suštinskog značaja za održavanje ravnoteže između odbrane i normalno uspostavljenih životnih procesa (Ali et al., 2024; Movahedi et al., 2022).

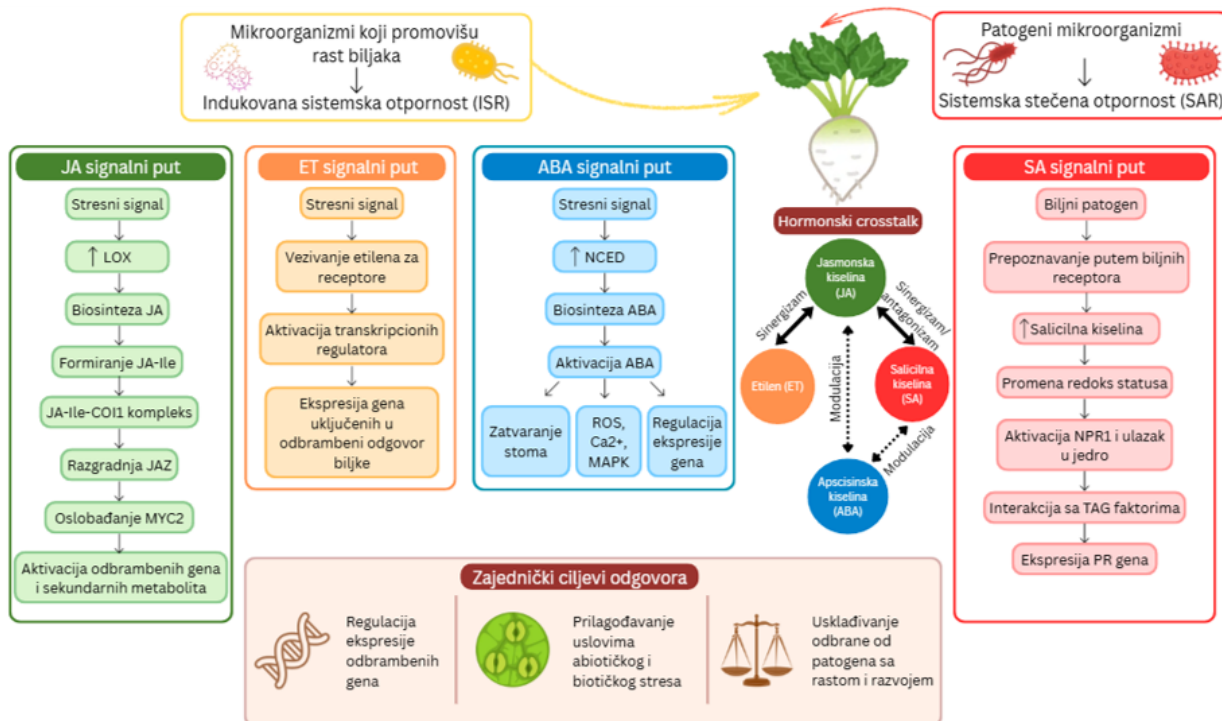
Centralnu ulogu u regulaciji ovih procesa imaju biljni hormoni, koji deluju kao signalni molekuli odgovorni za prenos informacija nastalih nakon interakcije biljke sa mikroorganizmima. Promene u njihovoj biosintezi i signalizaciji omogućavaju brzo prilagođavanje transkripcionog odgovora u skladu sa prirodom interakcije i intenzitetom stresa. Salicilna kiselina, jasmonska kiselina i etilen smatraju se glavnim regulatorima odbrambenih reakcija prema biljnim patogenim mikroorganizmima, dok se abscisinska kiselina, iako tradicionalno povezana sa odgovorom na abiotičke stresove, danas prepoznaje kao značajan regulator biljnog imuniteta. Pored aktivacije lokalnih odbrambenih reakcija, hormonska signalizacija učestvuje u uspostavljanju sistemske otpornosti, regulaciji programirane ćelijske smrti, preraspodeli metaboličkih resursa i prilagođavanju razvoja biljke uslovima infekcije. Brojna istraživanja pokazala su da korisni mikroorganizmi koji podstiču rastenje biljaka mogu da aktiviraju hormonske signalne puteve i izazovu transkripciono reprogramiranje povezano sa indukovanom sistemskom otpornošću. Uspostavljanje ovog oblika otpornosti najčešće uključuje signalizaciju posredovanu jasmonskom kiselinom i etilenom, dok u zavisnosti od biljne vrste, korisnog mikroorganizma i tipa interakcije može biti uključena i salicilna kiselina. Nasuprot tome, brojni biljni patogeni razvili su efektorne molekule kojima manipulišu hormonskom signalizacijom domaćina, čime narušavaju efikasnost imunskog odgovora i stvaraju uslove pogodne za uspešnu kolonizaciju biljnih tkiva (Ali et al., 2024; Salwan et al., 2023).

### Signalni put salicilne kiseline

Salicilna kiselina predstavlja jedan od najznačajnijih signalnih molekula uključenih u regulaciju odbrambenih odgovora biljaka prema biotrofnim i hemibiotrofnim patogenima. Nakon prepoznavanja patogena dolazi do povećanja koncentracije salicilne kiseline u inficiranim tkivima, čime se pokreće aktivacija brojnih odbrambenih gena odgovornih za ograničavanje razvoja patogena. Pored lokalnog imunskog odgovora, akumulacija salicilne kiseline ima ključnu ulogu u uspostavljanju sistemske stečene otpornosti, omogućavajući razvoj dugotrajnog odbrambenog stanja u udaljenim, neinficiranim delovima biljke. U biljkama se salicilna kiselina sintetise iz horizmata putem dva alternativna biosintetska puta. Dominantan put kod većine biljnih vrsta odvija se preko izohorizmat sintaze, lokalizovane u hloroplastima, dok alternativni put uključuje enzim PAL u citoplazmi. Tokom infekcije povećana biosinteza salicilne kiseline dovodi do aktivacije signalnog puta koji reguliše ekspresiju velikog broja gena uključenih u odbrambeni odgovor (Ali et al., 2024; Mishra et al., 2024).

Centralni regulator ovog signalnog puta predstavlja gen *NPR1* (eng. *NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1*), koji ima ključnu ulogu u prenosu signala od akumulacije salicilne kiseline do aktivacije ekspresije odbrambenih gena. U odsustvu patogena *NPR1* se u citoplazmi nalazi u obliku oligomera stabilizovanih disulfidnim vezama. Akumulacija salicilne kiseline menja ćelijski redoks status, što dovodi do redukcije disulfidnih veza i disocijacije *NPR1* u

monomernu formu koje se transportuju u jedro. U jedru *NPRI* ostvaruje interakciju sa transkripcionim faktorima iz porodice TGA, čime aktivira ekspresiju gena odgovornih za odbranu biljaka, uključujući gene koji kodiraju proteine povezane sa patogenezo (Slika 2). Na taj način *NPRI* pozitivno reguliše ekspresiju ranih SA-zavisnih odbrambenih gena (PR gena) i omogućava uspostavljanje sistemske stečene otpornosti, koja biljci obezbeđuje dugotrajnu zaštitu od naknadnih infekcija (Yan et al., 2025; Zavaliev et al., 2020).



Slika 2. Molekularna regulacija odbrambenog odgovora biljaka posredovana hormonskim signalnim putevima nakon interakcije sa korisnim mikroorganizmima i biljnim patogenima.

Pored uloge u lokalnom odbrambenom odgovoru, *NPRI* predstavlja jedan od ključnih regulatora sistemske stečene otpornosti, budući da koordinira transkripciono reprogramiranje neophodno za uspostavljanje dugotrajne otpornosti biljke prema naknadnim infekcijama. Iako je njegova funkcija prvobitno dovođena u vezu isključivo sa SA-zavisnom signalizacijom, novija istraživanja pokazala su da *NPRI* učestvuje i u regulaciji indukovane sistemske otpornosti. Za razliku od SAR, aktivacija ISR najčešće nije praćena povećanom akumulacijom salicilne kiseline, već zavisi od signalnih puteva jasmonske kiseline i etilena, pri čemu *NPRI* ostvaruje regulatornu funkciju nezavisno od SA signalizacije. Ovakva dvostruka uloga *NPRI* ukazuje da on predstavlja važnu tačku integracije različitih hormonskih signalnih puteva i doprinosi koordinaciji odbrambenih odgovora biljke u zavisnosti od prirode interakcije sa mikroorganizmima (Vlot et al., 2021).

## Signalni put jasmonske kiseline

Jasmonska kiselina i njeni derivati, zajednički označeni kao jasmonati, predstavljaju ključne signalne molekule uključene u regulaciju odbrambenih odgovora biljaka prema nekrotrofnim patogenima i biljojedima, ali imaju značajnu ulogu i u odgovoru na različite abiotičke stresove. Pored direktne aktivacije odbrambenih mehanizama, jasmonska kiselina učestvuje u regulaciji biosinteze brojnih sekundarnih metabolita, uključujući flavonoide, terpene, glukozinolate i fitoaleksine, čime doprinosi povećanju otpornosti biljaka prema različitim stresnim faktorima. Takođe, signalni put jasmonske kiseline ima značajnu ulogu u uspostavljanju indukovane sistemske otpornosti. Jasmonska kiselina pripada grupi oksilipina i sintetise se iz nezasićenih masnih kiselina membranskih lipida, pri čemu biosinteza započinje oksidacijom  $\alpha$ -linoleinske kiseline. Jedan od ključnih gena ovog procesa je lipoksigenaza, koja katalizuje prvi korak biosinteze jasmonske kiseline i predstavlja važnu

regulatornu tačku ovog signalnog puta (F. Hu et al., 2023). Biološki najaktivniji oblik jasmonske kiseline je jasmonoil-L-izoleucin (eng. jasmonoyl-L-soleucine, JA-Ile), koji vezivanjem za receptor COI1 (eng. CORONATINE INSENSITIVE 1) pokreće prenos signala i dovodi do aktivacije odbrambenih odgovora (Ali et al., 2024; C. Li et al., 2022). Lipoksigenaze predstavljaju porodicu dioksigenaza koje katalizuju oksigenaciju polinezasićenih masnih kiselina i time započinju biosintezu oksilipina, uključujući jasmonsku kiselinu. Pored uloge u biosintezi jasmonata, ovi enzimi učestvuju u formiranju različitih oksilipinskih jedinjenja koja imaju važnu signalnu funkciju tokom odgovora biljaka na biotičke i abiotičke stresove. Brojna istraživanja pokazala su da se ekspresija *LOX* gena brzo indukuje nakon infekcije patogenima, mehaničkog oštećenja ili tretmana biljnim hormonima, zbog čega se često koriste kao molekularni markeri aktivacije JA signalnog puta (F. Hu et al., 2023; Yadav et al., 2026).

Biološki aktivni oblik JA-Ile, vezivanjem za receptor COI1 pokreće razgradnju represorskih JAZ (eng. jasmonate ZIM-domain) proteina i oslobađanje transkripcionih faktora odgovornih za aktivaciju JA-zavisnih odbrambenih gena. Među njima se posebno izdvaja *MYC2*, koji predstavlja centralni transkripcioni regulator signalnog puta jasmonske kiseline. Aktivirani *MYC2* reguliše ekspresiju velikog broja gena uključenih u biosintezu i signalizaciju jasmonata, kao i gena odgovornih za sintezu sekundarnih metabolita i proteina uključenih u odbranu biljke (Slika 2) (Zeng et al., 2025). Pored toga, pokazano je da *MYC2* pozitivno reguliše ekspresiju pojedinih gena iz porodice *LOX*, čime doprinosi održavanju i pojačavanju biosinteze jasmonske kiseline putem pozitivne regulatorne povratne sprege. Osim u odbrani od patogena, *MYC2* ima važnu ulogu u regulaciji odgovora biljaka na abiotičke stresove, kao i u koordinaciji interakcija između signalnih puteva jasmonske kiseline, salicilne kiseline i apscisinske kiseline (Zhu et al., 2024).

## Signalni put etilena

Etilen predstavlja važan regulator biljnog imunskog odgovora i zajedno sa jasmonskom kiselinom učestvuje u regulaciji odbrane prema patogenima, kao i u uspostavljanju indukovane sistemske otpornosti. Sinteza etilena započinje iz metionina preko prekursora 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline (eng. 1-amino-1-carboxycyclopropane, ACC), pri čemu ključne enzime predstavljaju ACC sintaza i ACC oksidaza. Vezivanje etilena za njegove receptore pokreće signalni put koji dovodi do aktivacije transkripcionih regulatora i ekspresije gena uključenih u odbrambeni odgovor biljke (Slika 2) (Movahedi et al., 2022; X. Wang et al., 2025). Tokom interakcije biljke sa nekrotrofnim patogenima, etilen deluje sinergistički sa jasmonskom kiselinom i zajedno sa njom predstavlja jedan od ključnih regulatora indukovane sistemske otpornosti. Aktivacija ovih signalnih puteva ne dovodi do trajne ekspresije odbrambenih gena, već uspostavlja stanje povećane pripravnosti, koje omogućava biljci da nakon naknadnog napada patogena ili drugog stresnog faktora reaguje brže i efikasnije (Vlot et al., 2021).

## Signalni put apscisinske kiseline

Apscisinska kiselina predstavlja biljni hormon koji ima centralnu ulogu u regulaciji odgovora na abiotičke stresove, kao što su suša, salinitet i ekstremne temperature. Međutim, brojna novija istraživanja pokazala su da ABA učestvuje i u regulaciji odbrambenih odgovora prema biljnim patogenim mikroorganizmima, pri čemu njena uloga zavisi od vrste patogena, faze infekcije i interakcije sa drugim hormonskim signalnim putevima. Za razliku od salicilne i jasmonske kiseline, čija je uloga u biljnom imunitetu relativno jasno definisana, efekti ABA mogu biti pozitivni ili negativni, zbog čega se ovaj hormon smatra jednim od najznačajnijih modulatora hormonskog "crosstalk"-a tokom biljnog imunskog odgovora (Movahedi et al., 2022; Wei et al., 2025).

Akumulacija ABA dovodi do aktivacije signalnih puteva koji regulišu ekspresiju velikog broja gena uključenih u prilagođavanje biljke stresnim uslovima. Jedan od najvažnijih fizioloških odgovora posredovanih ABA jeste zatvaranje stoma, čime se ograničava ulazak bakterijskih patogena u biljno tkivo. Pored toga, ABA utiče na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, signalizaciju posredovanu

Ca<sup>2+</sup> jonima i aktivaciju MAP kinaza, čime učestvuje u koordinaciji ranih odbrambenih odgovora nakon infekcije. Istovremeno, ABA doprinosi regulaciji ekspresije brojnih gena uključenih u odgovor na stres i omogućava biljci da uskladi odbrambene procese sa očuvanjem fiziološke homeostaze (Slika 2) (Wei et al., 2025).

U biljkama se ABA sintetise iz karotenoida, pri čemu ključni regulatorni korak predstavlja oksidativno razlaganje 9-cis-epoksikarotenoida koje katalizuje enzim NCED (eng. 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase). Ova reakcija predstavlja ograničavajući korak biosinteze ABA. Pokazalo se da se ekspresija *NCED* povećava kao odgovor na različite abiotičke stresove, ali i tokom interakcije biljaka sa patogenima i korisnim mikroorganizmima. Zbog toga se promena ekspresije ovog gena često koristi za procenu intenziteta aktivacije ABA biosinteze i predstavlja jedan od najznačajnijih molekularnih markera ABA-posredovanog odgovora biljaka na različite stresne uslove (Khan, 2025; Q. Li et al., 2021).

### Međusobna interakcija hormonskih signalnih puteva

Iako salicilna kiselina, jasmonska kiselina, etilen i abscisinska kiselina imaju specifične uloge u regulaciji biljnog imunskog odgovora, njihovi signalni putevi ne funkcionišu nezavisno, već predstavljaju međusobno povezanu regulatornu mrežu. Ovakva komunikacija između hormona omogućava biljci da objedini različite signale nastale tokom interakcije sa patogenim i korisnim mikroorganizmima, kao i usled abiotičkih stresova, i da u skladu sa tim prilagodi intenzitet i trajanje odbrambenog odgovora. Posebno je istaknuta složena međusobna regulacija signalnih puteva salicilne i jasmonske kiseline, koja može biti antagonistička ili sinergistička u zavisnosti od konteksta (Y. Yu et al., 2022), dok etilen najčešće ostvaruje sinergističko dejstvo sa jasmonskom kiselinom u odbrani od nekrotrofnih patogena. Pored toga, ABA predstavlja važnu regulatornu komponentu ove mreže, modulišući signalizaciju SA i JA i doprinoseći usklađivanju imunskog odgovora sa procesima rastanja, razvoja i adaptacije na stres (Kamran et al., 2025; Wei et al., 2025).

Međusobna povezanost hormonskih signalnih puteva omogućava preciznu regulaciju ekspresije velikog broja odbrambenih gena i predstavlja osnovu prilagođavanja imunskog odgovora različitim vrstama patogena. Ova regulacija ostvaruje se delovanjem zajedničkih transkripcionih regulatora i signalnih komponenti koje objedinjuju informacije iz više hormonskih puteva. Tako, *NPR1* predstavlja centralni regulator SA-zavisnog odgovora, ali učestvuje i u koordinaciji drugih signalnih puteva (Vlot et al., 2021), dok *MYC2*, pored ključne uloge u JA signalizaciji, posreduje i u odgovorima regulisanim ABA (Ali et al., 2024). Zahvaljujući ovakvoj mreži međusobno povezanih regulatora, biljka je sposobna da uskladi intenzitet odbrambenog odgovora sa fiziološkim stanjem i uslovima sredine, čime se obezbeđuje efikasna zaštita uz očuvanje procesa rastanja i razvoja (Slika 2).

# CILJEVI

Glavni cilj ovog istraživanja je da se okarakterišu sezonske promene mikrobioma šećerne repe i uspostavi korelacija sa biokontrolnim potencijalom dobijenih izolata. Ostvarivanje ovog cilja uradiće se kroz sledeće specifične ciljeve:

1. Razvijanje specifičnih podloga za povećanje diverziteta izolovanih bakterija mikrobioma šećerne repe tokom različitih faza rastenja i razvića.
2. Utvrđivanje sezonske promene sastava mikrobioma šećerne repe primenom tehnologije sekvenciranja nove generacije.
3. Identifikacija i karakterizacija izolovanih bakterija za osobine koje pospešuju rastenje biljke i štite je od patogena.
4. Potvrđivanje biokontrolnog potencijala odabranih sojeva u *in planta* eksperimentima.
5. Identifikovanje uloge nepatogenih bakterija u ekspresije gena povezanih sa indukovanom sistemskom rezistencijom biljke domaćina kao odgovor na infekciju patogenom.

# MATERIJAL I METODE

## Uzorkovanje biljnog materijala

Šećerna repa korišćena u ovoj disertaciji pripada sorti Eduarda (KWS, Einbeck, Germany), koja se gaji u Srbiji. Biljke su uzgajane na eksperimentalnom polju Istraživačko-razvojnog instituta Tamiš Pančevo, Autonomna pokrajina Vojvodina, Srbija (44°56'35.4"N, 20°43'10.6"E). Uzorkovanje je sprovedeno tri puta tokom 2021. godine, u različitim fazama vegetativnog razvoja šećerne repe, i to u maju (faza nicanja i razvoja listova), u julu (faza intenzivnog rasta i akumulacije šećera u korenu) i u oktobru (faza zrenja i najveće koncentracije šećera u korenu). U svakoj fazi uzorkovane su tri nasumično izabrane biljke. Biljni materijal je sakupljen u sterilne plastične kese i transportovan u rashladnim torbama do laboratorije za dalju obradu. Sa svake biljke u laboratorijskim uslovima odvojena je lisna masa koja je činila tri uzorka filosofere i podzemni deo koren sa bočnim korenovima koji su činili tri uzorka rizosfere.

## Priprema uzorka za izolaciju bakterija

Bakterije su izolovane iz filosofere i rizosfere šećerne repe. Uzorci filosofere obuhvatali su listove, dok su uzorci rizosfere uključivali koren i zemljište koje ga okružuje. Uzorak zemljišta pripremljen je prema metodi opisanoj kod T. Nguyen et al. (2018). Odmereno je 20 g zemljišta koje se nalazilo u zoni oko koren biljaka, rastvoreno je u 200 ml fiziološkog rastvora (0.9% NaCl) i homogenizovano 30 minuta na rotacionom šejkeru (150 rpm). Nakon toga, ostavljeno je 15 min na sobnoj temperaturi radi taloženja pre dalje upotrebe. Uzorci lista i korena su pripremljeni na dva različita načina po metodi de Oliveira Costa et al. (2012), u zavisnosti od toga da li je cilj izolacija endofitnih ili epifitnih mikroorganizama. Za izolaciju endofita, biljni materijal je najpre sterilisan, a potom su pravljena serijska razblaženja koja su se koristila za zasejavanje na odabranim podlogama. Sterilizacija biljnog materijala započinje potapanjem u 70% etanolu tokom 30 s, nakon čega je tretiran sa 2.5% rastvorom natrijum hipohlorita uz povremeno mućkanje u trajanju od 8 min. Sterilizacija je završena ispiranjem destilovanom vodom pet puta. 10 g biljnog tkiva je potom homogenizovano u fiziološkom rastvoru (1:10 w/v) korišćenjem avana i tučka. Za izolaciju epifitnih mikroorganizama sterilizacije nije izvršena, da bi se očuvala mikrobiota prisutna na površini biljke. 10 g biljnog tkiva je pomešano sa fiziološkim rastvorom (1:10 w/v) i inkubirano je na rotacionom šejkeru 3 h na 120 rpm. Nakon toga je postupak homogenizacije sproveden na isti način kao kod endofitnih uzoraka. Za sve uzorke, 100  $\mu$ L odgovarajućih serijskih razblaženja ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$ ) utrljano je štapićem po Drigalskom na odgovarajuće čvrste podloge.

## Izbor i priprema hranljivih podloga za izolaciju bakterija iz biljnog mikrobioma

Da bi se omogućilo izolovanje što raznovrsnijeg spektra mikroorganizama, pripremljeni su medijumi koji u sebi sadrže ekstrakte biljnih tkiva ili zemljišta, sa ciljem simulacije prirodnih uslova sredine u kojima ti mikroorganizmi prirodno žive. Uzorci filosofere gajeni su na sledećim hranljivim podlogama: agar sa ekstraktom lista (eng. Leaf Extract agar - LEa), fitagel sa ekstraktom lista (eng. Leaf Extract phytagel - LEph), hranljivi agar (eng. Nutrient Agar – NA (Torlak, Beograd, Srbija)) i PS medijum. PS podloga je pravljena prema recepturi koju su opisali Kato et al. (2018), a sastojala od tri odvojena rastvora, rastvor neorganskih soli sa agarom, rastvor fosfatnih soli i organski hranljivi rastvor, koja su spojeni nakon autoklaviranja.

Ekstrakt lista za LEa i LEph dobijen je prema Youssef et al. (2016). Listovi šećerne repe homogenizovani su sa destilovanom vodom u odnosu 1:10 (w/v), nakon čega je rastvor filtriran najpre sterilnom gazom, a zatim filter papirom. Dobijeni ekstrakt korišćen je za pripremu podloga. Sastav podloga korišćenih za uzorak filosofere:

- LEa: ekstrakt lista 50 mL/L, agar 20 g/L

- LEph: ekstrakt lista 50 mL/L, fitagel 20 g/L
- NA: hranljivi agar 15 g/L
- PS medijum:
  - Rastvor A:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,27 mM,  $\text{MgSO}_4$  0.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  45  $\mu\text{M}$ , agar 15 g/L
  - Rastvor B:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  10 mM
  - Rastvor C: pepton 0,1 g/L, ekstrakt kvasca 0,1 g/L, glukoza 0,1 g/L

Za uzorak korena korišćene su sledeće podloge: agar sa ekstraktom korena (eng. **Root Extract agar** - REa), fitagel sa ekstraktom korena (eng. **Root Extract phytigel** - REph), hranljivi agar (eng. **Nutrient Agar** - NA) i PS medijum. Ekstrakt korena pripremljen je prema Youssef et al. (2016). Usitnjeni delovi korena homogenizovani su sa destilovanom vodom u odnosu 1:10 (w/v), a zatim filtrirani kroz sterilnu gazu i filter papir i potom korišćeni za pripremu podloga.

Sastav podloga korišćenih za uzorak korena:

- REa: ekstrakt korena 50 mL/L, agar 20 g/L
- REph: ekstrakt korena 50 mL/L, fitagel 20 g/L

Uzorci rizosfere zasejavani su na sledećim hranljivim podlogama: intenzivni hranljivi medijum na bazi metanolnog ekstrakta zemljišta 1 (eng. **Intensive Soil Extract Medium 1** – ISEM1), intenzivni hranljivi medijum na bazi vodenog ekstrakta zemljišta 2 (eng. **Intensive Soil Extract Medium 2** – ISEM2), hranljivi medijum na bazi metanolnog ekstrakta zemljišta (eng. **Methanol Soil Extract Medium** – MSEM), hranljivi medijum na bazi vodenog ekstrakta zemljišta (eng. **Water Soil Extract Medium** – WSEM), 0,1 tripton soja agar (eng. **0,1 Tryptic Soya Agar** – 0,1 TSA (TH Media, Titan Biotech, Ltd., Delhi, India), 0,01 tripton soja agar (eng. **0,01 Tryptone Soy Agar** – 0,01 TSA), agar na bazi vode i kvasca (eng. **Water Yeast** – WY), agar sa ekstraktom zemljišta (eng. **Soil Extract agar** – SEa), fitagel sa ekstraktom zemljišta (eng. **Soil Extract phytigel** – SEph), kao i REa i PS medijum.

Metanolni ekstrakt zemljišta korišćen u pripremi podloga ISEM1 i MSEM dobijen je prema T. Nguyen et al. (2018). 500 g zemljišta pomešano je sa 1200 mL 80% metanola i inkubirano preko noći uz šejkiranje, 150 rpm, na sobnoj temperaturi. Nakon taloženja (60 min), supernatant je filtriran filter papirom, a metanol uklonjen rotacionom evaporacijom na 50°C. Preostali sadržaj rastvoren je u 100 mL destilovane vode. Vodeni ekstrakt za ISEM2 i WSEM pripremljen je istom procedurom, osim što je umesto metanola korišćena destilovana voda (500 mL na 500 g zemljišta), bez faze uparavanja. Svi ekstrakti sterilisani su filtracijom kroz membrane pora 0,22  $\mu\text{m}$ .

0,1 tripton soja agar (0,1 TSA), 0,01 tripton soja agar (0,01 TSA) i WY su pravljene praćenjem procedure Kurm et al. (2019).

Ekstrakt zemljišta korišćen za SEa i SEph podloge pripremljen je prema Mourad et al. (2018): 400 g zemljišta suspendovano je u 1 L destilovane vode i autoklavirano dva puta po 30 minuta na 121°C. Nakon hlađenja, supernatant je filtriran filter papirom i korišćen u daljoj pripremi.

Sastav podloga korišćenih za uzorak rizosfere:

- ISEM1:

Medijum se sastoji od pet komponenti, pri čemu je rastvor mineralnih soli autoklaviran, dok su ostali rastvori sterilisani filtracijom i dodati nakon autoklavliranja.

- Rastvor mineralnih soli:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,23 g/L,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,23 g/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,33 g/L,  $\text{NaHCO}_3$  0,25 g/L, agar 15 g/L
- Aminokiseline: po 5 mg sledećih aminokiselina - D-valin, D-metionin, D-leucin, D-fenilalanin, D-treonin, D-triptofan
- Rastvor vitamina B: 1 mL vitaminskog stoka je sadržao po 50 mg tiamin hidrohlorida, riboflavina, niacina, piridoksin-HCl, inozitola, kalcijum pantotenata i  $\beta$ -aminobenzojeve kiseline i 25 mg biotina rastvorenih u 100 mL destilovane vode; dodat u koncentraciji od 1 mL/L

- Selenitno-tungstatni rastvor: sadrži NaOH 0,5 g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> x 5H<sub>2</sub>O 3 mg, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 4 mg u 1 L destilovane vode; dodat u koncentraciji od 2 mL/L
- Rastvor elemenata u tragovima: HCl (25%, v/v) 10 mL, FeCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O 1,5 g, ZnCl<sub>2</sub> 70 mg, MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O 100 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6 mg, CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 190 mg, CuCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 2 mg, NiCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 24 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 36 mg u 1 L destilovane vode; dodat u koncentraciji od 2 mL/L
- Metanolni ekstrakt zemljišta: dodat u koncentraciji od 200 mL/L
- ISEM2: identičan sastav kao ISEM1, osim što je umesto metanolnog korišćen vodeni ekstrakt zemljišta (200 mL/L)
- MSEM: rastvor mineralnih soli sastava kao kod ISEM, uz dodatak metanolnog ekstrakta zemljišta 200 mL/L
- WSEM: rastvor mineralnih soli kao kod ISEM, uz dodatak vodenog ekstrakta zemljišta 200 mL/L
- 0,1 TSA: TSB (TH Media, Titan Biotech Ltd., Delhi, Indija) 3 g/L, agar 15 g/L
- 0,01 TSA: TSB 0,3 g/L, agar 15 g/L
- WY: NaCl 5 g/L, ekstrakt kvasca 0,05 g/L, agar 20 g/L
- SEa: glukoza 1 g/L, pepton 1 g/L, ekstrakt kvasca 1 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, ekstrakt zemljišta 400 mL/L, agar 15 g/L
- SEph: glukoza 1 g/L, pepton 1 g/L, ekstrakt kvasca 1 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, ekstrakt zemljišta 400 mL/L, fitagel 20 g/L.

Petri šolje zasejane sa različitim uzorcima su inkubirane na 25°C tokom četiri nedelje. Na svakih sedam dana, morfološki različite kolonije su prestriklovane na odgovarajuću podlogu sa koje su izolovane. Nedelju dana nakon poslednjeg transfera, svi izolati su prebačene na TSA medijum (15 g/L, TH Media, Titan Biotech Ltd., Delhi, Indija). Oni izolati koji nisu porasli ili je rast bio slab na ovoj podlozi, zasejane su ponovo na podlogu sa koje su prvobitno izolovani. Izolati su čuvani na -80°C u odgovarajućoj podlozi za rast sa dodatkom 15% glicerola.

## Morfološke karakteristike kolonija

Nakon izolacije mikroorganizama na prethodno opisanim hranljivim podlogama, analizirane su morfološke karakteristike formiranih kolonija. Procena je obuhvatala oblik, veličinu, boju, izgled oboda kolonije, strukturu kolonije, transparentnost, konzistenciju i sjaj. Na osnovu uočenih razlika, izdvojeni su reprezentativni morfotipovi, koji su korišćene za dalja ispitivanja.

## Diferencijalno bojenje bakterija po Gramu

Na čisto predmetno staklo naneta je kap sterilne vode, nakon čega je ezom prenet deo kolonije bakterija sa Petri šolje. Kružnim pokretima je napravljen razmaz, koji je potom fiksiran provlačenjem iznad plamena i osušen na vazduhu. Nakon fiksiranja, na preparat je nanescena boja kristal violet i ostavljena da deluje jedan minut, nakon čega je isprana vodom. Sledeći korak je dodavanje Lugolovog rastvora, u trajanju od jednog minuta, nakon čega je preparat ponovno ispran vodom. Sledi obezbojavanje 96% etanolom tridesetak sekundi, a proces obezbojavanja prekida se ispiranjem destilovanom vodom. Preparat je potom obojen 0,25% safraninom u trajanju od jednog minuta. Preparati su zatim isprani destilovanom vodom i ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi i posmatrani pod imerzionim objektivom mikroskopa na uveličanju od 1000x (Leica DM 2500, Leica Microsystems CMS GmbH, Veclar, Nemačka).

## Biohemijska karakterizacija bakterija

### Produkcija egzoenzima

Sposobnost izolata da sintetišu egzoenzime ispitana je testovima aktivnosti amilaze, proteaze, želatinaze, mananaze i celulaze. Podloge za ove testove pripremljene su prema Berić et al. (2009). Za

ispitivanje aktivnosti amilaze, proteinaze i želatinaze korišćen je bazični medijum koji je sadržao hranljivi bujon (8 g/L), NaCl (4 g/L) i agar (10 g/L). U zavisnosti od testiranog enzima, u medijum su dodavani rastvorljivi skrob (5g/L) za amilazu, obrano mleko u prahu (4g/L) za proteinazu i želatin (4 g/L) za želatinazu. Izolati su zasejani tačkasto na pripremljene podloge i inkubirani preko noći na 30°C. Nakon inkubacije, primenjivani su specifični tretmani za detekciju aktivnosti svakog enzima:

- Za amilazu, Petri šolje su prelivene Lugolovim rastvorom, pri čemu su oko kolonija koje proizvode amilazu uočene prozirne zone.
- Za želatinazu i proteinazu, Petri šolje su prelivene taninskom kiselinom (10 g/L); kod izolata koji proizvode želatinazu formiraju se bele zone oko kolonija, dok se kod izolata sa proteolitičkom aktivnošću formiraju bezbojne zone.

Za ispitivanje produkcije mananaze i celulaze, najpre je pripremljen bazični medijum koji se sastojao od ekstrakta kvasca (2 g/L), peptona (5 g/L), MgSO<sub>4</sub> (5 g/L), NaCl (0,5 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,15 g/L) i agara (20 g/L). Kao supstrat za detekciju mananaze dodat je Locust bean gum (10 g/L), dok je za ispitivanje celulazne aktivnosti korišćena karboksimetil celuloza (5 g/L). Izolati su zasejani na isti način kao i za ostale egzoenzime i inkubirani pet dana na 30°C. Nakon inkubacije Petri šolje su prelivene rastvorom Kongo crvenog (1 g/L) i isprane 1 M NaCl, pri čemu su prozirne zone oko kolonija ukazivale na pozitivnu reakciju, odnosno produkciju odgovarajućeg enzima.

Sposobnost izolata za produkciju katalaze ispitivana je direktnim dodavanjem nekoliko kapi 3% (v/v) vodonik-peroksida na bakterijske kolonije praćenjem procedure opisane kod Khattoon et al. (2022). Pozitivna reakcija manifestovala se pojavom mehurića, usled oslobađanja kiseonika kao produkta razgradnje vodonik peroksida.

## Antimikrobna aktivnost

### Antibakterijski potencijal bakterija

Antibakterijska aktivnost testiranih sojeva ispitana je metodom difuzije u agaru opisanom kod Krstić Tomić et al. (2023). U epruvete sa 8 mL prohladene polučvrste LA podloge (7 g/L agara) dodat je 1% (v/v) inokulum jednog od tri indikatorska soja, patogena šećerne repe, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* CFBR2437, P21 i P16. Sadržaj epruveta homogenizovan je vorteksovanjem i izliven preko Petri šolje koje su prethodno bile tanko prelivene slojem čvrstog LA agara. Na površinu očvrslog medijuma naneto je po 10 µL tečne prekonoćne kulture testiranih sojeva, gajenih u LB medijumu uz mućkanje na 30°C, 180 rpm. Petri šolje su inkubirane 24 h na 30°C. Formiranje inhibicione zone oko kolonija testiranih sojeva smatrano je indikatorom antibakterijske aktivnosti.

### Antifungalni potencijal bakterija

Inicijalni skrining antifungalne aktivnosti na gljive *Fusarium oxysporum* i *Rhizoctonia solani* sproveden je kvalitativno metodom dualne kulture (Kholostiakov et al., 2025). Gljive su zasejane na PDA (eng. **P**otato **D**extrose **A**gar) podlozi (39 g/L, HiMedia Laboratories Pvt Limited, Mumbaj, Indija) i gajene 7 dana na 25°C. Sa periferije aktivno rastuće kolonije isečen je disk prečnika 1 cm i prebačen na novu PDA Petri šolju. Testirane bakterije su zasejavane u vidu crte otprilike 2,5 cm od gljive. Prisustvo ili odsustvo inhibicione zone korišćeno je kao indikator antifungalne aktivnosti.

### Ispitivanje uticaja bakterija na klijavost semena

Seme šećerne repe je površinski sterilisano korišćenjem sledećeg protokola. Prvo su semena dobro isprana česmenskom vodom, a zatim potapana u 70% etanol tokom 1 min, zatim u 3% (v/v) rastvor natrijum-hipohlorita u trajanju od 15 min, nakon čega su isprana tri puta sterilnom destilovanom vodom. Bakterijske kulture su gajene u LB medijumu na 30°C, 180 rpm i razblažene do finalne koncentracije od 10<sup>8</sup> CFU/mL (eng. **C**olony **F**orming **U**nits) (Krstić Tomić et al., 2023). Površinski sterilisano seme je potopljeno u odgovarajuću bakterijsku suspenziju tokom 1 h, osušeno na vazduhu

i postavljeno u pripremljene plastične posude. Plastične posude su prethodno sterilisane 20% rastvorom natrijum-hipohlorita i obložene sa tri sloja sterilnog filter papira navlaženog sterilnom destilovanom vodom, na koji su položena semena. Inkubacija je trajala tri nedelje u mraku, u komori za rastenje na  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Tokom inkubacije, u posude je redovno dodavana jednaka količina sterilne destilovane vode (10 mL po posudi). Svi tretmani su izvedeni u pet ponavljanja, sa po deset semena u svakom ponavljanju, u okviru dva nezavisna eksperimenta. Kao kontrola korišćeno je seme koje je tretirano LB medijumom bez bakterijske inokulacije. Efekat bakterijskog tretmana na klijavost semena izražen je u odnosu na kontrolu.

## Karakterizacija osobina povezanih sa promocijom rastenja biljaka

### Produkcija cijanovodonika

Produkcija cijanovodonika ispitivana je na King B podlozi (43 g/L, TM Media, Titan Biotech Ltd., Radžastan, Indija) sa dodatkom glicina do finalne koncentracije od 4,4 g/L, prateći procedure opisane u Sehrawat et al. (2022). Na unutrašnju stranu poklopaca Petri šolje postavljen je filter papir natopljen 2% w/v rastvorom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,5% w/v pikrinskoj kiselini. Šolje su zatvorene parafilmom i inkubirane 48 h na  $30^\circ\text{C}$ . Ukoliko testirani soj proizvodi HCN, filter papir menja boju iz žute u svetlo braon (slaba produkcija +), braon (umerena produkcija ++) ili crveno-braon (intenzivna produkcija +++).

### Solubilizacija fosfata

Za detekciju sposobnosti solubilizacije fosfata korišćena je podloga Pikovskaya's agar (31,3 g/L, TM Media, Titan Biotech Ltd., Radžastan, Indija). Testirani sojevi zasejavani su sterilnom čačalicom u vidu linije dužine približno 1 cm, a zatim inkubirani 14 dana na  $30^\circ\text{C}$ . Formiranje providne halo zone oko kolonije ukazivalo je na sposobnost mikroorganizama da solubilizuju neorganski fosfat.

### Sinteza egzopolisaharida

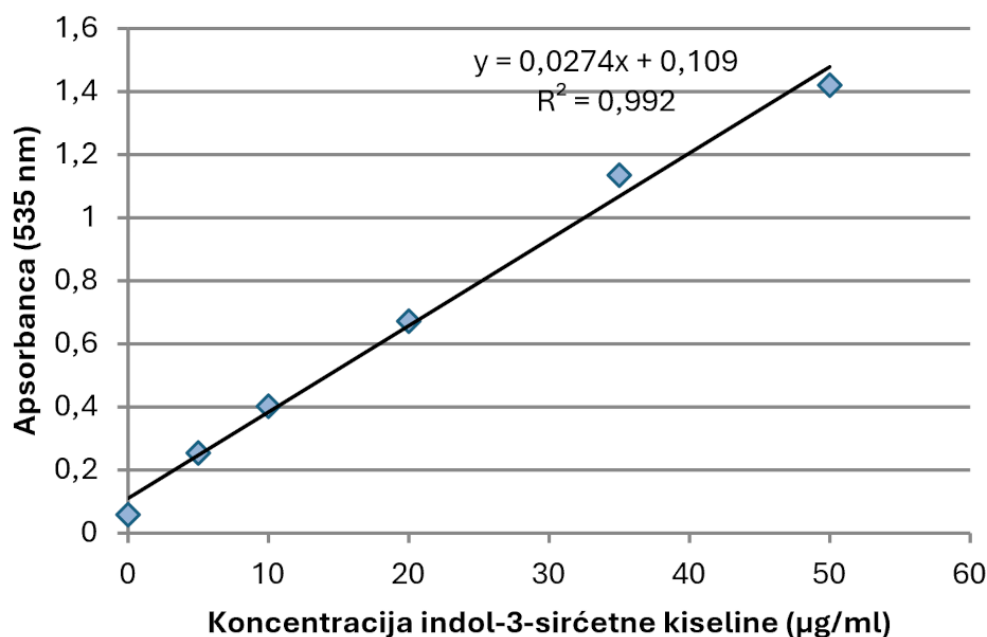
Sinteza egzopolisaharida ispitivana je na čvrstoj podlozi koja je sadržala ekstrakt kvasa 0,5 g/L, manitol 4 g/L i agar 15 g/L (Jesus & Labiza, 2025). Bakterije su zasejane u vidu tačaka i inkubirane četiri dana na temperaturi rasta soja. Produkcija egzopolisaharida procenjivana je na osnovu morfologije kolonija, pri čemu je formiranje mukoidnih i rastegljivih kolonija pri dodiru sterilnom čačalicom smatrano pozitivnim rezultatom.

### Produkcija siderofora

Sposobnost produkcije siderofora ispitivana je korišćenjem hrom azurol S (eng. Chrome Azurol S - CAS) testa prema protokolu opisanom kod Schwyn and Neilands (1987). CAS indikator podloga pripremljena je kombinovanjem dva sterilisana rastvora. Prvi rastvor sadržao je CAS-Fe kompleks i pripreman je mešanjem 50 ml CAS rastvora (0,065 g CAS u 50 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ ), 9 ml  $\text{FeCl}_3$  rastvora (0,0027 g  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  rastvoreno u 10 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  uz dodatak 83  $\mu\text{l}$  12 M HCl) i 40 ml HDTMA (eng. HexaDecylTriMethylAmmonium) rastvora (0,073 g heksadeciltrimetilamonijum-bromida u 40 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ ). Drugi rastvor sadržao je 30,24 g PIPES (eng. piperazine-1,4-diylbisethanesulfonic acid) pufera (piperazin-1,4-bis (2-etansulfonska kiselina)), 15 g agara i 750 ml dejonizovane vode, pri čemu je pH vrednost podešena na 6,8 dodatkom NaOH. Nakon autoklaviranja na  $121^\circ\text{C}$  tokom 15 minuta, rastvori su sjedinjeni kako bi se dobila CAS podloga karakteristične plavo-zelene boje. Prethodno je LA podloga razlivena u Petrijeve šolje i, nakon očvršćavanja, aseptično je prepolovljena. Jedna polovina zamenjena je CAS agarom, čime je formiran kombinovani sistem za detekciju produkcije siderofora. Pojedinačna bakterijska kolonija testiranog soja zasejana je na polovini nutritivne podloge (LA), na granici sa CAS delom, nakon čega su Petri šolje inkubirane na temperaturi od  $30^\circ\text{C}$  tokom 48 h. Produkcija siderofora je detektovana pojavom gubitka boje CAS podloge u zoni rasta bakterija, pri čemu je plavo-zelena boja prelazila u žutu, narandžastu ili ružičastu, što se smatra pozitivnim rezultatom testa.

## Detekcija sinteze indol-3-sirćetne kiseline

Za testiranje sposobnosti proizvodnje indol-3-sirćetne kiseline (eng. **Indole-3-Acetic Acid - IAA**) praćena je metodologija opisana kod (Mohite, 2013). Testirani izolati su inokulisani u LB sa dodatkom 5 mM triptofana i inkubirani na 30°C u rotacionom šejkeru pri 180 rpm tokom sedam dana. Tokom perioda inkubacije, svakodnevno je pod sterilnim uslovima uzimano po 750 µl bakterijske kulture, koja je zatim centrifugirana 5 minuta na 10000 rpm. Nakon centrifugiranja, 250 µl supernatanta prebaćeno je u nove mikrotube, u koje je dodat po 500 µl Salkowski reagensa (1 ml 0,5M FeCl<sub>3</sub> u 50 ml 37% HClO<sub>4</sub>). Reakciona smeša inkubirana je 30 minuta u potpunom mraku na sobnoj temperaturi, nakon čega je izmerena apsorbanca na talasnoj dužini od 535 nm pomoću spektrofotometra. Za pripremu blanka korišćen je LB sa triptofanom i Salkowski reagens. Koncentracija sintetisane IAA određivana je na osnovu standardne krive za IAA i izražena u µg/ml (Slika 3) i rezultati su interpretirani kao: - (nema produkcije), + (slaba produkcija, <10 µg/ml), ++ (umerena produkcija, 10-20 µg/ml) i +++ (jaka produkcija, >20 µg/ml).



Slika 3. Standardna kriva za određivanje koncentracije indol-3-sirćetne kiseline

## Ispitivanje sposobnosti fiksacije azota

Sposobnost bakterija da fiksiraju atmosferski azot ispitivana je korišćenjem polučvrste NFB (eng. **Nitrogen-Free Bromothymol**) podloge, pripremljene prema metodologiji opisanoj u radu Baldani et al. (2014). Sastav podloge po litru uključuje: 5 g DL-jabučne kiseline, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,1 g NaCl, 0,02 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O i 0,5 g agara. U osnovni medijum dodati su sledeći sterilni rastvori:

- Rastvor mikroelemenata: 0,4 g CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O, 0,12 g ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1,4 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 1,5 g MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O u 1 l destilovane vode; sterilizovati autoklaviranjem.
- Rastvor bromtimol plavog: 0,5 % u 2 N KOH; sterilizovati filtracijom.
- Fe(III)-EDTA rastvor: 1,64 %; sterilizovati filtracijom.
- Rastvor vitamina: 10 mg biotina i 20 mg piridoksal HCl u 0,1 l destilovane vode; sterilisati filtracijom.

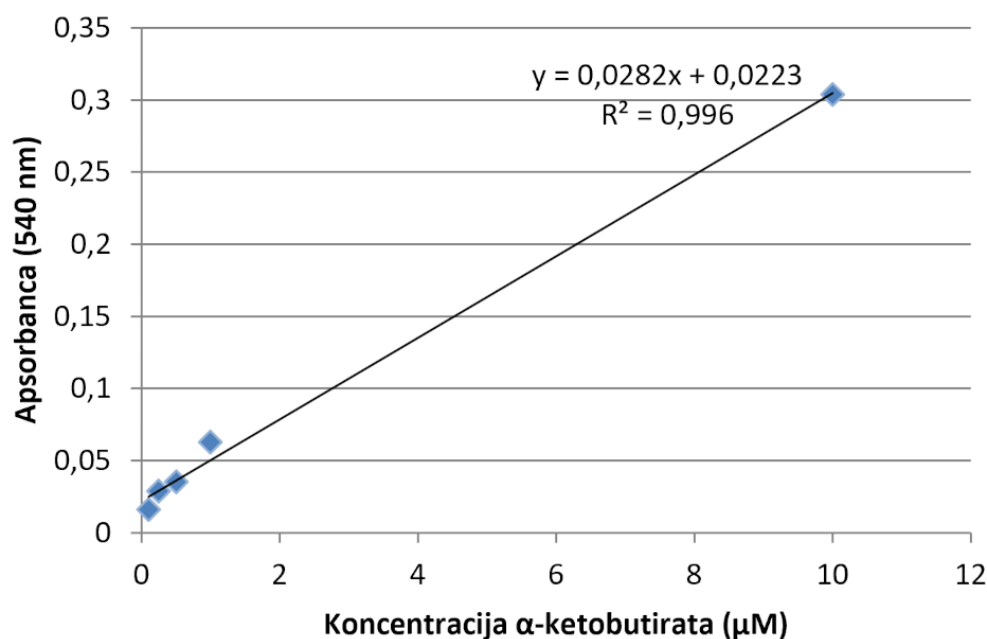
Pre dodavanja agara, pH podloge je podešen na 6,8, zbog izraženog efekta jabučne kiseline na zakišeljavanje podloge. Nakon autoklaviranja, u ohlađeni medijum aseptično su dodati sterilno filtrirani rastvori mikroelemenata, bromtimol plavog indikatora, Fe(III)-EDTA kompleksa i

vitaminske mešavine, pri čemu je sterilizacija izvršena prolaskom kroz membranske filtere pora 0,22  $\mu\text{m}$ . Pripremljena podloga raspodeljena je u epruvete u zapremini od 5 ml, nakon čega je izvršena inokulacija sa 100  $\mu\text{l}$  prekonoćne kulture ispitivanih bakterijskih sojeva. Inkubacija je trajala četiri dana na optimalnoj temperaturi za rast ispitivanih sojeva. Formiranje karakteristične beličaste pelikule korišćeno je kao indikator potencijalne sposobnosti rasta u uslovima ograničene dostupnosti azota, a stepen porasta pelikule rangiran je kao: - (nema produkcije pelikule), + (slabo izraženo prisustvo pelikule), ++ (umereno izraženo prisustvo pelikule) i +++ (veoma izražena pelikula).

### Merenje aktivnosti 1-aminociklopropan-1-karboksilat deaminaze preko koncentracije $\alpha$ -ketobutirata

Za određivanje aktivnosti ACC deaminaze (eng. 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylicacid - ACC) korišćena je DFMM podloga (eng. Dworkin – Foster Minimal Medium) (Dworkin and Foster, 1958): 4 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 g/L  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , po 2 g/L glukoze, glukonske i limunske kiseline, 2/L g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kao i dodatak rastenjevora mikroelemenata. Rastenjevor mikroelemenata sastojao se od: 1 mg  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{g}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 11,2  $\mu\text{g}$   $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 124,6  $\mu\text{g}$   $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 78,2  $\mu\text{g}$   $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  i 10  $\mu\text{g}$   $\text{MoO}_3$ , koji je potom dodat u DFMM podlogu pre sterilizacije autoklavanjem.

Prekonoćne bakterijske kulture su inokulisane u DFMM podlogu i inkubirane uz aeraciju na 30°C, 200 rpm. Sledećeg dana, ćelije su centrifugirane 20 min na 4000 rpm pri +4°C, supernatant je odlivan, a ćelije su isprane dva puta u 5 ml svežeg DFMM medijuma. Nakon drugog ispiranja, ćelije su resuspendovane u 4 ml DFMM podloge sa ACC-om u konačnoj koncentraciji od 3 mM i inkubirane 24 h na 30°C uz konstantno mešanje, 200 rpm. Nakon inkubacije, ćelije su ponovo centrifugirane (20 min, 4000 rpm, 4°C), supernatant je uklonjen, a pelet resuspendovan u 1 ml 0,1 M Tris-HCl pufera (pH 7,6). Uzorci su zatim centrifugirani (5 min na 16000 g), supernatant je odbačen, a pelet resuspendovan u 600  $\mu\text{l}$  0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) uz dodatak 30  $\mu\text{l}$  toluena i kratko homogenizovan vorteksovanjem (30 s). U sledećem koraku, 100  $\mu\text{l}$  toluenizovanih ćelija inkubirano je 15 min na 30°C sa 10  $\mu\text{l}$  0,5 M ACC rastvora uz mešanje. Reakcija je zaustavljena dodatkom 500  $\mu\text{l}$  0,56 M HCl i uzorci su ponovo homogenizovani vorteksujem i centrifugirani (5 min na 16000 g na sobnoj temperaturi). Zatim je 500  $\mu\text{l}$  supernatanta pomešano sa 400  $\mu\text{l}$  0,56 N HCl i 150  $\mu\text{l}$  0,2% rastvora 2,4-dinitrofenilhidrazina (u 2 M HCl) i inkubirano 30 min na 30°C. U poslednjem koraku je dodat 1 ml 2 N NaOH i apsorbanca je merena na 540 nm. Sva merenja su sprovedena u tri ponavljanja. Aktivnost ACC deaminaze određena je na osnovu količine formiranog  $\alpha$ -ketobutirata, izračunate pomoću standardne krive (Slika 4) konstruisane korišćenjem poznatih koncentracija  $\alpha$ -ketobutirata, a rezultati su prikazani kao: - (nema produkcije), + (slaba produkcija, <1,5  $\mu\text{M}$ ), ++ (umerena produkcija, 1,5 – 3  $\mu\text{M}$ ) i +++ (jaka produkcija, >3  $\mu\text{M}$ ).



Slika 4. Standardna kriva za određivanje koncentracije α-ketobutirata

## Testovi pokretljivosti

Za ispitivanje pokretljivosti odabranih bakterijskih sojeva po tipovima plivanja, rojenja i trzanja, pripremljene su tri različite polučvrste podloge praćenjem uputstava opisanih kod Palma et al. (2022):

- Podloga za ispitivanje pokretljivosti tipa plivanja sadržala je 2,5 g/L hranljivog agara
- Podloga za ispitivanje pokretljivosti tipa rojenja sadržala je 8 g/L hranljivog bujona, 5 g/L glukoze i 5 g/L agara
- Podloga za ispitivanje pokretljivosti tipa trzanja sadržala je 10 g/L triptona, 5 g/L ekstrakta kvasca, 10 g/L NaCl i 10 g/L agara

Na površinu podloga namenjenih za ispitivanje pokretljivosti plivanje i rojenje inokulisano je po 1 μl tečne bakterijske prekonoćne kulture (gajene u LB medijumu na 30°C, 180 rpm), prethodno podešene na optičku guštinu od 0.5 McFarland standarda. Za procenu pokretljivosti tipa trzanja, pojedinačna bakterijska kolonija inokulisana je sterilnom iglom u centralni deo podloge. Nakon inkubacije u trajanju od 24 do 48 časova na temperaturi od 30°C, određivan je prečnik zone migracije bakterija oko mesta inokulacije, čime je procenjena sposobnost pokretljivosti ispitivanih sojeva. Ukoliko je zona bila manja od 1 cm, okarakterisano je da soj ne poseduje sposobnost pokretljivosti (-), ako je zona bila od 1-3 cm, smatrano je da je pokretljivost slaba (+), zona od 3-6 cm podrazumevana je kao dobra sposobnost pokretljivost (++), a za posedovanje izrazite sposobnosti pokretljivosti smatrani su izolati čija je zona bila veća od 6 cm (+++).

## Određivanje sposobnosti formiranja biofilma u mikrotitarskim pločama

Sposobnost formiranja biofilma ispitivana je u mikrotitarskim pločama sa ravnim dnom prema metodologiji opisanoj od strane Stepanović et al. (2007). U svaki bunarić dodavano je 198 μl LB medijuma i 2 μl bakterijske suspenzije prethodno standardizovane na gustinu od 0,5 McFarland jedinica. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, dok je sterilni LB medijum predstavljao negativnu kontrolu. Mikrotitarske ploče inkubirane su 48 h na 30°C. Nakon inkubacije, sadržaj bunarića je uklonjen i tri puta isprani sterilnim 1×PBS puferom (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 0,245 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2) radi uklanjanja bakterijskih ćelija koj se nisu pričvrstile za podlogu. Vezane ćelije fiksirane su zagrevanjem na 65°C tokom 30 minuta. Za

bojenje formiranog biofilma u svaki bunarić dodato je 300  $\mu$ L 0,1% rastvora kristal violet boje, nakon čega su mikrotitar ploče inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi. Višak boje uklonjen je ispiranjem destilovanom vodom, a mikrotitar ploče su zatim osušene na 65°C. U cilju kvantifikacije biofilma, u bunariće je dodat 96% etanol, i nakon inkubacije od 45 minuta, po 100  $\mu$ L sadržaja svakog bunarića prebačeno u novu mikrotitarsku ploču i izmerena je optička gustina na 595 nm. Interpretacija rezultata zasnivala se na određivanju granične vrednosti („cut-off“, OD<sub>c</sub>), definisane kao zbir prosečne optičke gustine negativne kontrole i trostruke vrednosti standardne devijacije:

$$OD_c = OD_{\text{negativne kontrole}} + 3 * SD_{\text{negativne kontrole}}$$

Na osnovu izračunate OD<sub>c</sub> vrednosti, ispitivani sojevi klasifikovani su u četiri kategorije prema sposobnosti formiranja biofilma:

$OD \leq OD_c$  – bez sposobnosti formiranja biofilma (kategorija –)

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$  – slabi producenti biofilma (kategorija +)

$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$  – umereni producenti biofilma (kategorija ++)

$OD \geq 4 \times OD_c$  – jaki producenti biofilma (kategorija +++)

## Molekularne metode

### Izolacija genomske DNK za identifikaciju bakterijskih sojeva

Genomske DNK bakterijskih izolata ekstrahovane su primenom više različitih metoda. Prvi pristup zasnivao se na brzom termolitičkoj ekstrakciji prema proceduri opisanoj od strane Dashti et al. (2009). Pojedinačna bakterijska kolonija sa čvrste podloge resuspendovana je u 100  $\mu$ L destilovane vode, nakon čega je suspenzija inkubirana na 97°C, 10 do 15 min. Dobijeni uzorci su potom centrifugirani pri 15000  $\times$  g u trajanju od 5 do 15 min, a supernatant koji je sadržao oslobođenu DNK prebačen je u sterilne mikrotube i čuvan na -20°C do dalje upotrebe.

Druga metoda je podrazumevala da je jedna bakterijska kolonija inokulisana u tečni hranljivi medijum (LB) i ostavljena da raste preko noći na 30°C, uz šejkiranje, 180 rpm. Nakon inkubacije, 1,5 mL bakterijske kulture je centrifugiran (13000 rpm, 5 min), a dobijeni ćelijski talog resuspendovan je u 500  $\mu$ L TE pufera (10 mM Tris pufer, 1 mM EDTA (eng. EthyleneDiamineTetraacetic Acid), pH 7,6) uz dodatak 10  $\mu$ L lizozima (200  $\mu$ g/mL) i inkubirano 30 min na 37°C. Nakon inkubacije dodato je 100  $\mu$ L 5 M NaCl, homogenizovano vorteksovanjem, a zatim je dodato 250  $\mu$ L 3% cetiltrimetilamonijum bromid (eng. CetylTrimethylAmmonium Bromide - CTAB) pufera (1 M Tris, 1,4 M NaCl, 20mM EDTA, 3% polivinilpirolidon (eng. PolyVinylPyrrolidone - PVP), pH 8,0). Smeša je potom inkubirana na 65°C. U sledećem koraku dodato je 800  $\mu$ L hloroforma, vorteksovano i centrifugiran na 13000 rpm, 10 min. Vodena faza pažljivo je prebačena u nove mikrotube, a taloženje DNK je izvršeno dodavanjem natrijum acetat (pH 5,0) u zapremni jednakoj 1/10 zapremine uzorka, kao i dodatkom jednake zapremine hladnog izopropanola (-20°C). Nakon centrifugiranja (13000 rpm, 15 min) dobijeni talog DNK ispran je sa 1 mL hladnog 96% etanola, centrifugiran (13000 rpm, 10 min) i etanol je uklonjen. Talog je osušen na 37°C i resuspendovan u 50  $\mu$ L TE pufera sa dodatkom RNaze (1  $\mu$ L stoka koncentracije 10 mg/mL u 49  $\mu$ L TE pufera), inkubiran 15 min na 37°C, i tako dobijena DNK čuvana je na temperaturi od -20°C do dalje upotrebe.

Kao treći pristup korišćen je komercijalni kit za izolaciju genomske DNK, Zymo-BIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Ervajn, CA, SAD), pri čemu je postupak sproveden prema detaljnim smernicama koje propisuje proizvođač.

## Lančana reakcija polimeraze - PCR

Genomska DNK izolovanih bakterijskih sojeva korišćena je kao matrica za PCR amplifikaciju i sekvenciranje ciljnih gena. Molekularna identifikacija izolata izvršena je korišćenjem lančane reakcije polimeraze PCR za umnožavanje gena od interesa (Tabela 1). Smeše za PCR reakciju su pripremljene upotrebom DreamTaq™ Green PCR Master Mix 2× (Thermo Fischer Scientific, SAD), koja je sadržala DreamTaq DNA polimerazu, optimizovani DreamTaq pufer, MgCl<sub>2</sub> i smešu dezoksinukleotid-trifosfata, kao i 2X DreamTaq Green pufer sa reagensom za povećanje gustine i dve boje za praćenje procesa elektroforeze. Reakcija je izvršena korišćenjem aparata Veriti 96 well thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Korišćeni programi obuhvatali su inicijalnu denaturaciju na 94°C tokom 30 s, nakon čega su sledili ciklusi hibridizacije u trajanju od 30 s na 50°C (za *16S rRNK* gen), 1 min na 55°C (za *tuf* gen) i 59,5°C (za *gyrB* gen), elongacije na 72°C tokom 90 s, uz završnu elongaciju na 72°C 7 min.

Tabela 1. Spisak korišćenih prajmera i njihove sekvence

| Prajmer  | Sekvenca                   | Referenca                |
|----------|----------------------------|--------------------------|
| UN1-16SF | GAGAGTTTGATCCTGGC          | Jovicic et al. (2009)    |
| UN1-16SR | AGGAGGTGATCCAGCCG          |                          |
| tufGPF   | ACGTTGACTGCCCAGGACAC       | Xu et al. (2023)         |
| tufGPR   | GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA |                          |
| GyrB-F   | MGGCGGYAAGTTCGATGACAAYTC   | Sarkar & Guttman, (2004) |
| GyrB-R   | TRATBKCAGTCARACCTTCRCGSGC  |                          |
| NPR1BvF  | TCATGAAGCTTGTCGTCCTG       | Desoignies et al. (2013) |
| NPR1BvR  | ATACACCTTGCCAGCAATCC       |                          |
| BvMYC2-F | AGTGAGCTTGACGTGCAGTA       | Zhao et al. (2023)       |
| BvMYC2-R | CCCCTCATCTGCCTCAAGAAATAC   |                          |
| BvLOX-F  | ATCGGCAGTTGAGTGCAATG       |                          |
| BvLOX-R  | CTGCCATTCCCCTGCTTACA       |                          |
| BvNCED-F | AGGAACAAACTGGGGAGGAAAA     |                          |
| BvNCED-R | TCCCAATTGATCTCATCGTGC      |                          |
| 25RNK_F  | AGACAAGAAGGGGCAACGAG       | Cui et al. (2022)        |
| 25RNK_R  | CACATTGGACGGGGCTTTTC       |                          |

## Horizontalna elektroforeza ukupne DNK

Kvalitet ukupne izolovane DNK, kao i proizvoda PCR reakcije analiziran je horizontalnom elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Gel je pripremljen rastvaranjem agaroze u 1 × TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA) uz dodatak etidijum bromida u koncentraciji od 0,5 µg/ml, radi vizualizacije DNK fragmenata. Elektroforeza je izvođena u 1 × TAE pufer pri konstantnom naponu od 1 do 10 V/cm, u zavisnosti od veličine fragmenata i željenog stepena razdvajanja. Veličine PCR-amplifikovanih fragmenata određivane su poređenjem dužine pređenog puta analiziranih uzoraka sa standardom poznate molekulske mase (Gene Ruler™ DNA 1 kb Ladder Mix i GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, SAD).

## Prečišćavanje PCR produkata i analiza sekvenci

PCR produkti su prečišćeni korišćenjem kita za prečišćavanje PCR produkata (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputstvu proizvođača. Prečišćeni PCR proizvodi su poslani na uslužno sekvenciranje u Eurofins (Keln, Nemačka). Dobijene nukleotidne sekvence analizirane su pomoću

BLAST algoritma (eng. Basic Local Alignment Search Tool) u okviru NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information) baze podataka (Altschul et al., 1997) radi identifikacije homolognih sekvenci i utvrđivanja filogenetski najrodnijih mikroorganizama.

## Izolacija ukupne DNK iz rizosfere i filosfere za sekvenciranje nove generacije

Raznovrsnost bakterija u rizosferi i filosferi analizirana je primenom NGS (eng. Next Generation Sequencing). Uzorci rizosfere pripremljeni su tretiranjem biljnog materijala u ultrazvučnom kupatilu (Bandelin conorex, Berlin, Nemačka) tokom 10 minuta na 35 kHz, nakon čega je sakupljeno zemljište koje je bilo pričvršćeno za koren, kao i materijal s površine korena, kako bi se dobio uzorak koji obuhvata bakterije epifite i endofite. Izolacija DNK iz rizosfernih uzoraka (250 mg po uzorku) izvršena je korišćenjem Zymo-BIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Ervajn, CA, SAD) prema uputstvu proizvođača. Uzorci filosfere (po jedan list po uzorku) isečeni su na sitne fragmente i inkubirani u 1× PBS pufer (Sigma Aldrich, UK), uz mešanje na rotacionom šejkeru (150 rpm) tokom 15 minuta na 22°C. Nakon pripreme biljnog materijala, po 100 mL svakog uzorka filtrirano je kroz 0,22 µm Isopore™ membranske filtere (Merck Millipore Ltd., Karigtohil, Irska), a ukupna DNK izolovana je istim kitom prema uputstvu proizvođača. Koncentracija DNK određena je spektrofotometrijski na uređaju NanoPhotometer (IMPLEN, Minhen, Nemačka). Uzorci su poslani na komercijalno sekvenciranje u kompaniji Novogene (Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd. Kembridž, UK). Korišćeni su prajmeri za umnožavanje V3 i V4 regiona *16S rRNA* gena.

## Sekvenciranje DNK i analiza podataka

Umnoženi *16S rRNA* geni su sekvencirani na Illumina NovaSeq PE250 platformi sa generisanjem 250 bp uparenih krajeva sirovih očitavanja (eng. paired-end raw reads, Raw PE). Sirovi podaci sekvenciranja spojeni su korišćenjem programa FLASH (V1.2.7) (Magoč & Salzberg, 2011). Nakon spajanja, sekvence su filtrirane prema kriterijumima kvaliteta (Bokulich et al., 2013) Qiime program (V1.7.0) (Caporaso et al., 2010), čime su dobijene očišćene sekvence (eng. Clean Tags). Detektovanje i uklanjanje himera izvršeno je korišćenjem algoritma UCHIME (Edgar et al., 2011), čime su dobijene efektivne sekvence (eng. Effective Tags) za dalju analizu. U istraživanju su korišćene 16S rRNA sekvence koje ciljaju V3 i V4 regione gena. Analiza sekvenci sprovedena je korišćenjem programa Uparse (v7.0.1090) (Edgar, 2013). Sekvence sa ≥97% sličnosti grupisane su u iste operacione taksonomske jedinice (eng. Operational Taxonomic Units, OTU). Taksonomska anotacija reprezentativnih sekvenci OTU izvršena je poređenjem sa SSU rRNA sekvencama iz SILVA 138 baze podataka, primenom odgovarajućeg klasifikacionog algoritma (Q. Wang et al., 2007). Za utvrđivanje filogenetskih odnosa svih OTU reprezentativnih sekvenci korišćen je program MUSCLE (Edgar, 2004). Zastupljenost OTU je normalizovana prema uzorku sa najmanjim brojem očitavanja.

## Analiza diverziteta

Analize alfa i beta diverziteta sprovedene su na normalizovanim podacima. Alfa diverzitet je korišćen za procenu složenosti biodiverziteta unutar uzorka pomoću šest indeksa: Observed-species, Chao1, Shannon, Simpson, ACE i Good-coverage. Svi indeksi su izračunati u Qiime programu (v1.7.0) i prikazani korišćenjem programa R (v2.15.3). Statistička značajnost između grupa testirana je Wilcoxon ranksum testom, pri čemu su p-vrednosti <0,05 smatrane značajnim. Beta diverzitet je korišćen za procenu razlika u složenosti vrsta među uzorcima i analiziran je na osnovu UniFrac distance matrica u Qiime programu (v1.7.0). Pre klaster analize izvršena je analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis, PCA) radi smanjenja dimenzionalnosti podataka, koristeći FactoMineR i ggplot2 paketa u programu R. Za vizualizaciju višedimenzionalnih podataka korišćena je analiza glavnih koordinata (eng. Principal Coordinate Analysis, PCoA). UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Means) hijerarhijsko grupisanje primenjeno je za interpretaciju distance matrice koristeći prosečne veze u Qiime programu. Analiza razlika između zajednica sprovedena je korišćenjem ANOSIM, MRPP i adonis funkcija u programu R (Vegan paket), dok je AMOVA izračunata u Mothur korišćenjem amova funkcije. Značajnost svih analiza razlika

između zajednica predstavljena je p-vrednostima  $<0,05$ . T-test je korišćen za identifikaciju značajnih razlika između grupa ( $p<0,05$ ) na različitim taksonomskim nivoima, a vizualizacija je izvedena u programu R (v2.15.3).

## Ispitivanje biokontrolnog potencijala izabranih izolata

### Selekcija biokontrolnih sojeva i provera međusobne antagonističke aktivnosti

Na osnovu rezultata prethodnih analiza odabrani su sojevi *Bacillus safensis* MRh275, *B. pseudomycooides* JRh226 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266, koji su u *in vitro* uslovima pokazali najizraženiji biokontrolni potencijal i koji su se isticali po svojim PGP karakteristikama. Pored pojedinačnih sojeva, formiran je i bakterijski konzorcijum (T2) kombinovanjem sojeva *B. safensis* MRh275 i *S. maltophilia* JRh266. Sojevi MRh275, JRh226 i JRh266 testirani su u okviru unakrsnog antagonističkog testa primenom disk difuzionog metoda. Svaki soj je korišćen i kao indikator soj i kao antagonistički soj. U polučvrst LA medijum (7 g/L agara) dodat je indikatorski soj u finalnoj koncentraciji od 1%, nakon čega je podloga izlivena u Petri šolje sa prethodno postavljenim bunarićima. Nakon očvršćavanja, bunarići su uklonjeni i na njihovo mesto je inokulisano 50  $\mu$ L prekonoćne kulture svakog ispitivanog soja, gajenog u LB medijumu na rotacionom šejkeru (150 rpm) na 30°C. Petri šolje inkubirane su 24 h na 30°C.

### Određivanje krive rasta

Krive rasta pojedinačnih sojeva određene su tokom rasta sojeva u LB medijumu praćenjem broja živih ćelija tokom 30 sati na svaka dva sata. Optička gustina pri 600 nm ( $OD_{600}$ ) prekonoćnih kultura korelisana je sa brojem kolonija (CFU/ml) (eng. Colony-Forming Unit – CFU) radi izrade kalibracionih kriva za procenu koncentracije bakterija. Za eksperimente u kokulturi, prekonoćne kulture su podešene tako da imaju isti CFU/ml, nakon čega su sojevi dodati u jednakim razmerama radi formiranja konzorcijuma. Kokultura je inokulisana u svež LB medijum i inkubirana na 30°C uz aeraciju (150 rpm). Tokom prvih osam sati uzorci su uzimani u intervalima od po dva sata, a zatim su uzorci uzeti nakon 24 i 48 časova. Uzorci su serijski razblaživani i zasejavani na LA podlogu radi određivanja broja kolonija po mililitru. Pojedinačni sojevi u okviru konzorcijuma razlikovani su na osnovu morfologije kolonija na čvrstoj podlozi. Krive rasta za svaki soj u okviru konzorcijuma konstruisane su na osnovu broja živih ćelija.

### Formiranje konzorcijuma

Sojevi *Bacillus safensis* MRh275 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266, odabrani za formiranje konzorcijuma, gajeni su preko noći u LB tečnom medijumu. Izmerena je optička gustina pri 600 nm ( $OD_{600}$ ), nakon čega su kulture centrifugirane, isprane sterilnom vodom i resuspendovane do standardizovanih koncentracija u zavisnosti od eksperimentalnog pristupa. Bakterijski konzorcijum pripremljen je mešanjem jednakih zapremina pojedinačnih bakterijskih suspenzija ovih sojeva u odnosu 1:1 (v/v). Dobijena suspenzija homogenizovana je u sterilnim uslovima i pripremljena neposredno pre primene.

### Utvrđivanje biokontrolnog potencijala izabranih sojeva na biljkama šećerne repe

*In planta* ispitivanje sprovedeno je u dva pristupa, indirektne i direktne biokontrole. Kod indirektne biokontrole, semena su najpre sterilisana natrijum-hipohloritom i etanolom, na način opisan u odeljku „Ispitivanje uticaja mikroorganizama na klijavost semena“. Sterilisana semena su zatim tretirana odabranim sojem (*Bacillus safensis* MRh275, *B. pseudomycooides* JRh226 ili *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266) ili konzorcijumom (T2) (koncentracije  $10^9$  CFU/mL) u trajanju od 1 h, nakon čega su osušena na sobnoj temperaturi. Seme kontrolne grupe tretirano je sterilnom destilovanom vodom. Sva semena posejana su u plastične saksije ( $10 \times 10 \times 10$  cm) ispunjene prethodno sterilisanim komercijalnim supstratom (Plagron, LightMix, Holandija), pri čemu je u svaku saksiju dodato tri semena. Saksije su postavljene u boks za uzgajanje i održavane pod kontrolisanim uslovima

( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperiod 16/8 h), uz redovno zalivanje. Eksperiment je organizovan po potpuno slučajnom rasporedu, a položaj saksija menjan je jednom nedeljno radi smanjenja uticaja mikroklimatskih varijacija. Nakon formiranja biljaka do stadijuma četiri prava lista, izvršena je inokulacija patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21 u koncentraciji od  $10^4$  CFU/mL u naličje tri lista kod pet biljaka po grupi, gde su grupe: C i, MRh275 i, JRh226 i, JRh266 i i T2 i. Kontrolne biljke ostale su neinokulisane (C, MRh275, JRh226, JRh266 i T2). U okviru direktne biokontrole, seme je sterilisano i zasejano bez prethodnog tretmana bakterijama. U fazi četiri prava lista biljke su podeljene u četiri grupe: neinokulisana kontrola (C), biljke inokulisane patogenom (C i) finalne koncentracije  $10^4$  CFU/mL, biljke inokulisane biokontrolnim sojem (*Bacillus safensis* MRh275, *B. pseudomycoides* JRh226 ili *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266) ili konzorcijumom (T2) ( $10^8$  CFU/mL) i biljke istovremeno inokulisane patogenom ( $10^4$  CFU/mL) i biokontrolnim sojem ( $10^8$  CFU/mL) u odnosu 1:4. U svim tretmanima, po 100  $\mu\text{L}$  suspenzije ubrizgano je sterilnom špricom na naličje tri potpuno razvijena lista u pet različitih biljaka u okviru jedne grupe. Pet dana nakon inokulacije, listovi su sakupljeni i skenirani kompjuterskim skenerom. Nekrotične lezije su merene pomoću softvera ImageJ (Fiji bundle, 2.9.0). Uzorci listova su zatim homogenizovani u tečnom azotu i čuvani na  $-80^\circ\text{C}$  do daljih analiza.

### Priprema enzimskih ekstrakata i kvantifikacija proteina

Enzimski ekstrakt 1 (EE1) pripremljen je prema metodologiji opisanoj kod Lozo et al. (2022). Za ekstrakciju je upotrebljeno 200 mg biljnog materijala poreklom iz listova, prethodno samlevenih u tečnom azotu. Uzorci su resuspendovani u 500  $\mu\text{L}$  50 mM hladanog kalijum-fosfatnog pufera, pH 7, sa dodatkom 1 mM EDTA. Tokom ekstrakcije, uzorci su održavani na niskoj temperaturi radi očuvanja enzimske aktivnosti i povremeno kratko vorteksovani radi homogenizacije. Sledeći korak uključivao je centrifugiranje (30 min, 13000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ). Supernatant je sakupljen i čuvan na  $-80^\circ\text{C}$  do dalje analize.

Za pripremu enzimskog ekstrakta 2 (EE2) korišćeno je 500 mg biljnog materijala kojem je dodato 750  $\mu\text{L}$  hladnog 50mM Tris-HCl pufera (pH 7,5). Nakon homogenizacije na ledu i centrifugiranja pri 18000 rpm tokom 20 minuta na  $4^\circ\text{C}$ , supernatant je prebačen u nove mikrotube i čuvan na  $-80^\circ\text{C}$  do dalje upotrebe.

Ukupna koncentracija proteina određena je pomoću Bradfordove metode (Bradford, 1976). Reakciona smeša sadržala je 750  $\mu\text{L}$  Bradfordovog reagensa (Sigma-Aldrich, SAD) i 25  $\mu\text{L}$  enzimskog ekstrakta 1. Posle inkubacije 5 minuta na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanca na 595 nm. Koncentracija proteina izračunata je korišćenjem jednačine standardne krive.

### Kvantifikacija vodonik peroksida u listovima šećerne repe

Sadržaj vodonik peroksida u uzorcima određivan je spektrofotometrijski prema proceduri Junglee et al. (2014). Metoda se zasniva na reakciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  sa kalijum-jodidom u kiseloj sredini, pri čemu dolazi do oksidacije jodidnih jona i formiranja trijodidnog kompleksa. Nastali kompleks izaziva pojavu žute obojenosti rastvora, čije je intenzitet proporcionalan koncentraciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  u uzorku. Za analizu je korišćeno 150 mg listova, prethodno homogenizovanih u tečnom azotu. Uzorcima je dodat 1 mL ekstrakcionog pufera, sastavljen od 0,25 mL 10 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 5,8), 0,25 mL 0,1% trihlorsirćetne kiseline (eng. TriChloroacetic Acid TCA) i 0,5 mL 1 M KI. Homogenizacija je sprovedena na ledu tokom 10 min uz zaštitu od svetlosti radi sprečavanja razgradnje  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nakon homogenizacije izvršeno je centrifugiranje 13000 rpm tokom 10 min na temperaturi od  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant je izdvojen, dodatno pročišćen ponovnim centrifugiranjem i potom inkubiran u mraku 20 min. Apsorbanca je merena na 350 nm, a koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  izračunata je primenom Lambert-Berovog zakona:

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

gde je A – izmerena apsorbanca,  $\varepsilon$  – molarni ekstikcioni koeficijent ( $0,28 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), I – dušina optičkog puta, C – koncentracija vodonik-peroksida. Dobijene vrednosti izražene su kao nmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  po gramu sveže mase biljnog tkiva.

### Određivanje aktivnosti ukupne peroksidaze i superoksid dismutaze

Aktivnost ukupne peroksidaze (eng. peroxidase - POD) određena je spektrofotometrijski praćenjem oksidacije gvajakola u prisustvu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pri čemu dolazi do formiranja obojenog produkta. Metoda je sprovedena prema protokolu Poodeetip et al. (2012) uz određene modifikacije. Reakciona smeša pripremljena je direktno u kivetama i sadržala je 300  $\mu\text{L}$  50 mM Tris-HCl pufera (pH 7,5), 100  $\mu\text{L}$  0.1% gvajakola, 100  $\mu\text{L}$  enzimskog ekstrakta 2 i 100  $\mu\text{L}$  1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reakcija je započinjala nakon dodavanja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a promena apsorbanca praćena je na 470 nm odmah po dodavanju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i nakon 3 min inkubacije. Aktivnost POD izražena je kao promena apsorbanca po minuti po gramu biljnog tkiva ( $\Delta A/\text{min/g}$  biljnog tkiva), pri čemu je:

$$\Delta A = A_{3\text{min}} - A_0$$

gde je  $A_{3\text{min}}$  - apsorbanca nakon 3 min,  $A_0$  - početna apsorbanca neposredno nakon dodavanja  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Aktivnost superoksid dismutaze (eng. SuperOxide Dismutase - SOD) određivana je metodom zasnovanom na inhibiciji fotohemijske redukcije nitroplavogtetrazolijuma (eng. NitroBlueTetrazolium - NBT) prema Beauchamp & Fridovich (1971). U prisustvu riboflavina, metionina i kiseonika dolazi do stvaranja superoksidnih radikala koji redukuju NBT do plavo obojenog formazana. Prisustvo SOD smanjuje koncentraciju superoksidnih radikala, čime se inhibira formiranje formazana i smanjuje intenzitet plave boje rastvora. Reakciona smeša sadržala je 1305  $\mu\text{L}$  50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,8), 150  $\mu\text{L}$  130 mM metionina, 10  $\mu\text{L}$  11.25 mM NBT, 25  $\mu\text{L}$  enzimskog ekstrakta 1 i 10  $\mu\text{L}$  30 mM riboflavina. Nakon dodavanja riboflavina, uzorci su promućkani i inkubirani 8 min uz izlaganje svetlosti radi generisanja superoksidnih radikala, dok se blank uzorak držan u mraku. Po završetku inkubacije, apsorbanca je merena na 560 nm. Procenat inhibicije redukcije NBT izračunat je prema sledećoj formuli:

$$\text{inhibicija redukcije NBT} - a (\%) = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{kontrola}}} \times 100\%$$

gde je  $A_{\text{kontrola}}$  - apsorbanca kontrolnog uzorka,  $A_{\text{test}}$  - apsorbanca ispitivanog uzorka. Jedna jedinica aktivnosti SOD (1U) definisana je kao količina enzima koji izaziva 50% inhibicije redukcije NBT. Aktivnost enzima izračunata je prema jednačini:

aktivnost SOD (U) = 50% inhibicije redukcije NBT. Dobijene vrednosti izražene su kao U/mg proteina.

### Analiza aktivnosti fenilalanin amonijum-lijaze

Aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze (eng. Phenylalanine Ammonia-Lyase - PAL) određena je spektrofotometrijski praćenjem formiranja transcinamične kiseline nastale deaminacijom L-fenilalanina. Metoda je sprovedena prema modifikovanom postupku opisanom kod Kleinhofs et al. (1966). Reakciona smeša sadržala je 500  $\mu\text{L}$  50 mM Tris-HCl pufera (pH 8,8), 100  $\mu\text{L}$  enzimskog ekstrakta 2 i 600  $\mu\text{L}$  1mM L-fenilalanina. Nakon pripreme, uzorci su inkubirani 60 min na  $40^\circ\text{C}$ . Po završetku inkubacije, reakcija je zaustavljena dodatkom 1 mL 2N HCl. Količina nastale transcinamične kiseline određena je merenjem apsorbanca na 290 nm. Aktivnost PAL enzima izražena je kao  $\mu\text{g}$  nastale transcinamične kiseline po gramu sveže mase biljnog tkiva.

### Izolacija ukupne RNK iz biljnog materijala, tretman DNazom i reverzna transkripcija

Sakupljeni listovi šećerne repe prethodno su homogenizovani u tečnom azotu upotrebom avana i tučka. Za ekstrakciju ukupne RNK upotrebljeno je 70 mg ovako usitnjenog biljnog tkiva, a ekstrakcija je sprovedena korišćenjem komercijalno dostupnog kita RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden,

Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Čistoća i koncentracija RNK određeni su pomoću NanoPhotometer spektrofotometra (IMPLEN, Minhen, Nemačka), dok je integritet uzoraka dodatno proveren korišćenjem horizontalne elektroforeze na 1% agaroznom gelu. Izolovani RNK uzorci čuvani su na  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljih analiza. Izolovana RNK je podvrgnuta tretmanu DNazom (DNase I, RNase-free Kit, Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija), radi uklanjanja eventualnih tragova genomske DNK pre sinteze komplementarne DNK (cDNK). Reverzna transkripcija izvršena je korišćenjem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija), prema protokolu proizvođača. Kvalitet sintetisane cDNK dodatno je proveren horizontalnom elektroforezom na 1% agaroznom gelu pre izvođenja daljih analiza ekspresije gena.

### Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu - qPCR

Relativni nivoi ekspresije gena *NPRI* (*NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1*), *MYC2* (*MYELOCYTOMATOSIS 2*), *LOX* (*LIPOXYGENASE*) i *NCED* (*NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE*) određeni su metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (qPCR) primenom genski specifičnih prajmera (Tabela 1). Reakcije su izvođene korišćenjem SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) na uređaju StepOnePlus™ Real-Time PCR System sa 96 bunarića (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD). Ukupna zapremina reakcione smeše iznosila je 10  $\mu\text{L}$  i sadržala je 5  $\mu\text{L}$  SYBR Green Master Mix-a, forward i reverse prajmere u finalnoj koncentraciji od 400 nM, 2  $\mu\text{L}$  cDNK uzorka normalizovane koncentracije (svi uzorci dovedeni na jednaku koncentraciju), kao i odgovarajuću količinu vode do finalne zapremine. Kao negativne kontrole korišćene su reakcije bez matrice, radi provere moguće kontaminacije reagenasa, kao i RT negativne (RT-) kontrole, dobijene tokom sinteze cDNK, koje su služile za proveru prisustva ostataka genomske DNK. Specifičnost umnožavanja dodatno je obezbeđena dizajnom prajmera koji obuhvataju egzon-egzon granice, čime je smanjena mogućnost amplifikacije genomske DNK.

RT-qPCR reakcije izvođene su primenom sledećeg programa: početna inkubacija na  $50^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 2 min, inicijalna denaturacija na  $95^{\circ}\text{C}$  tokom 10 min, nakon čega je sledilo 40 ciklusa denaturacije na  $95^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 15 s i zajedničkog koraka vezivanja prajmera i sinteze na  $60^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 1 min. Relativni nivo ekspresije ciljanih gena određen je primenom  $\Delta\Delta\text{Ct}$  vrednosti, uz normalizaciju u odnosu na referentni gen *25S rRNK*. Promene u ekspresiji gena izračunate su u odnosu na netretiranu i neinficiranu kontrolna grupa.

### Statistička obrada i analiza podataka

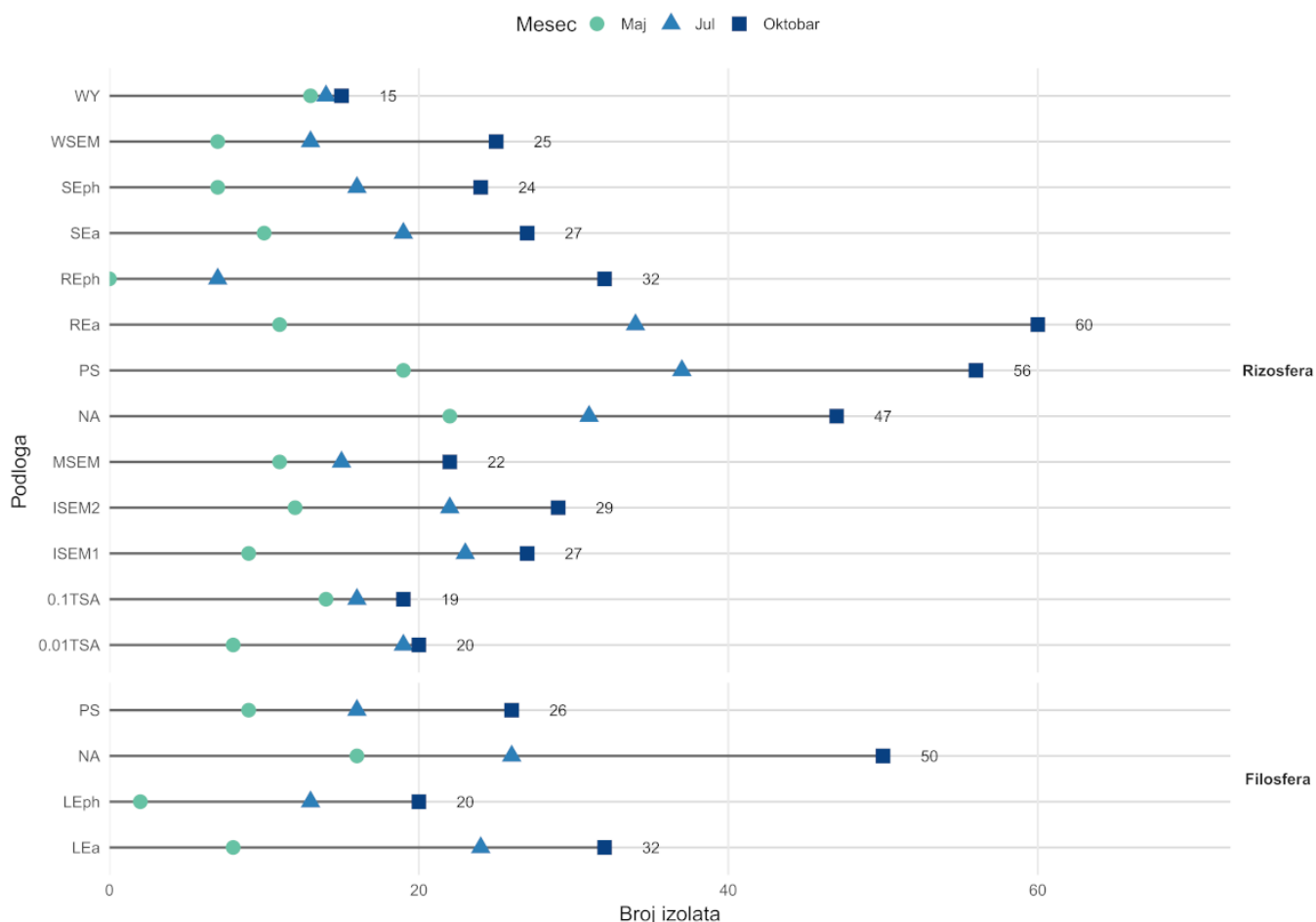
Svi eksperimenti su sprovedeni u tri biološka ponavljanja. Za grafičku vizualizaciju odabranih rezultata metabarkodiranja korišćen je paket ggplot2 u okruženju RStudio (verzija 2026.06.0+242), okviru programskog jezika R (verzija 4.6.1). Ostatak statističke analize podataka izvršeno je korišćenjem softvera GraphPad Prism verzija 9.0.0 za Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Za analizu podataka primenjena je jednofaktorijska analiza varijanse (one-way ANOVA), nakon čega su, u zavisnosti od poređenja, korišćeni odgovarajući post hoc testovi. Poređenja između tretiranih uzoraka i kontrolne grupe izvršena su primenom Dunnett-ovog testa višestrukih poređenja, dok su poređenja između pojedinačnih tretmana koji čine konzorcijuma i samog konzorcijuma analizirana Šidák-ovim testom višestrukih poređenja. Za analizu podataka dobijenih RT-qPCR metodom korišćen je Tukey-ev post hoc test. Za sve statističke analize nivo statističke značajnosti postavljen je na  $p < 0,05$ .

# REZULTATI

## Izolacija i karakterizacija bakterija mikrobioma šećerne repe sa potencijalom za stimulaciju biljnog rastenja

Uzorci rizosfere i filosfere šećerne repe prikupljeni su nakon tri, pet i osam meseci vegetacije, odnosno u maju, julu i oktobru i korišćeni su za izolaciju bakterija na različitim hranljivim podlogama. Primjenjene podloge razlikovale su se po sastavu, izvoru ugljenika, mineralnih soli i agenasa za očvršćavanje, a pojedine su bile obogaćene i ekstraktom lista, korena ili zemljišta da bi izolovane bakterijske vrste bile što raznovrsnije. Kolonije koje su se morfološki razlikovale dalje su okarakterisane primenom biohemijskim testovima, koji su obuhvatali ispitivanje produkcije egzoenzima. Ovi testovi su sprovedeni na ukupno 635 izolata, a rezultati su prikazani u Prilogu 1.

Na osnovu navedenih testova, izolati su preliminarno okarakterisani, nakon čega je 531 izolat odabran za dalje analize. Od ukupnog broja odabranih izolata, 403 izolata poticala su iz rizosfere, dok je 128 izolata izolovano iz filosfere šećerne repe (Slika 5).

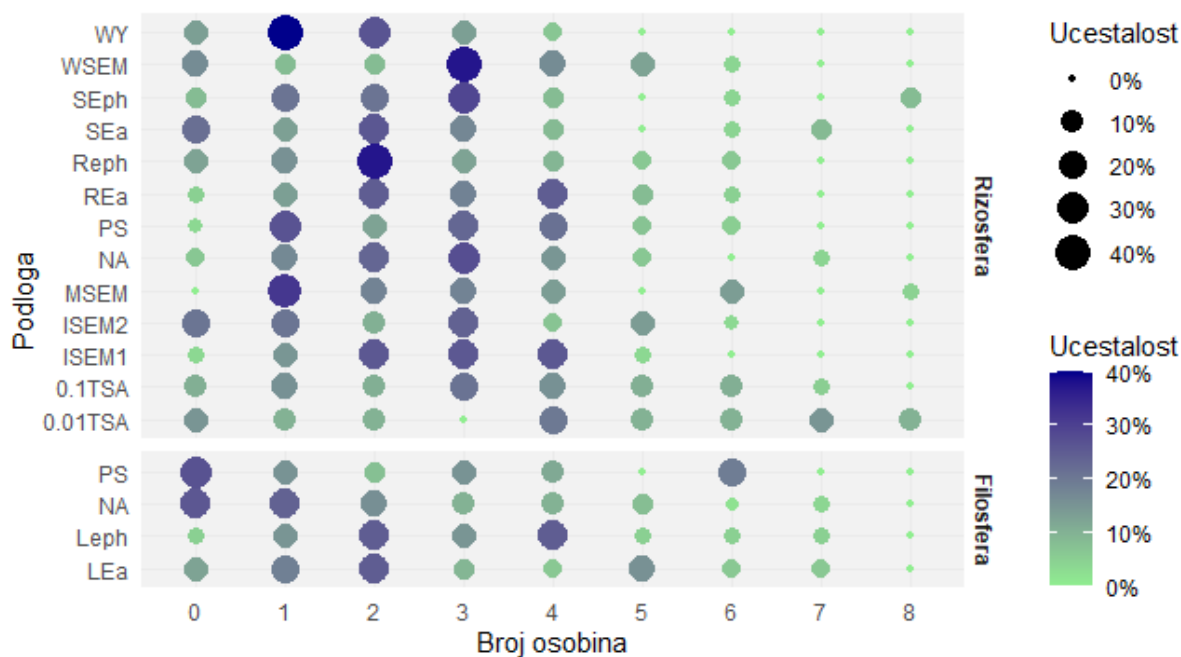


Slika 5. Broj bakterijskih izolata na korišćenim podlogama iz rizosfere i filosfere šećerne repe uzorkovane tokom jedne vegetacijske sezone.

Najveći broj izolata iz rizosfere dobijen je na podlozi REa (eng. Root Extract agar), obogaćenoj ekstraktom korena šećerne repe, gde je izolovano 60 izolata. Najmanji broj izolata (15) registrovan je na podlozi WY (eng. Water Yeast), koja je sadržala ekstrakt kvasca kao izvor ugljenika. Kada je reč o filosferi, najveći broj izolata (50) dobijen je na komercijalnoj NA (eng. Nutrient Agar) podlozi, dok je najmanji broj izolata (20) zabeležen na podlozi LEph (eng. Leaf Extract phytagel), koja je sadržala ekstrakt lista i fitagel. Svi izolati testirani su na prisustvo deset osobina značajnih za

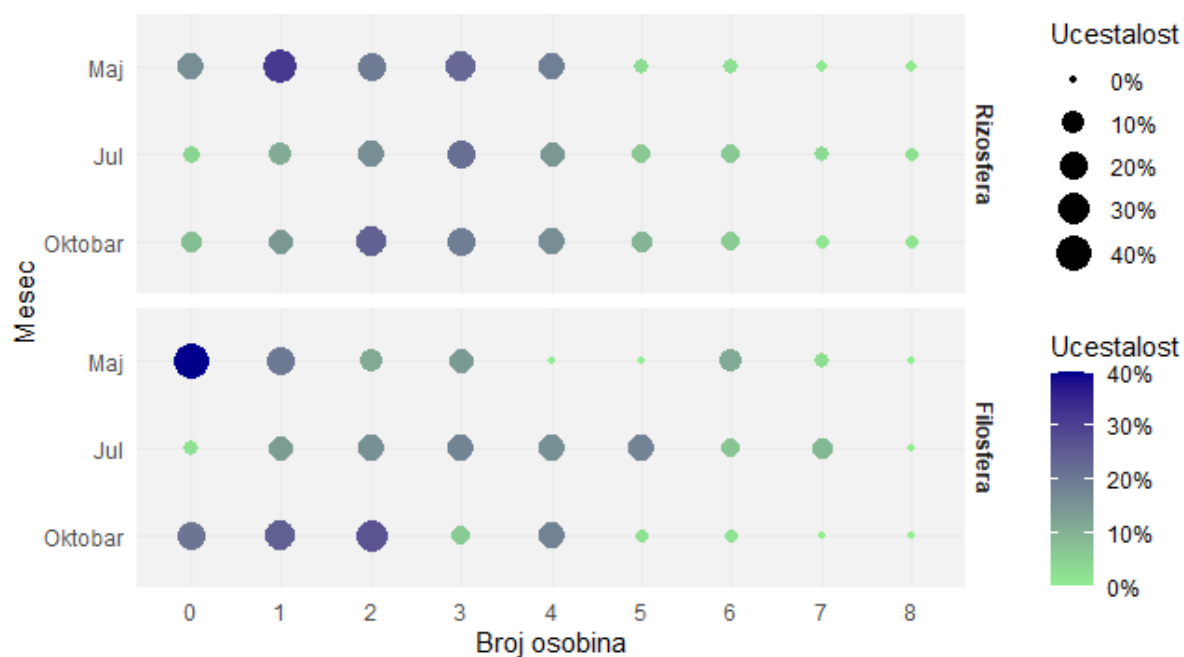
stimulaciju biljnog rastinja i biološku kontrolu patogena. Ispitivane su osobine koju su obuhvatale sposobnost stimulacije klijavosti, produkciju egzopolisaharida, siderofora, cijanovodonika (HCN), solubilizaciju fosfata, kao i antagonističku aktivnost prema patogenima šećerne repe, uključujući tri soja bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P16, P21 i CFBR2437, kao i gljiva *Fusarium oxysporum* i *Rhizoctonia solani*.

Za svaki izolat određen je broj istovremeno prisutnih osobina značajnih za stimulaciju biljnog rastinja, nakon čega su izolati grupisani prema broju detektovanih osobina. Takođe, analizirana je učestalost izolata sa određenim brojem udruženih osobina na različitim podlogama (Slika 6), kako bi se utvrdile najpogodnije podloge za izolaciju bakterija sa osobina značajnim za stimulaciju biljnog rastinja iz mikrobioma šećerne repe.



Slika 6. Učestalost izolata sa određenim brojem istovremeno prisutnih osobina koje promovišu rastenje biljaka u odnosu na ukupan broj izolata dobijenih sa različitim podloga. Brojevi od 0 do 8 predstavljaju broj istovremeno prisutnih osobina koje promovišu rastenje biljaka.

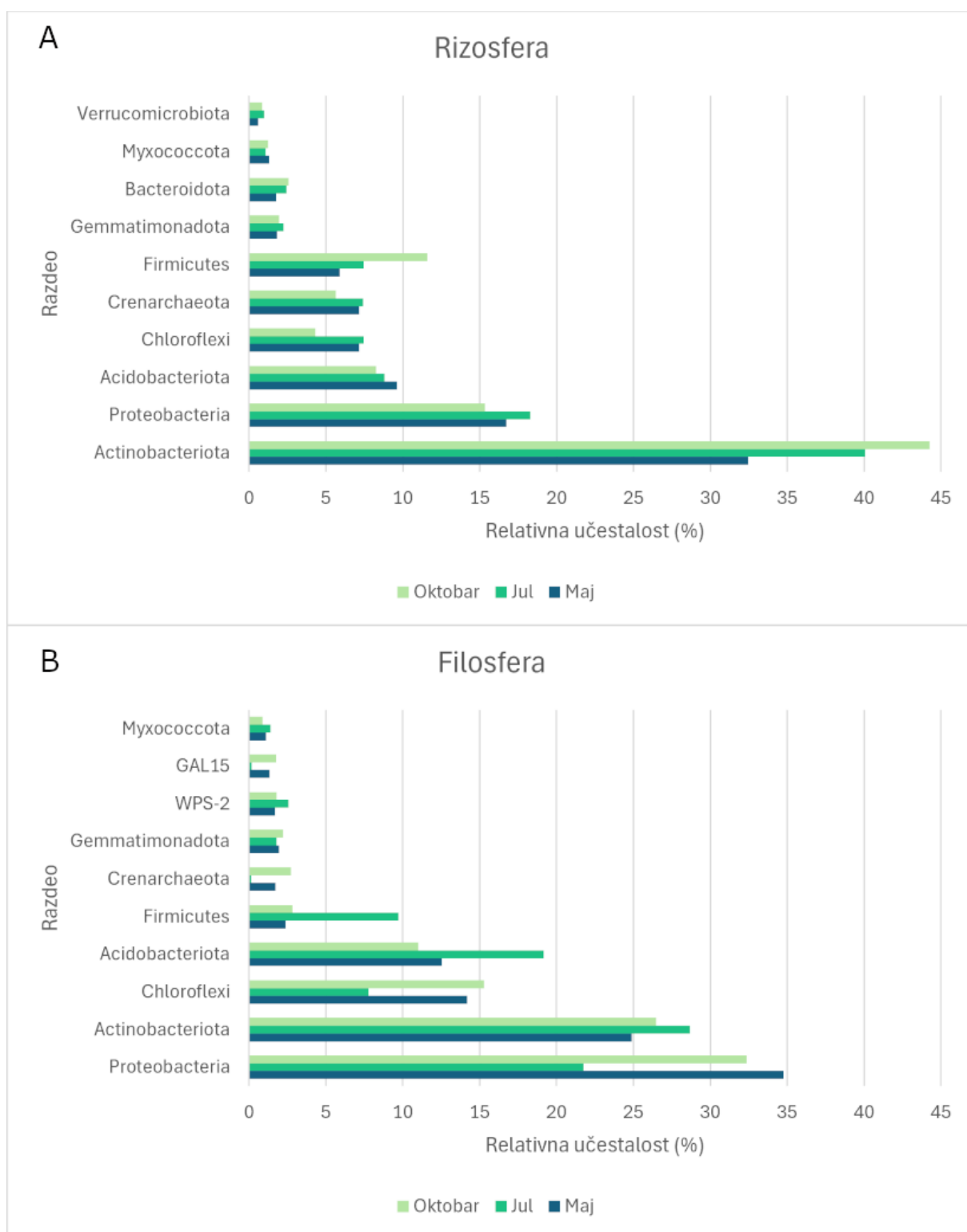
Najveći broj istovremeno prisutnih osobina iznosio je osam, a takvi izolati zabeleženi su isključivo u rizosferi. Najveća učestalost ovih izolata utvrđena je na podlozi 0,01 TSA (eng. 0,01 Tryptic Soya Agar), dok su se, sa nižom učestalošću, javljali i na podlogama SEph (eng. Soil Extract phytigel – podloga koja je sadržala ekstrakt zemljišta i fitagel kao sredstvo očvršćavanja) i MSEM (eng. Methanol Soil Extract Medium – podloga koja je sadržala metanolni ekstrakt zemljišta). Nasuprot tome, najveći broj izolata koji nisu posedovali nijednu od ispitivanih osobina izolovan je sa podloge SEa (eng. Soil Extract agar - podloga sa ekstrakt zemljišta i agarom). U filosferi je maksimalan broj istovremeno prisutnih osobina iznosio sedam. Izolati sa ovim brojem osobina najčešće su izolovani sa podloge LEa (eng. Leaf Extract agar) obogaćene ekstraktom lista šećerne repe, dok su prisutni bili i na podlogama Leph i NA. S druge strane, najveći broj izolata bez ispitivanih osobina dobijen je na PS podlozi, koja se sastojao od tri odvojena rastvora spojena nakon autoklaviranja. Ova podloga se ujedno izdvojila kao jedina podloga na kojoj nisu detektovani izolati sa sedam osobina značajnih za stimulaciju biljnog rastinja. Analiza prema periodu uzorkovanja pokazala je da je najveća učestalost izolata sa većim brojem istovremeno prisutnih osobina značajnih za stimulaciju biljnog rastinja registrovana u julu, kako u rizosferi tako i u filosferi. S druge strane, najveća učestalost izolata bez detektovanih osobina zabeležena je u maju, i to u oba tipa uzorka (Slika 7).



Slika 7. Učestalost izolata sa određenim brojem istovremeno prisutnih osobina koje promovišu rastenje biljaka u odnosu na mesec uzorkovanja. Brojevi od 0 do 8 predstavljaju broj istovremeno prisutnih osobina koje promovišu rastenje biljaka.

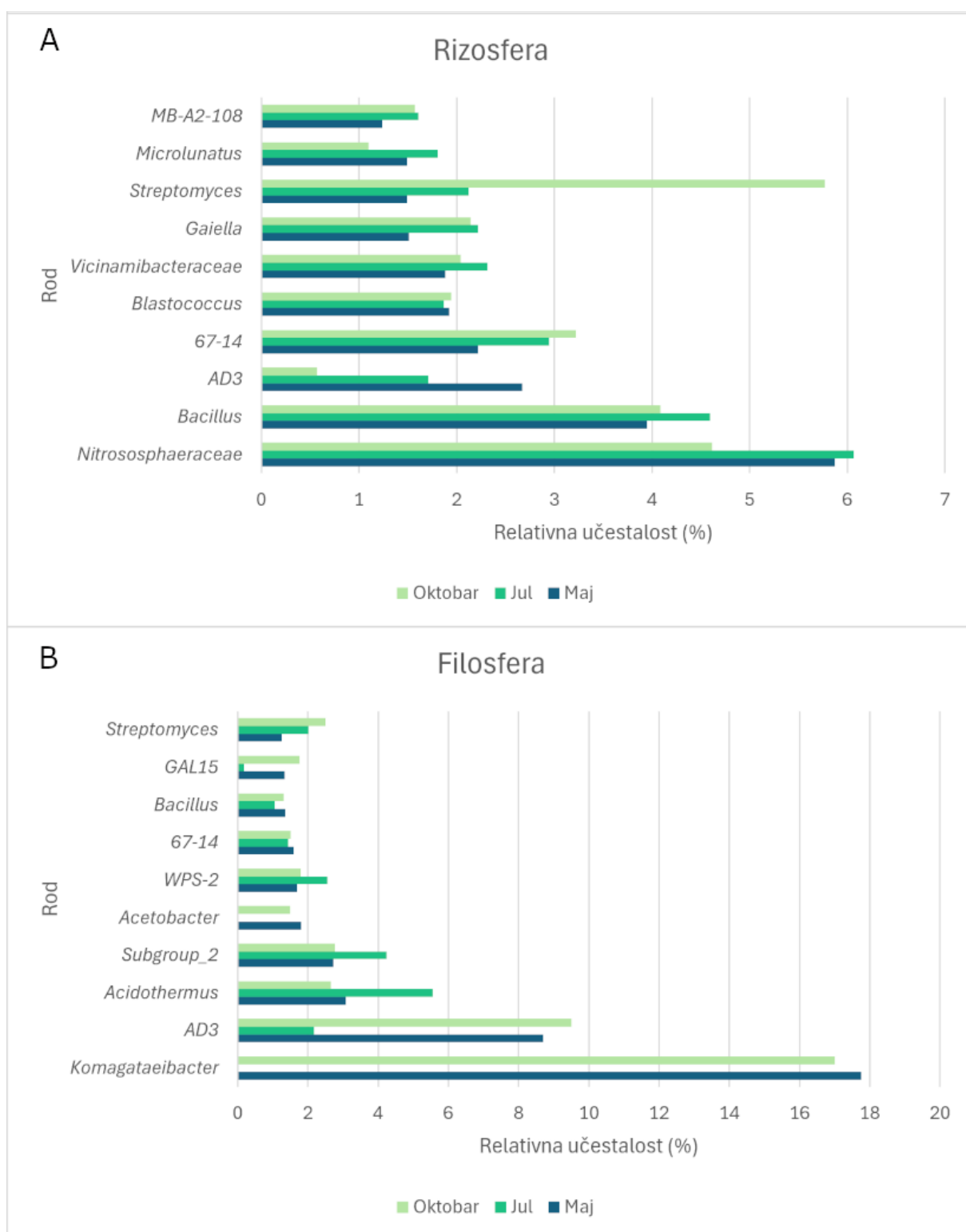
## Analiza sezonske promene rizobioma i filobioma šećerne repe primenom metabarkodiranja *16S rRNA* gena

Uzorci rizosfere i filosfere šećerne repe, prethodno analizirani metodom kultivacije, korišćeni su i za metabarkodiranje. Mikrobijalne zajednice analizirane su metodom metabarkodiranja *16S rRNA* gena. Podaci su uneti u GenBank bazu podataka (NCBI) pod BioProject Accession brojem PRJNA939425. Relativna zastupljenost detektovanih taksona određena je na nivou razdela, rodova i vrsta. Na nivou razdela, na Slici 8 prikazano je deset najzastupljenijih razdela u analiziranim uzorcima rizosfere i filosfere šećerne repe. U oba analizirana uzorka dominirali su pripadnici razdela Actinobacteriota i Proteobacteria. Pored njih, razdeli Chloroflexi, Acidobacteriota i Firmicutes bili su zastupljeni sa više od 2% i u rizosferi i u filosferi. Razdeo Myxococcota detektovan je u oba tipa uzoraka, ali njegova relativna zastupljenost nije prelazila 1,5%. Među deset najzastupljenijih razdela u uzorcima rizosfere detektovani su i Verrucomicrobiota i Bacteroidota, dok ova dva razdela nisu bila među deset dominantnih u uzorcima filosfere.



Slika 8. Relativna zastupljenost razdela u mikrobiomu šećerne repe, određena metabarkodiranjem gena *16S rRNA* u rizosferi (A) i filisferi (B). Prikazano je deset najzastupljenijih razdela za svaki uzorak.

Analiza relativne zastupljenosti rodova pokazala je razlike u sastavu mikrobnih zajednica između rizosfere i filisfere šećerne repe. Na Slici 9 prikazano je deset najzastupljenijih rodova detektovanih u analiziranim uzorcima.



Slika 9. Relativna zastupljenost rodova u mikrobiomu šećerne repe, određena metabarkodiranjem gena *16S rRNA* u rizosferi (A) i filisferi (B). Prikazano je deset najzastupljenijih rodova za svaki uzorak.

U rizosferi je među arheama dominirao rod *Nitrososphaera* iz razdela Crenarchaeota, dok je među bakterijama najzastupljeniji rod bio *Bacillus* iz razdela Firmicutes. Rod *Bacillus* detektovan je i u uzorcima filisfere, ali sa manjom relativnom zastupljenošću. Pored toga, rod *Streptomyces* bio je prisutan u oba tipa uzoraka. U filisferi je najveću relativnu zastupljenost imao rod *Komagataeibacter*, pri čemu je njegova zastupljenost značajno opala tokom jula. Među dominantnim rodovima u filisferi izdvajali su se i *Acidothermus* i *Acetobacter*, koji nisu detektovani u uzorcima rizosfere, kao ni *Komagataeibacter*. Takođe, sastav mikrobne zajednice filisfere bio je ujednačeniji tokom maja i

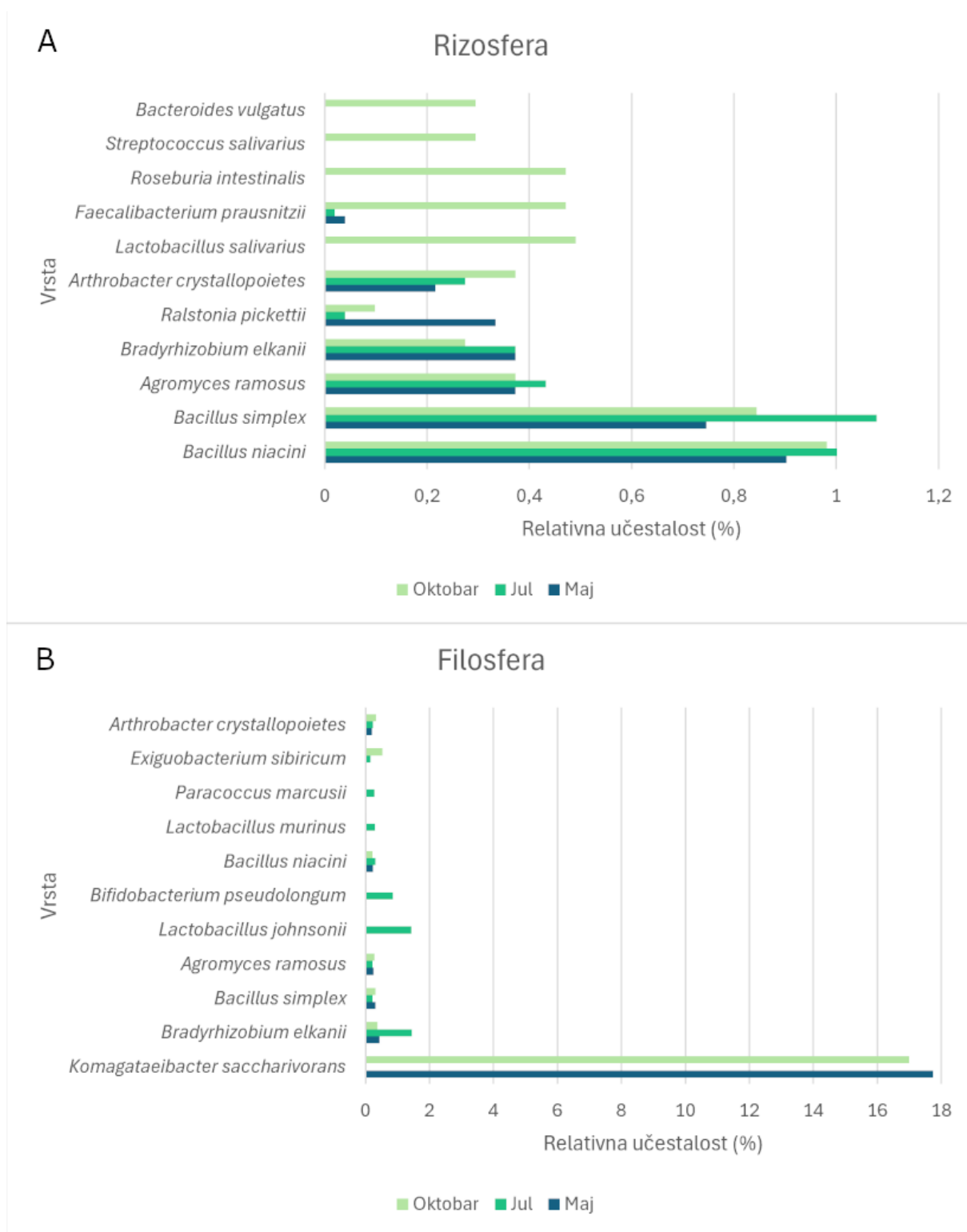
oktobra, dok je julski uzorak pokazivao manju raznovrsnost rodova i nižu zastupljenost većine prisutnih taksona.

Na nivou vrsta analizirane su one vrste čija je relativna zastupljenost u najmanje jednom mesecu iznosila više od 0,25% (Slika 10). U uzorcima rizosfere i filosfere identifikovano je po 11 vrsta koje su ispunjavale ovaj kriterijum. Najdominantnije vrste u rizosferi tokom svih perioda uzorkovanja bile su *Bacillus niacini* i *Bacillus simplex*. Pojedine vrste, uključujući *Lactobacillus salivarius*, *Roseburia intestinalis*, *Streptococcus salivarius* i *Bacteroides vulgatus* detektovane su isključivo u oktobru. U filosferi je vrsta *Komagataeibacter saccharivorans* bila najzastupljenija u maju i oktobru, dok je njena učestalost u julu bila znatno niža. Vrsta *Bradyrhizobium elkanii* pokazala je visoku zastupljenost tokom sva tri perioda uzorkovanja. Vrste *Lactobacillus johnsonii* i *Lactobacillus murinus* bile su posebno zastupljene u julu, dok nisu detektovane u maju i oktobru. Vrste *Agromyces ramosus*, *Arthrobacter crystallopoietes*, *Bacillus niacini*, *Bacillus simplex* i *Bradyrhizobium elkanii* identifikovane su i u rizosferi i u filosferi šećerne repe.

U svim periodima uzorkovanja broj detektovanih vrsta bio je manji u filosferi u odnosu na rizosferu. Takođe, u oba analizirana staništa zabeležen je trend smanjenja broja vrsta od maja ka oktobru. Ipak, analiza alfa diverziteta nije ukazala na statistički značajne razlike među uzorcima ni prema jednom od korišćenih indeksa (Prilog 2).

Iako između različitih perioda uzorkovanja nisu utvrđene statistički značajne razlike u zastupljenosti OTU jedinica unutar istog staništa, značajne razlike između rizosfere i filosfere bile su prisutne u svakom mesecu uzorkovanja. Tokom maja u rizosferi je zabeležena veća zastupljenost razdela Firmicutes, Crenarchaeota i Bacteroidota u odnosu na filosferu (Prilog 3A). U julu (Prilog 3B) najuočljivija razlika između analiziranih staništa zabeležena je za razdeo Crenarchaeota, koji je bio znatno zastupljeniji u rizosferi. Tokom oktobra, razdeo Nitrospirota takođe je pokazao veću zastupljenost u rizosferi nego u filosferi (Prilog 3C).

Analiza zastupljenosti pojedinačnih rodova pokazala je značajne razlike između rizosfere i filosfere u svim periodima uzorkovanja (Prilog 4). Rodovi *Nitrososphaera* i *Bacillus* bili su prisutni u oba staništa, pri čemu su tokom celog vegetacionog perioda bili zastupljeniji u rizosferi. Nasuprot tome, rod *Pseudomonas* bio je dominantniji u filosferi, ali isključivo u oktobru. Ostale statistički značajne razlike uglavnom su se odnosile na rodove sa većom relativnom zastupljenošću u rizosferi.



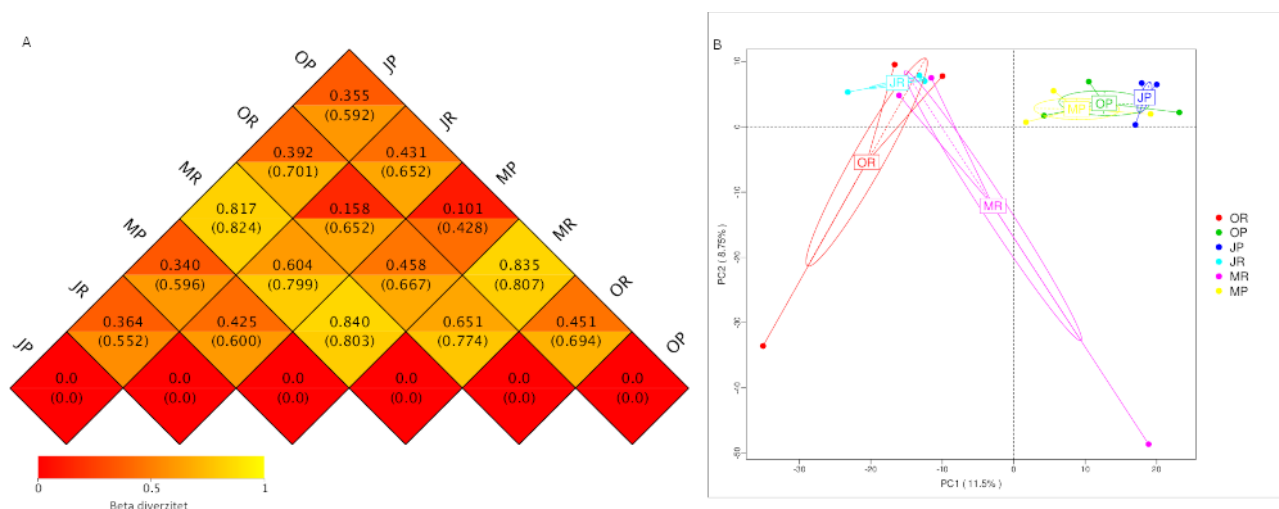
Slika 10. Relativna zastupljenost vrsta u mikrobiomu šećerne repe, određena metabarkodiranjem gena *16S rRNA* u rizosferi (A) i filiosferi (B). Za nivo vrste prikazane su OTU sa zastupljenošću većom od 0,25%.

Radi procene razlika u sastavu mikrobijalnih zajednica između uzoraka sprovedena je analiza beta diverziteta korišćenjem weighted i unweighted UniFrac distanci. Toplotne mape dobijenih distanci ukazale su na jasne razlike u sastavu mikrobijalnih zajednica između rizosfere i filiosfere šećerne repe (Slika 11A). Poređenje uzoraka rizosfere i filiosfere prikupljenih u istom periodu vegetacije pokazalo je da su najveće weighted i unweighted UniFrac distance registrovane u maju, dok su najmanje vrednosti zabeležene u julu, što ukazuje na najveći stepen sličnosti bakterijskih zajednica ova dva

staništa tokom sredine vegetacionog perioda. U oktobru je ponovo uočeno povećanje UniFrac distanci između rizosfere i filosofere.

Analiza beta diverziteta ukazala je na sezonske promene bakterijskih zajednica unutar ispitivanih staništa. U rizosferi su najveće weighted UniFrac udaljenosti zabeležene između uzoraka iz maja i uzoraka iz jula i oktobra, dok je najmanja udaljenost utvrđena između uzoraka iz jula i oktobra, što ukazuje na veću sličnost ovih zajednica. Time je pokazano da se bakterijska zajednica rizosfere u maju jasno razlikovala od zajednica u kasnijim fazama vegetacije, dok su zajednice iz jula i oktobra bile međusobno sličnije. Nasuprot tome, uzorci filosofere pokazali su manje UniFrac distance između svih perioda uzorkovanja, pri čemu je najmanja udaljenost registrovana između uzoraka iz maja i oktobra, što ukazuje na relativno stabilan sastav bakterijskih zajednica filosofere tokom vegetacije.

Jasno razdvajanje uzoraka rizosfere i filosofere potvrđena je i PCA analizom zasnovanom na weighted UniFrac distancama (Slika 11B). Uzorci filosofere grupisali su se bliže na PCA dijagramu, ukazujući na veću stabilnost bakterijskih zajednica tokom vegetacije, dok su uzorci rizosfere pokazali veću disperziju, posebno uzorak iz maja, što potvrđuje izraženiju sezonsku varijabilnost rizosfernog mikrobioma u poređenju sa filosofrom.

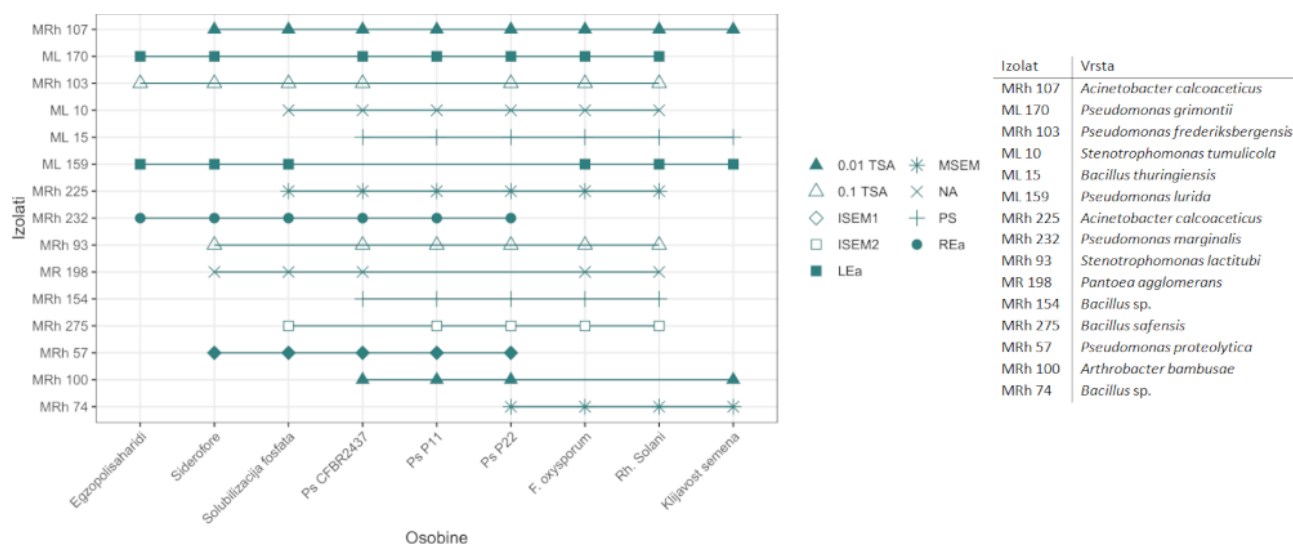


Slika 11. Analiza beta diverziteta mikrobioma šećerne repe. Toplotna mapa (heatmap) (A) prikazuje weighted UniFrac i unweighted UniFrac distance. Polja predstavljaju koeficijent pame različitosti između uzoraka (weighted UniFrac distance prikazane su u gornjem delu matrice, dok su unweighted UniFrac distance prikazane u obrnutom rasporedu).

PCA dijagram (B) zasnovan na weighted UniFrac distancama. Na PCA dijagramu x-osa predstavlja prvu glavnu komponentu, a y-osa drugu glavnu komponentu, dok procenti označavaju doprinos svake glavne komponente ukupnim razlikama između uzoraka. Oznake uzoraka: filosofera (P), rizosfera (R); uzorci prikupljeni u maju (M), julu (J) i oktobru (O) (Preuzeto iz Krstić Tomić et al. (2023)).

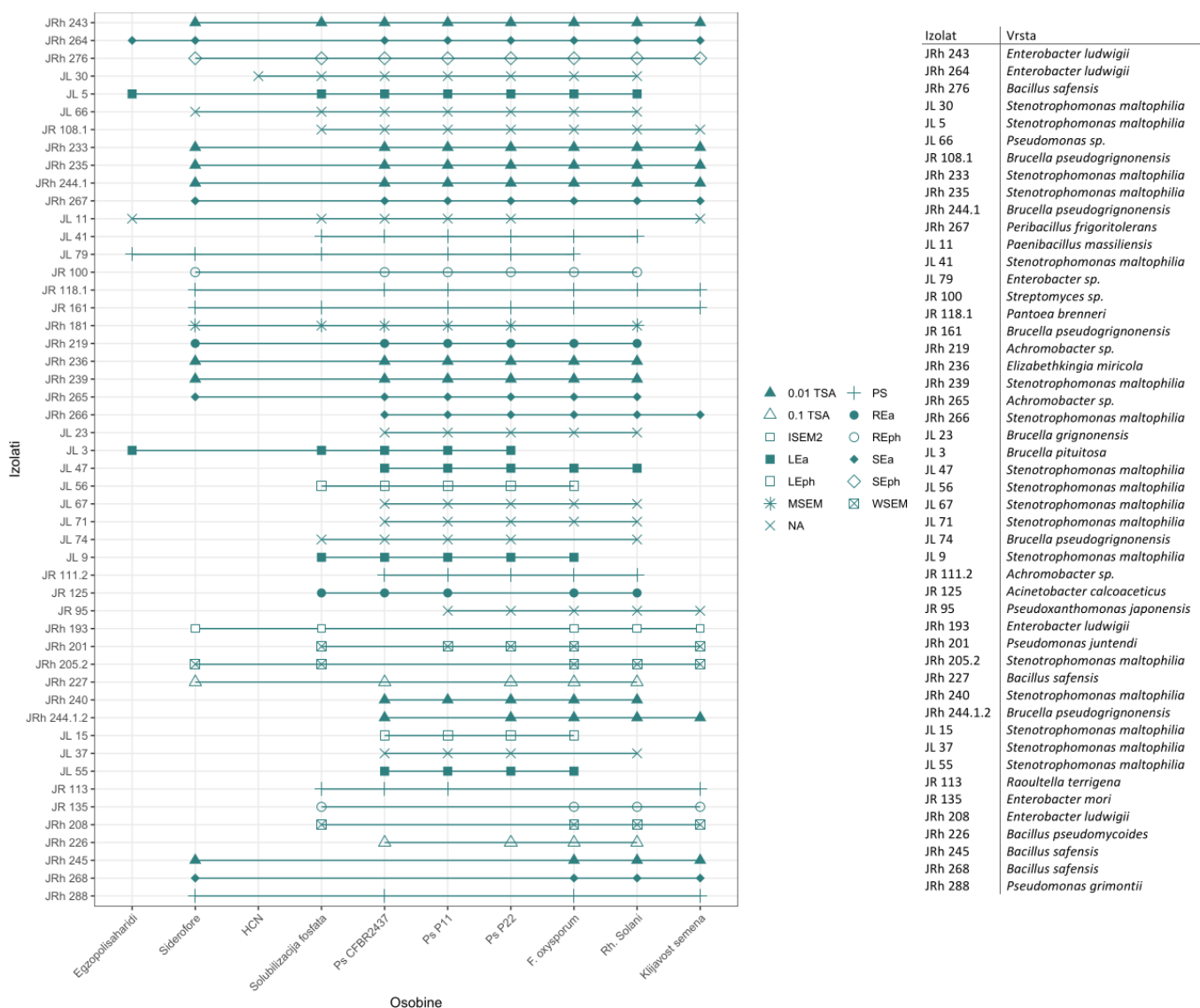
## Poređenje kultivaciono-zavisnog i kultivaciono-nezavisnog pristupa u detekciji bakterija sa PGP osobinama

S obzirom na to da su sve ispitivane podloge omogućile izolaciju bakterija sa najmanje četiri PGP osobine, dalja analiza bila je usmerena na ukupno 98 takvih izolata, koji su grupisani prema periodu uzorkovanja. U uzorcima prikupljenim tokom maja (Slika 12), soj *Acinetobacter calcoaceticus* MRh 107 pokazao je najveći broj udruženih PGP osobina, odnosno osam od ukupno deset ispitivanih osobina. Ovaj soj, izolovan iz rizosfere na podlozi 0,01 TSA, pokazao je antagonističku aktivnost prema svim testiranim patogenima šećerne repe, sposobnost stimulacije klijanja semena, solubilizacije fosfata i produkcije siderofora.



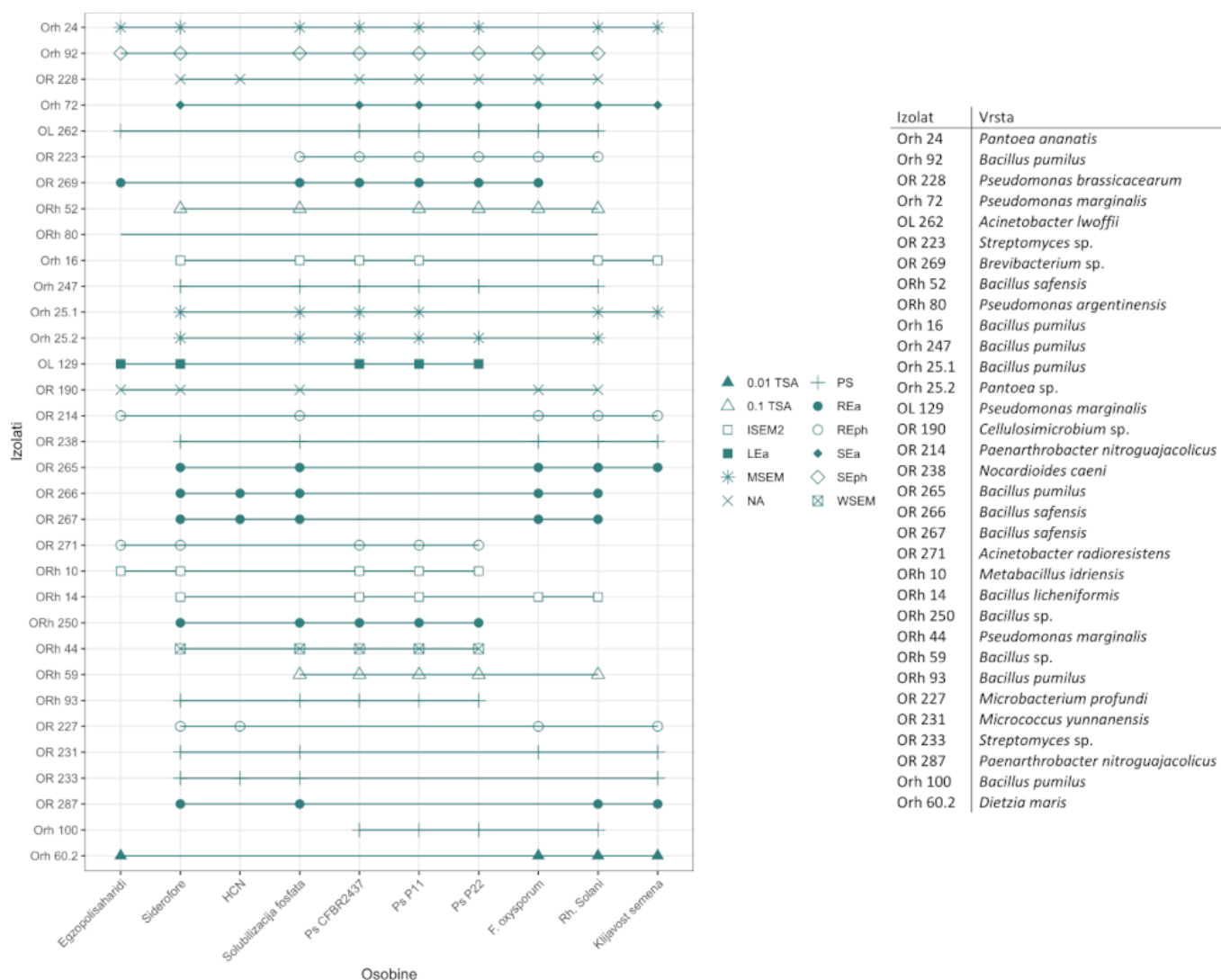
Slika 12. Izolati sa četiri ili više istovremeno prisutnih PGP osobina, izolovani u maju. Oznake izolata M (maj) označavaju mesec uzorkovanja, dok R predstavlja izolate iz rizosfere, a L izolate iz filosfere. Različite podloge na kojima su izolati dobijeni označene su različitim simbolima.

Najveći broj izolata sa izraženim PGP potencijalom detektovan je u julu (Slika 13), kada je identifikovano 49 izolata sa četiri ili više osobina, uključujući tri izolata sa osam istovremeno prisutnih PGP osobina. Ovi sojevi identifikovani su kao *Bacillus safensis* JRh276, izolovan na SEph podlozi, kao i dva soja JRh 243 i JRh264 vrste *Enterobacter ludwigii* dobijena na podlogama 0,01 TSA i SEa. Svi navedeni sojevi ispoljili su antagonističku aktivnost prema testiranim patogenima šećerne repe, stimulisali klijanje semena i produkovali siderofore. U ovom periodu najčešće detektovana vrsta sa četiri ili više PGP osobina bila je *Stenotrophomonas maltophilia* (JL30, JL5, JRh233, JRh235, JL41, JRh239, JRh266, JL47, JL56, JL67, JL71, JL 9, JRh205.2, JRh240, JL15, JL37 i JL55) izolovana sa različitih podloga i iz rizosfere i iz filosfere.



Slika 13. Izolati sa četiri ili više istovremeno prisutnih PGP osobina, izolovani u julu. Oznake izolata J (jul) označavaju mesec uzorkovanja, dok R predstavlja izolate iz rizosfere, a L izolate iz filiosfere. Različite podloge na kojima su izolati dobijeni označene su različitim simbolima.

U oktobarskim uzorcima (Slika 14) identifikovana su dva soja sa osam udruženih PGP osobina, a to su *Pantoea ananatis* ORh24 i *Bacillus pumilus* Orh92, izolovani sa MSEM, odnosno SEph podloge. Velika većina ostalih sojeva sa izraženim PGP osobinama identifikovana je kao *Bacillus pumilus* (ORh92, ORh16, ORh247, ORh25.1, OR265, ORh93 i ORh100). Ovi sojevi uglavnom su dobijeni iz rizosfere šećerne repe na REa podlozi. Od svih izolata izdvojenih u oktobru, samo je jedan soj iz filiosfere posedovao više od četiri PGP karakteristike. Reč je o soju *Pseudomonas marginalis* OL129, izolovanom na LEa podlozi, koji je ispoljio antagonističku aktivnost prema sva tri soja *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, kao i sposobnost produkcije egzopolisaharida i siderofora.

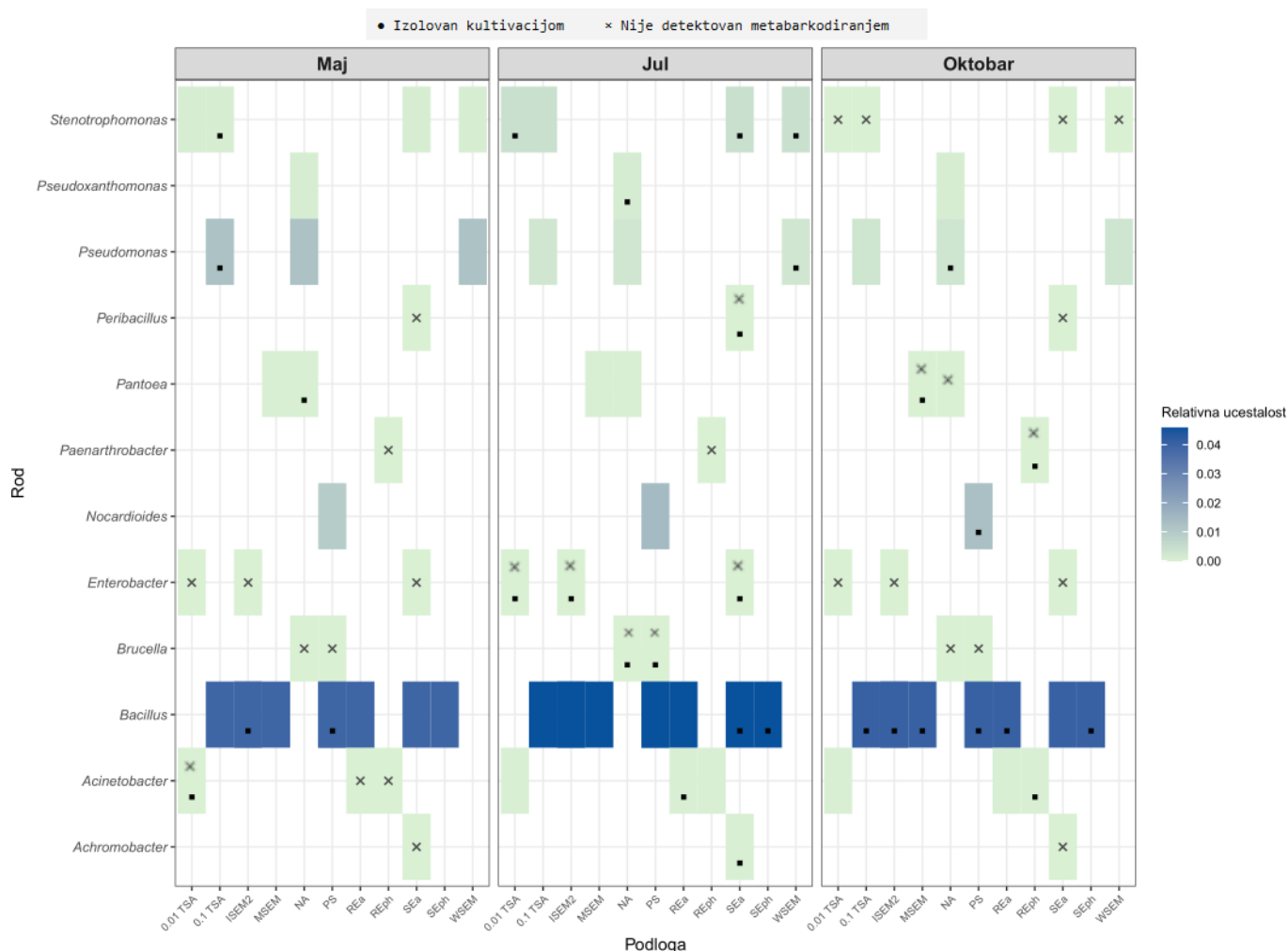


Slika 14. Izolati sa četiri ili više istovremeno prisutnih PGP osobina, izolovani u oktobru. Oznake izolata O (oktobar) označavaju mesec uzorkovanja, dok R predstavlja izolate iz rizosfere, a L izolate iz filosfere. Različite podloge na kojima su izolati dobijeni označene su različitim simbolima.

Radi poređenja kultivaciono-zavisnog i kultivaciono-nezavisnog pristupa u detekciji bakterija sa PGP potencijalom, u nastavku su praćene vrste koje su posedovale pet ili više PGP osobina i upoređene sa rezultatima metabarkoding analize. Jedina vrsta iz ove grupe koja je detektovana i metodom kultivacije i metabarkodiranja bila je *Bacillus thuringiensis*. Ovaj soj izolovan je iz rizosfere u maju na PS podlozi, dok je analizom metabarkodiranja detektovan i u rizosferi i u filosferi, sa relativnom zastupljenošću od 0,07%. Sve ostale PGP vrste izolovane na različitim podlogama nisu detektovane među 179 vrsta identifikovanih kultivaciono-nezavisnom analizom. Zbog toga je izvršena detaljnija analiza na nivou rodova, pri čemu su upoređeni period uzorkovanja, podloga sa koje su izolovani predstavnici određenog roda i njihova relativna učestalost određena metabarkodiranjem.

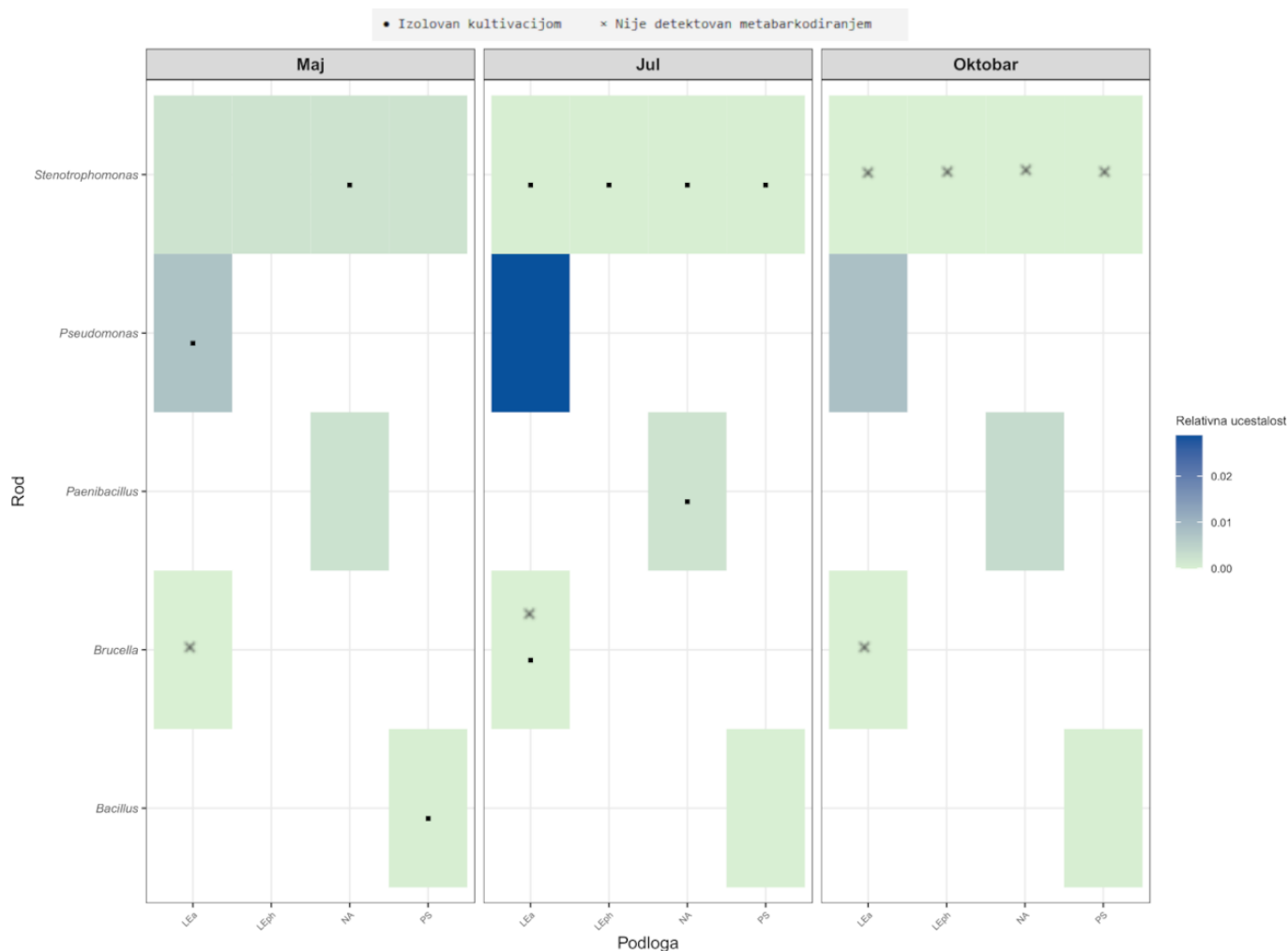
U rizosferi (Slika 15) je najveći broj rodova sa istovremeno prisutnih više od pet PGP karakteristika izolovan sa SEa podloge isključivo jula meseca, a među njima su identifikovani rodovi *Achromobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Peribacillus* i *Stenotrophomonas*. Od navedenih rodova, jedino je rod *Bacillus* imao visoku relativnu zastupljenost u metabarkoding analizi. Rodovi *Achromobacter* i *Stenotrophomonas* bili su detektovani u veoma niskoj zastupljenosti, dok rodovi *Enterobacter* i *Peribacillus* nisu registrovani među ukupno 512 rodova identifikovanih metabarkodiranjem. Pored toga, i rodovi *Brucella* (izolovan na PS i NA podlogama), *Paenarthrobacter* (izolovan na REph podlozi) i *Peribacillus* (izolovan na SEa podlozi) detektovani su isključivo kultivaciono-zavisnim pristupom. Nasuprot tome, rod *Bacillus* je predstavljao PGP rod

koji je metabarkoding analizom pokazao relativno visoku zastupljenost (>4%), dok je istovremeno izolovan sa više različitih podloga (0,1 TSA, PS, ISEM2, REa, MSEM, SEa i SEph).



Slika 15. Poređenje relativne učestalosti rodova detektovanih metabarkodiranjem i diverziteta rodova izolovanih na različitim podlogama iz uzorka rizosfere. Prikazani su samo oni rodovi koji uključuju izolate sa pet ili više PGP osobina. Slika se sastoji od tri panela, koji odgovaraju periodima uzorkovanja (maj, jul i oktobar). Toplotna mapa prikazuje relativnu učestalost svakog roda određenu metabarkodiranjem gena *16S rRNA*, dok simboli označavaju da li je određeni rod izolovan na konkretnoj podlozi u odgovarajućem periodu uzorkovanja. Posebno su naglašeni rodovi koji nisu detektovani metabarkodiranjem, iako su uspešno izolovani kultivacionim metodama.

U filosferi (Slika 16), rod *Brucella* bio je jedini rod izolovan kultivacionom metodom, a nije detektovan analizom metabarkodiranja, pri čemu je izolovan na LEa podlozi u julu mesecu. Svi ostali rodovi sa predstavnicima koji poseduju PGP osobine identifikovani su primenom oba pristupa. Rod *Pseudomonas*, izolovan maja na LEa podlozi, obuhvatao je više vrsta sa PGP osobinama i istovremeno pokazao relativno visoku zastupljenost u metabarkoding analizi (>2%). Sa druge strane, rod *Stenotrophomonas*, iz kojeg je izolovan najveći broj vrsta sa PGP karakteristikama iz filosfere na svim ispitivanim podlogama, analizom metabarkodiranja detektovan je u veoma niskoj zastupljenosti (<0,5%).



Slika 16. Poređenje relativne učestalosti rodova detektovanih metabarkodiranjem i diverziteta rodova izolovanih na različitim podlogama iz uzorka filosofere. Prikazani su samo oni rodovi koji uključuju izolate sa pet ili više PGP osobina.

Slika se sastoji od tri panela, koji odgovaraju periodima uzorkovanja (maj, jul i oktobar). Toplotna mapa prikazuje relativnu učestalost svakog roda određenu metabarkodiranjem gena *16S rRNK*, dok simboli označavaju da li je određeni rod izolovan na konkretnoj podlozi u odgovarajućem periodu uzorkovanja. Posebno su naglašeni rodovi koji nisu detektovani metabarkodiranjem, iako su uspešno izolovani kultivacionim metodama.

## Odabir bakterijskih sojeva i formiranje konzorcijuma sa biokontrolnim potencijalom

Dobijeni rezultati prikazani u prethodnim poglavljima ukazali su na prisustvo bakterijskih sojeva sa potencijalno korisnim osobinama za zaštitu biljaka što je predstavljalo osnovu za dalja istraživanja mogućnosti njihove primene. U skladu sa tim, naredna faza istraživanja bila je usmerena na procenu biokontrolne efikasnosti odabranih sojeva protiv patogena *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21. Kod ukupno 98 izolata ispitana je sposobnost produkcije indol-3-sirćetne kiseline (IAA), sposobnost fiksacije azota, aktivnost ACC deaminaze, pokretljivost i formiranje biofilma (Tabela 2). Pored navedenih osobina, u obzir su uzeti i prethodno dobijeni rezultati antagonističkog delovanja prema patogenu *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. Na osnovu kombinacije ovih kriterijuma izdvojeni su sojevi *Bacillus safensis* MRh275, *Bacillus pseudomycoides* JRh226 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266 kao najperspektivniji kandidati za dalja istraživanja biokontrolnog potencijala.

Tabela 2. Pregled PGP osobina sojeva poreklom iz rizosfere i filosfere šećerne repe.

| Rizosfera   |                                           |          |     |                  |         |          |         |         |                    |
|-------------|-------------------------------------------|----------|-----|------------------|---------|----------|---------|---------|--------------------|
| Izolat      | Vrsta                                     | Podloga  | IAA | ACC<br>deaminaza | Biofilm | Plivanje | Rojenje | Trzanje | Fiksacija<br>azota |
| MRh 100     | <i>Arthrobacter<br/>bambusae</i>          | 0.01 TSA | -   | -                | +       | -        | -       | -       | -                  |
| MRh 107     | <i>Acinetobacter<br/>calcoaceticus</i>    | 0.01 TSA | +   | +                | +++     | -        | -       | -       | -                  |
| JRh 235     | <i>Stenotrophomonas<br/>maltophilia</i>   | 0.01 TSA | -   | +++              | +++     | ++       | -       | +       | -                  |
| JRh 243     | <i>Enterobacter<br/>ludwigii</i>          | 0.01 TSA | +   | ++               | +       | -        | ++      | +       | -                  |
| JRh 233     | <i>Stenotrophomonas<br/>maltophilia</i>   | 0.01 TSA | ++  | +                | +       | -        | +       | -       | -                  |
| JRh 244.1   | <i>Brucella<br/>pseudogrignonensis</i>    | 0.01 TSA | +   | +                | ++      | +        | -       | -       | -                  |
| JRh 244.1.2 | <i>Brucella<br/>pseudogrignonensis</i>    | 0.01 TSA | +++ | -                | +       | -        | +       | -       | +                  |
| JRh 245     | <i>Bacillus safensis</i>                  | 0.01 TSA | +   | +                | +       | +++      | ++      | -       | ++                 |
| JRh 239     | <i>Stenotrophomonas<br/>maltophilia</i>   | 0.01 TSA | +   | -                | ++      | ++       | -       | +       | -                  |
| JRh 236     | <i>Elizabethkingia<br/>miricola</i>       | 0.01 TSA | +   | -                | +++     | -        | -       | -       | -                  |
| JRh 240     | <i>Stenotrophomonas<br/>maltophilia</i>   | 0.01 TSA | +   | +++              | +++     | ++       | +       | -       | -                  |
| Orh 60.2    | <i>Dietzia maris</i>                      | 0.01 TSA | +   | -                | +       | -        | -       | -       | -                  |
| MRh 93      | <i>Stenotrophomonas<br/>lactitubi</i>     | 0.1 TSA  | +   | +                | ++      | +        | -       | -       | ++                 |
| MRh 103     | <i>Pseudomonas<br/>frederiksbergensis</i> | 0.1 TSA  | +   | -                | -       | ++       | -       | -       | +++                |
| JRh 226     | <i>Bacillus<br/>pseudomycoides</i>        | 0.1 TSA  | +   | -                | +       | ++       | ++      | -       | +                  |
| JRh 227     | <i>Bacillus safensis</i>                  | 0.1 TSA  | +   | +                | ++      | -        | -       | -       | -                  |
| ORh 52      | <i>Bacillus safensis</i>                  | 0.1 TSA  | -   | -                | -       | +++      | ++      | +       | -                  |
| ORh 59      | <i>Bacillus</i> sp.                       | 0.1 TSA  | +   | -                | +       | +        | -       | -       | ++                 |
| MRh 154     | <i>Bacillus</i> sp.                       | PS       | +   | -                | +       | ++       | -       | +       | -                  |
| JR 111.2    | <i>Achromobacter</i> sp.                  | PS       | +   | -                | ++      | ++       | +       | -       | ++                 |
| JR 113      | <i>Raoultella terrigena</i>               | PS       | ++  | ++               | +       | -        | -       | +       | -                  |
| JR 118.1    | <i>Pantoea brenneri</i>                   | PS       | +   | -                | +       | +        | -       | +       | -                  |
| JR 161      | <i>Brucella<br/>pseudogrignonensis</i>    | PS       | +   | -                | -       | ++       | -       | -       | -                  |
| JRh 288     | <i>Pseudomonas<br/>grimontii</i>          | PS       | -   | -                | ++      | +++      | +       | -       | -                  |
| OR 231      | <i>Micrococcus<br/>yunnanensis</i>        | PS       | -   | -                | ++      | +++      | +++     | -       | -                  |
| OR 233      | <i>Streptomyces</i> sp.                   | PS       | +   | -                | -       | -        | -       | -       | +                  |
| OR 238      | <i>Nocardioides caeni</i>                 | PS       | -   | -                | -       | ++       | -       | -       | -                  |
| ORh 93      | <i>Bacillus pumilus</i>                   | PS       | +   | +                | -       | -        | -       | -       | +                  |
| Orh 100     | <i>Bacillus pumilus</i>                   | PS       | ++  | -                | +++     | -        | -       | -       | -                  |
| Orh 247     | <i>Bacillus pumilus</i>                   | PS       | +   | +                | +       | -        | -       | -       | -                  |
| MR 198      | <i>Pantoea<br/>agglomerans</i>            | NA       | ++  | +                | +       | +        | -       | -       | ++                 |
| JR 95       | <i>Pseudoxanthomonas<br/>japonensis</i>   | NA       | -   | -                | -       | -        | -       | -       | -                  |
| JR 108.1    | <i>Brucella<br/>pseudogrignonensis</i>    | NA       | +   | +                | +++     | +        | -       | -       | -                  |
| OR 190      | <i>Cellulosimicrobium<br/>sp.</i>         | NA       | +   | +                | +++     | -        | -       | -       | ++                 |
| OR 228      | <i>Pseudomonas<br/>brassicacearum</i>     | NA       | +   | +                | ++      | -        | -       | -       | -                  |

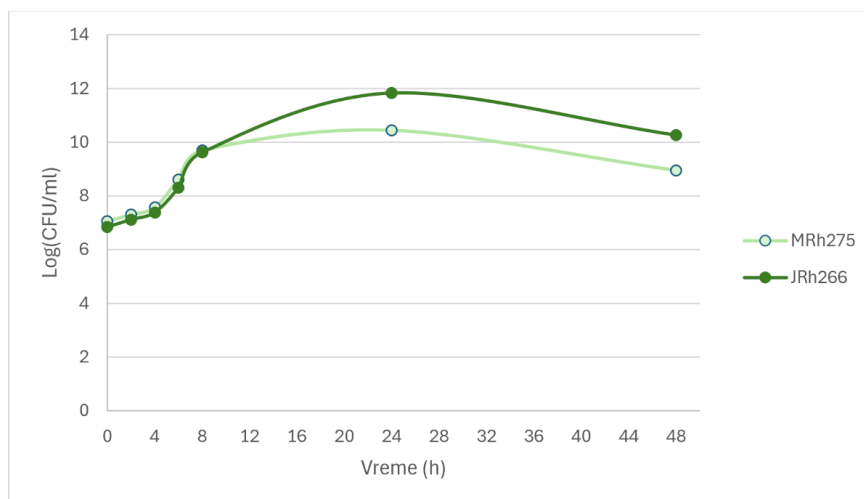
|           |                                           |       |     |    |     |     |     |   |     |
|-----------|-------------------------------------------|-------|-----|----|-----|-----|-----|---|-----|
| MRh 57    | <i>Pseudomonas proteolytica</i>           | ISEM1 | +   | +  | ++  | -   | -   | + | -   |
| MRh 275   | <i>Bacillus safensis</i>                  | ISEM2 | +   | +  | -   | -   | ++  | - | -   |
| JRh 193   | <i>Enterobacter ludwigii</i>              | ISEM2 | +++ | +  | ++  | +++ | +   | + | -   |
| ORh 10    | <i>Metabacillus idriensis</i>             | ISEM2 | +   | -  | -   | -   | -   | - | -   |
| ORh 14    | <i>Bacillus licheniformis</i>             | ISEM2 | +   | -  | +   | +++ | ++  | + | +++ |
| Orh 16    | <i>Bacillus pumilus</i>                   | ISEM2 | -   | -  | -   | +++ | +   | - | -   |
| MRh 232   | <i>Pseudomonas marginalis</i>             | REa   | +   | +  | +   | ++  | ++  | - | +   |
| JRh 125   | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>        | REa   | +   | ++ | +   | -   | +   | + | -   |
| JRh 219   | <i>Achromobacter</i> sp.                  | REa   | -   | +  | +++ | +   | +   | - | -   |
| OR 265    | <i>Bacillus pumilus</i>                   | REa   | +   | -  | -   | +++ | +   | + | +   |
| OR 269    | <i>Brevibacterium</i> sp.                 | REa   | +   | +  | +++ | -   | -   | - | ++  |
| OR 266    | <i>Bacillus safensis</i>                  | REa   | +   | +  | +++ | ++  | ++  | - | -   |
| OR 267    | <i>Bacillus safensis</i>                  | REa   | +   | +  | ++  | -   | ++  | + | +   |
| OR 287    | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> | REa   | +   | +  | -   | -   | -   | - | +   |
| ORh 250   | <i>Bacillus</i> sp.                       | REa   | -   | -  | -   | ++  | +++ | + | +   |
| JRh 100   | <i>Streptomyces</i> sp.                   | REph  | -   | -  | -   | -   | -   | - | -   |
| JRh 135   | <i>Enterobacter mori</i>                  | REph  | ++  | +  | -   | ++  | +++ | + | ++  |
| OR 214    | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> | REph  | +   | -  | -   | -   | -   | - | -   |
| OR 223    | <i>Streptomyces</i> sp.                   | REph  | ++  | +  | -   | -   | -   | - | -   |
| OR 227    | <i>Microbacterium profundum</i>           | REph  | -   | -  | -   | -   | -   | - | +   |
| OR 271    | <i>Acinetobacter radioresistens</i>       | REph  | +   | +  | ++  | ++  | -   | + | +   |
| MRh 74    | <i>Bacillus</i> sp.                       | MSEM  | +   | -  | +   | +++ | -   | + | -   |
| JRh 181   | <i>Enterobacter ludwigii</i>              | MSEM  | +   | -  | +   | ++  | +   | + | -   |
| Orh 24    | <i>Pantoea ananatis</i>                   | MSEM  | ++  | ++ | +   | +++ | ++  | - | -   |
| Orh 25.1  | <i>Bacillus pumilus</i>                   | MSEM  | +++ | -  | -   | ++  | -   | - | +   |
| Orh 25.2  | <i>Pantoea</i> sp.                        | MSEM  | +++ | -  | -   | -   | -   | - | -   |
| MRh 225   | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>        | WSEM  | +   | -  | -   | +   | -   | - | -   |
| JRh 201   | <i>Pseudomonas jurensis</i>               | WSEM  | +   | +  | -   | ++  | -   | + | -   |
| JRh 205.2 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>       | WSEM  | -   | ++ | +++ | -   | -   | - | -   |
| JRh 208   | <i>Enterobacter ludwigii</i>              | WSEM  | +++ | +  | ++  | +++ | +   | + | -   |
| ORh 44    | <i>Pseudomonas marginalis</i>             | WSEM  | ++  | ++ | +++ | -   | +++ | + | -   |
| JRh 264   | <i>Enterobacter ludwigii</i>              | SEa   | +   | -  | +   | +++ | ++  | - | -   |
| JRh 265   | <i>Achromobacter</i> sp.                  | SEa   | -   | -  | ++  | +++ | +   | - | -   |
| JRh 266   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>       | SEa   | +   | +  | -   | -   | -   | - | -   |
| JRh 267   | <i>Peribacillus frigiditolerans</i>       | SEa   | ++  | +  | ++  | ++  | +   | - | -   |
| JRh 268   | <i>Bacillus safensis</i>                  | SEa   | +   | -  | -   | +++ | +   | + | -   |
| Orh 72    | <i>Pseudomonas marginalis</i>             | SEa   | +   | ++ | +   | +   | ++  | - | ++  |
| JRh 276   | <i>Bacillus safensis</i>                  | SEph  | +   | -  | +   | ++  | -   | - | +   |

|        |                                  |      |   |   |    |    |     |   |   |
|--------|----------------------------------|------|---|---|----|----|-----|---|---|
| ORh 80 | <i>Pseudomonas argentinensis</i> | SEph | + | + | +  | ++ | -   | - | - |
| Orh 92 | <i>Bacillus pumilus</i>          | SEph | + | + | ++ | -  | +++ | + | + |

| Filosfera |                                     |         |     |               |         |          |         |         |                 |
|-----------|-------------------------------------|---------|-----|---------------|---------|----------|---------|---------|-----------------|
| Izolant   | Vrsta                               | Podloga | IAA | ACC deaminaza | Biofilm | Plivanje | Rojenje | Trzanje | Fiksacija azota |
| ML 15     | <i>Bacillus thuringiensis</i>       | PS      | +   | +             | -       | -        | -       | -       | -               |
| JL 41     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | PS      | +   | +             | +++     | +        | +       | -       | -               |
| JL 79     | <i>Enterobacter</i> sp.             | PS      | +   | +             | +       | -        | ++      | +       | -               |
| OL 262    | <i>Acinetobacter lwoffii</i>        | PS      | -   | -             | ++      | ++       | +       | -       | ++              |
| ML 10     | <i>Stenotrophomonas tumulicola</i>  | NA      | +++ | ++            | -       | +++      | +       | +       | -               |
| JL 11     | <i>Paenibacillus massiliensis</i>   | NA      | +   | -             | ++      | +++      | -       | -       | -               |
| JL 23     | <i>Brucella grignoneensis</i>       | NA      | +   | -             | -       | -        | -       | -       | -               |
| JL 30     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | NA      | +   | +             | -       | ++       | -       | +       | -               |
| JL 37     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | NA      | -   | +             | -       | -        | -       | +       | ++              |
| JL 67     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | NA      | ++  | ++            | ++      | +        | -       | -       | +               |
| JL 66     | <i>Pseudomonas</i> sp.              | NA      | +   | +             | -       | +        | -       | +       | -               |
| JL 71     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | NA      | -   | -             | +++     | ++       | -       | +       | +               |
| JL 74     | <i>Brucella pseudogrignoneensis</i> | NA      | ++  | -             | +       | +        | -       | -       | -               |
| ML 159    | <i>Pseudomonas lurida</i>           | LEa     | +   | -             | -       | +++      | +++     | +       | -               |
| ML 170    | <i>Pseudomonas grimontii</i>        | LEa     | +   | ++            | -       | +        | ++      | -       | -               |
| JL 3      | <i>Brucella pituitosa</i>           | LEa     | ++  | +             | -       | +        | -       | -       | ++              |
| JL 5      | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | LEa     | ++  | -             | ++      | -        | -       | -       | -               |
| JL 9      | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | LEa     | +   | +             | ++      | -        | -       | -       | +               |
| JL 47     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | LEa     | ++  | -             | -       | +        | -       | +       | +               |
| JL 55     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | LEa     | +   | -             | ++      | +        | -       | -       | ++              |
| OL 129    | <i>Pseudomonas marginalis</i>       | LEa     | ++  | +++           | -       | +        | ++      | -       | -               |
| JL 15     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | LEph    | ++  | -             | +++     | +        | -       | +       | +               |
| JL 56     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | LEph    | +   | -             | ++      | +        | -       | -       | +++             |

- nema aktivnosti, + slaba aktivnost, ++ umerena aktivnost, +++ jaka aktivnost

Ispitivanjem međusobne kompatibilnosti i zajedničkog rasta, utvrđeno je da soj *B. pseudomycoides* JRh226 ispoljava inhibitorno dejstvo prema preostala dva soja, zbog čega nije uključen u konzorcijum. Kao funkcionalno kompatibilna kombinacija izdvojeni su sojevi *B. safensis* MRh275 i *S. maltophilia* JRh266, koji su pokazali uspešan zajednički rast u kokulturi (Slika 17) i formiran je konzorcijum T2. Ovi rezultati predstavljali su osnovu za sprovođenje eksperimenata biokontrole opisanih u narednom poglavlju.

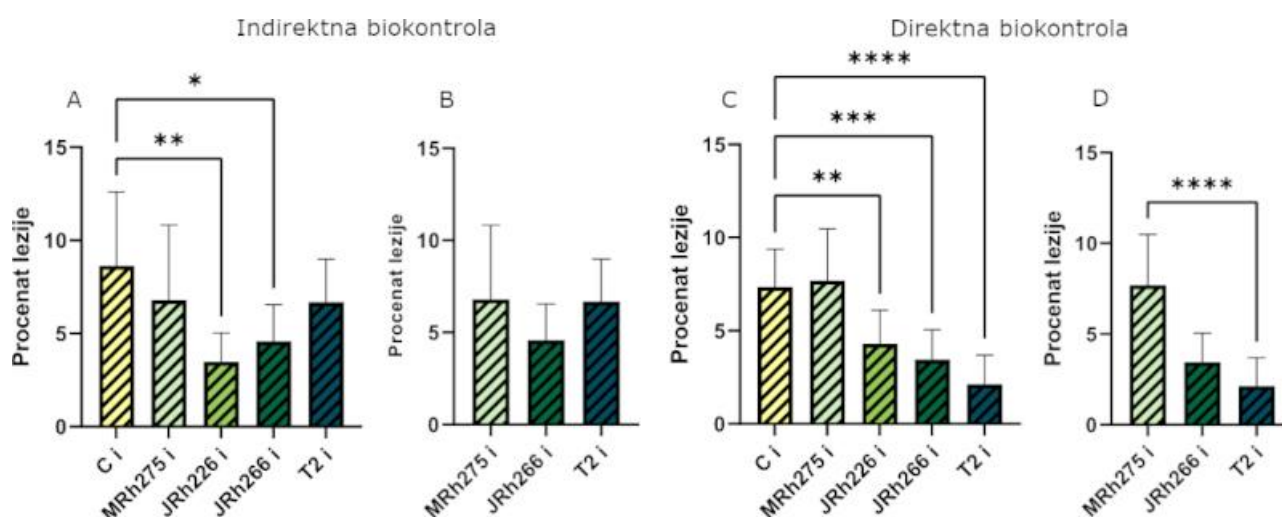


Slika 17. Prikaz praćenja rasta sojeva *Bacillus safensis* MRh275 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266 u kokulturi

## Uticaj pojedinačnih bakterijskih izolata i konzorcijuma na razvoj lezija u uslovima indirektna i direktne biokontrole

Nakon selekcije bakterijskih sojeva sa izraženim osobinama značajnim za promociju biljnog rasta i potencijalnom antagonističkom aktivnošću prema patogenu *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21, procenjena je njihova sposobnost suzbijanja razvoja bolesti u uslovima indirektna i direktne biokontrole.

Kod indirektna biokontrole, seme šećerne repe tretirano je suspenzijama bakterijskih izolata pre setve, čime je omogućena kolonizacija biljke tokom razvoja. U poređenju sa inficiranom netretiranom kontrolom (C i), tretman semena sojevima *Bacillus pseudomycoides* JRh226 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266 doveo je do statistički značajnog smanjenja veličine lezija (Slika 18A). Istovremeno, nisu utvrđene statistički značajne razlike između konzorcijuma T2 i njegovih pojedinačnih komponenti (*Bacillus safensis* MRh275 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266) (Slika 18B). Pri direktnoj biokontroli, patogen i bakterijski izolati inokulisani su istovremeno u tkivo lista.



Slika 18. Uticaj pojedinačnih bakterijskih izolata i konzorcijuma na razvoj lezija na šećernoj repi u uslovima indirektna i direktne biokontrole. Indirektna biokontrola – svi tretmani (A), poređenje konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju (B). Direktna biokontrola – svi tretmani (C), poređenje konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju (D). Statistički značajne razlike označene su na sledeći način:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) (Preuzeto i modifikovano iz Krstić Tomić et al. (2026)).

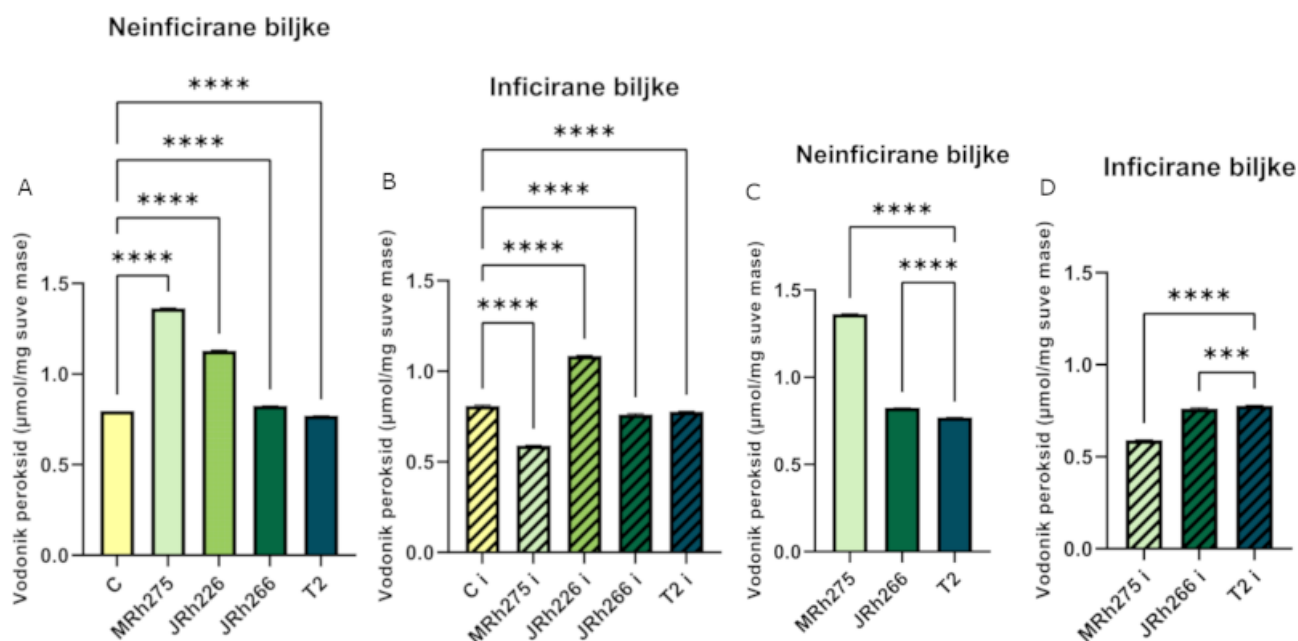
U ovim uslovima, sojevi *B. pseudomycoides* JRh226 i *S. maltophilia* JRh266, kao i konzorcijum T2, značajno su smanjili veličinu lezija u odnosu na zaraženu kontrolu (Slika 18C). Poređenje efikasnosti

pojedinačnih tretmana pokazalo je da je konzorcijum T2 ostvario značajno bolje rezultate od soja *B. safensis* MRh275, dok razlike između konzorcijuma i soja *S. maltophilia* JRh266 nisu bile statistički značajne (Slika 18D).

## Odgovor biljaka na biokontrolne tretmane kroz akumulaciju vodonik peroksida

Uticaj indirektnog tretmana na koncentraciju  $H_2O_2$  u listovima biljaka prikazani su na slici 19. Kod neinficiranih biljaka, tretmani sojevima *B. safensis* MRh275, *B. pseudomycoides* JRh226 i *S. maltophilia* JRh266 doveli su do značajno viših koncentracija  $H_2O_2$  u odnosu na neinficiranu kontrolu, dok je kod tretmana konzorcijumom T2 zabeležena značajno niža koncentracija (Slika 19A). Nasuprot tome, kod biljaka inficiranih patogenom, tretmani sojem *B. safensis* MRh275, sojem *S. maltophilia* JRh266 i konzorcijumom T2 rezultirali su značajno nižim koncentracijama  $H_2O_2$  u poređenju sa inficiranom kontrolom, dok je soj *B. pseudomycoides* JRh226 izazvao značajno povećanje njegove koncentracije (Slika 19B).

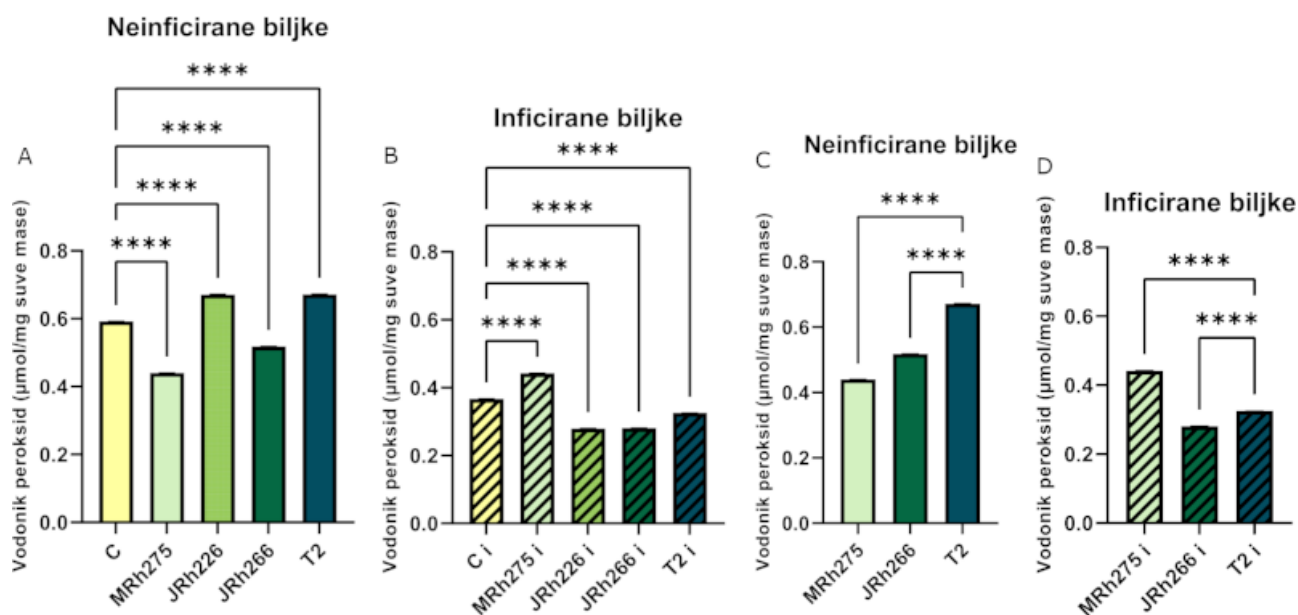
Upoređivanjem efekata konzorcijuma i pojedinačnih sojeva utvrđeno je da je kod neinficiranih biljaka koncentracija  $H_2O_2$  bila značajno niža u tretmanu konzorcijumom nego kod tretmana sojevima *B. safensis* MRh275 i *S. maltophilia* JRh266 (Slika 19C). Međutim, u uslovima infekcije patogenom, konzorcijum T2 izazvao je značajno veću koncentraciju  $H_2O_2$  u odnosu na oba pojedinačna soja (Slika 19D).



**Slika 19. Koncentracija vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) u biljnom tkivu pri indirektnoj biokontroli.** Biljke tretirane različitim biokontrolnim izolatima upoređene su sa kontrolnom grupom (C), koja pre infekcije nije bila izložena bakterijama (A). Biljke tretirane različitim biokontrolnim izolatima zaražene su patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21 i upoređene sa inficiranom kontrolnom grupom (C i), koja pre infekcije nije bila izložena bakterijama (B). Poređenje efekta konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju u neinficiranim biljkama (C). Poređenje efekta konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju u inficiranim biljkama (D). Statistički značajne razlike označene su na sledeći način:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) (Preuzeto i modifikovano iz Krstić Tomić et al. (2026)).

Rezultati direktne biokontrole pokazali su drugačiji obrazac odgovora biljke. Kod neinficiranih biljaka, tretmani sojevima *B. safensis* MRh275 i *S. maltophilia* JRh266 doveli su do značajno nižih koncentracija  $H_2O_2$  u odnosu na kontrolu, dok su soj *B. pseudomycoides* JRh226 i konzorcijum T2 izazvali značajno povećanje njegove koncentracije (Slika 20A). Kod biljaka izloženih patogenu, soj *B. safensis* MRh275 indukovao je značajno višu koncentraciju  $H_2O_2$  u poređenju sa inficiranom kontrolom, dok su ostali tretmani rezultirali značajno nižim vrednostima (Slika 20B).

Poređenjem konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju pokazalo je da je kod neinficiranih biljaka koncentracija  $H_2O_2$  bila značajno viša nakon tretmana konzorcijumom nego nakon tretmana pojedinačnim sojevima *B. safensis* MRh275 i *S. maltophilia* JRh266 (Slika 20C). U prisustvu patogena, koncentracija  $H_2O_2$  u tretmanu konzorcijumom bila je niža nego kod soja *B. safensis* MRh275, ali viša u odnosu na soj *S. maltophilia* JRh266 (Slika 20D).

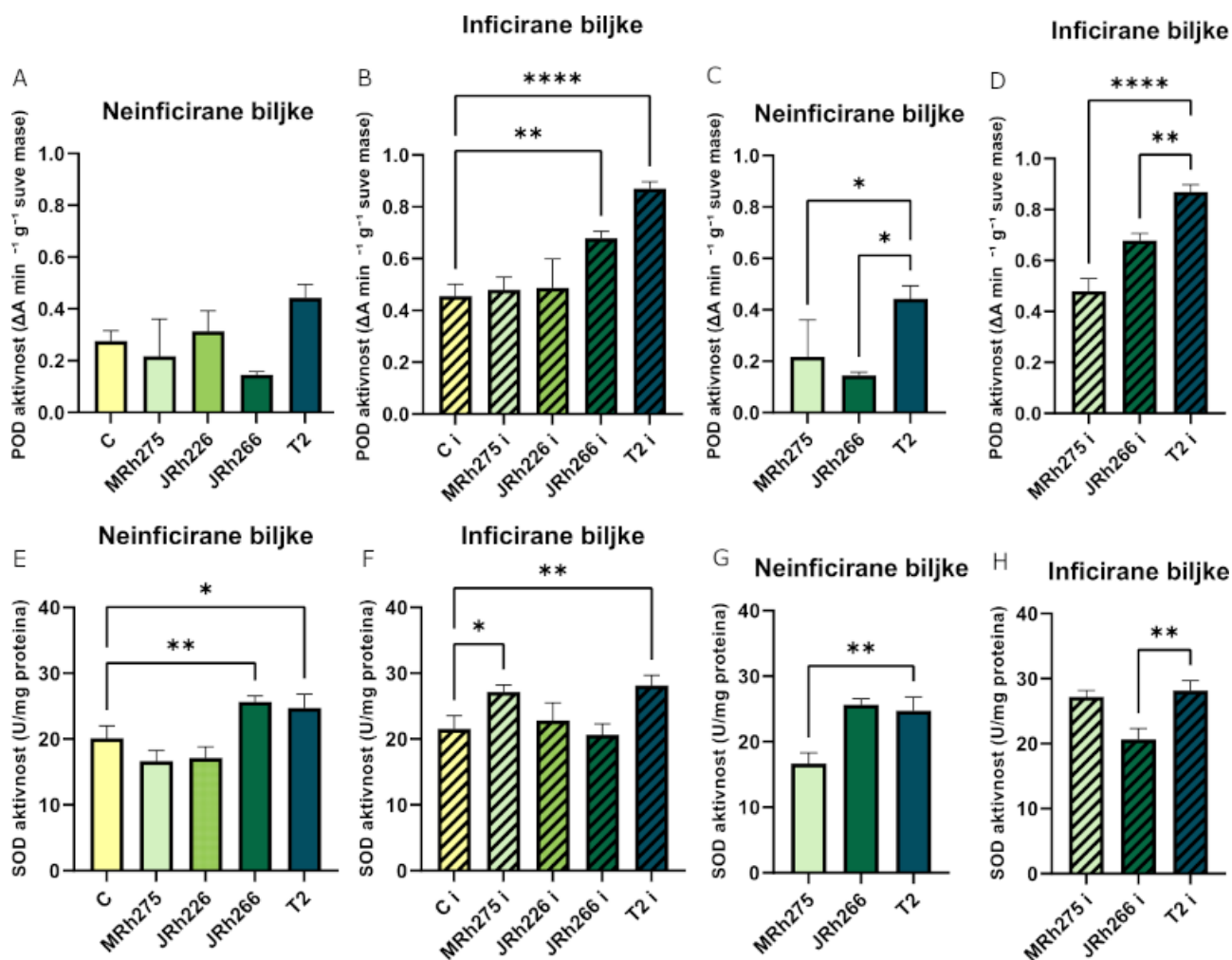


**Slika 20. Koncentracija vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) u biljnom tkivu pri direktnoj biokontroli.** Biljke tretirane različitim biokontrolnim izolatima upoređene su sa kontrolnom grupom (C), koja pre infekcije nije bila izložena bakterijama (A). Biljke istovremeno inokulisane različitim biokontrolnim sojevima i patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21 i upoređene sa inficiranom kontrolnom grupom (C i), koja je bila izložena samo patogenu (B). Poređenje efekta konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju u neinficiranim biljkama (C). Poređenje efekta konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju u inficiranim biljkama (D). Statistički značajne razlike označene su na sledeći način:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) (Preuzeto i modifikovano iz Krstić Tomić et al. (2026)).

## Uticaj biokontrolnih tretmana na aktivnost antioksidativnih enzima peroksidaze i superoksid-dismutaze

Tokom ispitivanja indirektno biokontrole, aktivnost ukupnih peroksidaza (eng. Peroxidase - POD) kod tretiranih neinficiranih biljaka nije se značajno razlikovala u odnosu na neinficiranu kontrolu (Slika 21A). Nasuprot tome, aktivnost supeksid-dismutaze (eng. SuperOxide Dismutase - SOD) bila je povećana kod biljaka tretiranih sojem *S. maltophilia* JRh266 i konzorcijumom T2 (Slika 21E). Nakon inokulacije patogena, oba enzima reagovala su na primenjene tretmane. Aktivnost POD bila je značajno povećana kod biljaka prethodno tretiranih sojem *S. maltophilia* JRh266 i konzorcijumom T2 (Slika 21B), dok je aktivnost SOD bila povećana kod biljaka tretiranih sojem *B. safensis* MRh275 i konzorcijumom T2 (Slika 21F).

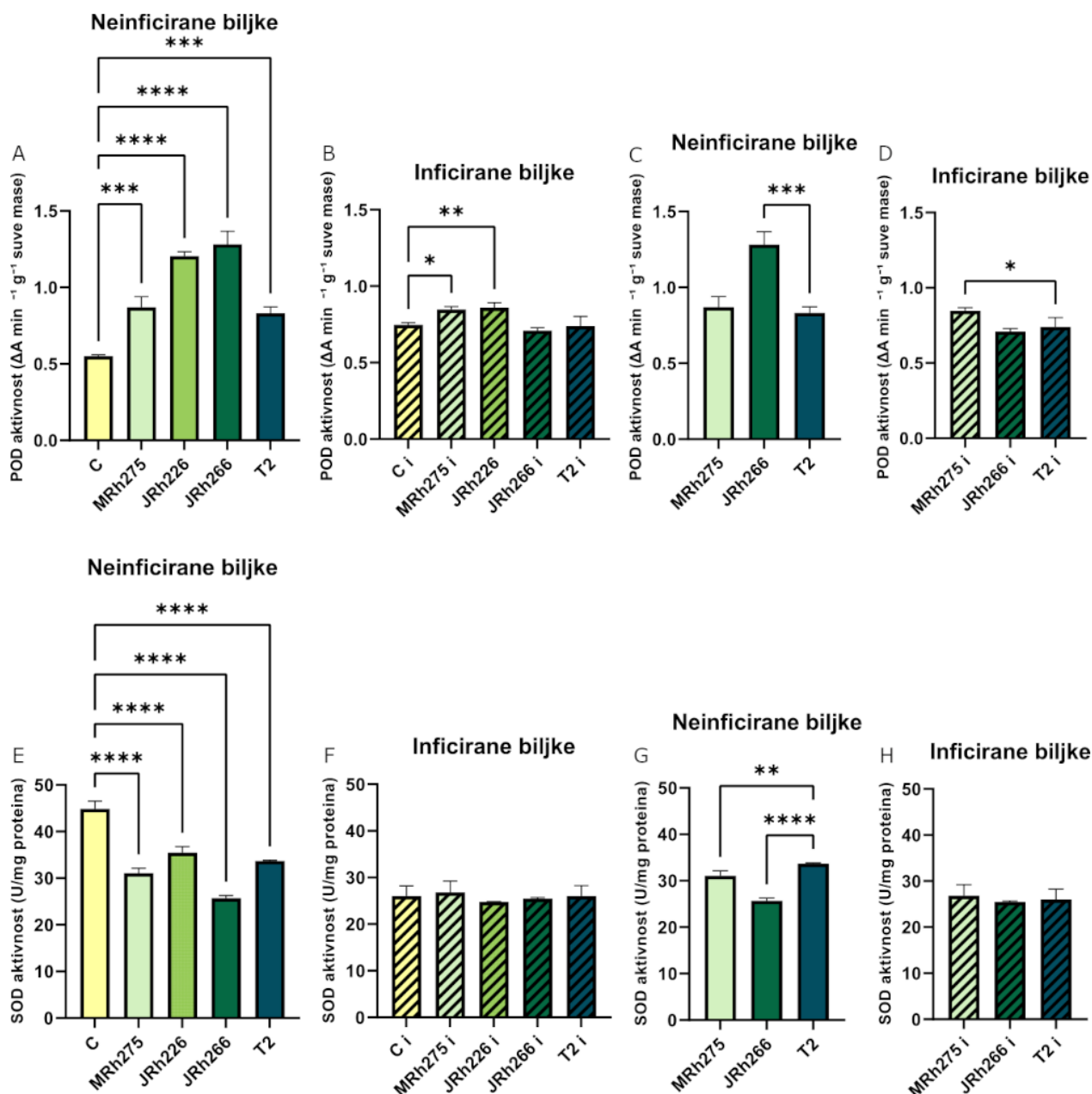
Komparativnom analizom konzorcijuma i njegovih sastavnih komponenti primećuje se da je kod neinficiranih biljaka konzorcijum indukovao višu aktivnost POD u odnosu na oba pojedinačna soja (Slika 21C), kao i višu aktivnost SOD u odnosu na soj *B. safensis* MRh275 (Slika 21G). Kod inficiranih biljaka, konzorcijum je, takođe, pokazao veću aktivnost POD u odnosu na pojedinačne sojeve (Slika 21D), dok je aktivnost SOD bila viša u odnosu na soj *S. maltophilia* JRh266 (Slika 21H).



**Slika 21. Aktivnost antioksidativnih enzima ukupne peroksidaze (POD) i superoksid dismutaze (SOD) u biljnom tkivu pri uslovima indirektno biokontrolne.** Aktivnost POD (A) i SOD (E) kod neinficiranih biljaka tretiranih različitim biokontrolnim izolatima u poređenju sa neinficiranom kontrolom (C). Aktivnost POD (B) i SOD (F) kod biljaka inokulisanih patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21 u poređenju sa inficiranom kontrolom (C i). Poređenje aktivnosti POD (C) i SOD (G) između konzorcijuma i sojeva koji ga sačinjavaju u neinficiranim biljkama. Poređenje aktivnosti POD (D) i SOD (H) između konzorcijuma i sojeva koji ga sačinjavaju u inficiranim biljkama. Statistički značajne razlike označene su na sledeći način:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) (Preuzeto i modifikovano iz Krstić Tomić et al. (2026)).

U uslovima direktne biokontrolne, kod neinficiranih biljaka zabeležena je povećana aktivnost POD u svim tretmanima (Slika 22A), dok je aktivnost SOD bila niža u odnosu na neinficiranu kontrolu (Slika 22E). Nakon infekcije patogenom, aktivnost POD bila je značajno povećana kod biljaka tretiranih sojevima *B. safensis* MRh275 i *B. pseudomycoides* JRh226 (Slika 22B), dok aktivnost SOD nije pokazala značajne razlike u poređenju sa inficiranom kontrolom (Slika 22F).

Analizom razlika između dejstva konzorcijuma i pojedinačnih sojeva utvrđeno je da je kod neinficiranih biljaka soj *S. maltophilia* JRh266 ispoljio veću aktivnost POD od konzorcijuma (Slika 22C), dok je konzorcijum indukovao višu aktivnost SOD u odnosu na sojeve *B. safensis* MRh275 i *S. maltophilia* JRh266 (Slika 22G). Kod inficiranih biljaka soj *B. safensis* MRh275 pokazao je veću aktivnost POD od konzorcijuma (Slika 22D), dok između tretmana nisu utvrđene značajne razlike u aktivnosti SOD (Slika 22H).



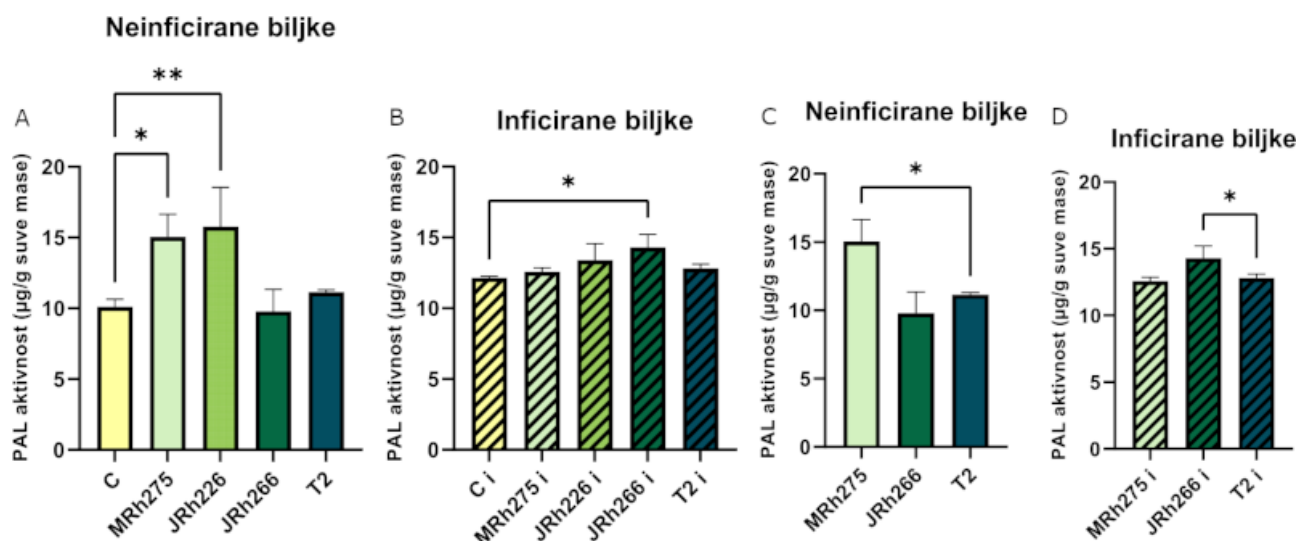
**Slika 22. Aktivnost antioksidativnih enzima ukupne peroksidaze (POD) i superoksid dismutaze (SOD) u biljnom tkivu pri uslovima direktne biokontrole.** Aktivnost POD (A) i SOD (E) kod neinficiranih biljaka tretiranih različitim biokontrolnim izolatima u poređenju sa neinficiranom kontrolom (C). Aktivnost POD (B) i SOD (F) kod biljaka inokuliranih patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21 u poređenju sa inficiranom kontrolom (C i). Poređenje aktivnosti POD (C) i SOD (G) između konzorcijuma i sojeva koji ga sačinjavaju u neinficiranim biljkama. Poređenje aktivnosti POD (D) i SOD (H) između konzorcijuma i sojeva koji ga sačinjavaju u inficiranim biljkama. Statistički značajne razlike označene su na sledeći način:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) (Preuzeto i modifikovano iz Krstić Tomić et al. (2026)).

## Uticaj biokontrolnih tretmana na aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze

Pri indirektnoj biokontroli, aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze (eng. Phenylalanine Ammonia-Lyase - PAL) kod neinficiranih biljaka bila je značajno viša nakon tretmana sojevima *B. safensis* MRh275 i *B. pseudomycoides* JRh226 u poređenju sa neinficiranom kontrolom (Slika 23A). Nakon inokulacije patogena, jedino je tretman sojem *S. maltophilia* JRh266 doveo do značajnog povećanja aktivnosti PAL u odnosu na inficiranu kontrolu (Slika 23B).

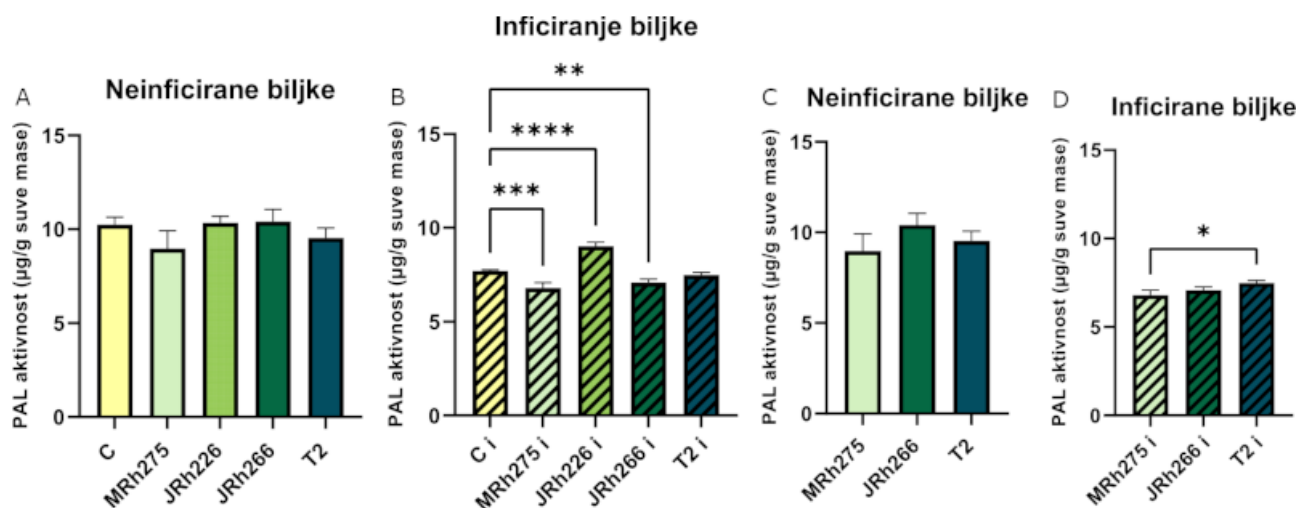
Poređenjem efekata konzorcijuma sa efektima pojedinačnih sojeva pokazalo se da je kod neinficiranih biljaka aktivnost PAL bila niža u tretmanu konzorcijumom nego kod tretmana sojem *B.*

*safensis* MRh275 (Slika 23C). Kod inficiranih biljaka konzorcijum je ispoljio nižu aktivnost PAL u odnosu na soj *S. maltophilia* JRh266 (Slika 23D).



**Slika 23. Aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze (PAL) u uslovima indirektne biokontrole.** Biljke tretirane različitim biokontrolnim sojevima upoređene su sa kontrolnom grupom (C), koja pre tretmana nije bila izložena bakterijama (A). Biljke tretirane različitim biokontrolnim izolatima inokulisane su patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21 i upoređene sa inficiranom kontrolnom grupom (C i), koja pre inokulacije nije bila izložena bakterijama (B). Poređenje efekta konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju u neinficiranim biljkama (C). Poređenje efekta konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju u inficiranim biljkama (D). Statistički značajne razlike označene su na sledeći način:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) (Preuzeto i modifikovano iz Krstić Tomić et al. (2026)).

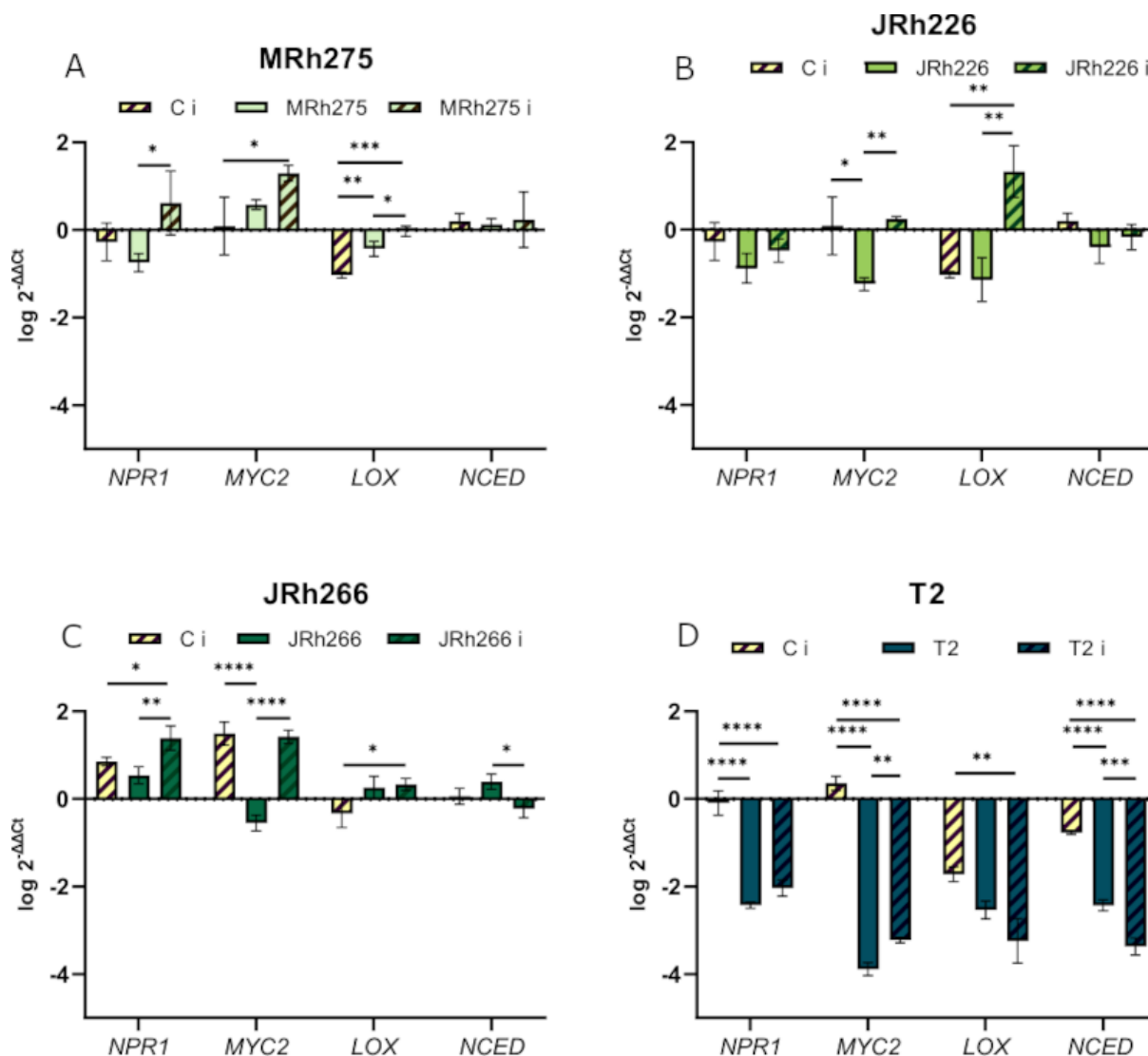
U eksperimentu gde su praćeni efekti direktne biokontrole nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti PAL između tretmana kod neinficiranih biljaka (Slika 24A). Nasuprot tome, kod biljaka istovremeno tretiranih patogenom i biokontrolnim izolatima, sojevi *B. safensis* MRh275 i *S. maltophilia* JRh266 doveli su do smanjenja aktivnosti PAL, dok je soj *B. pseudomycoides* JRh226 izazvao značajno povećanje aktivnosti ovog enzima u poređenju sa inficiranom kontrolom (Slika 24B).



**Slika 24. Aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze (PAL) u uslovima direktne biokontrole.** Biljke tretirane različitim biokontrolnim izolatima upoređene su sa kontrolnom grupom (C), koja pre infekcije nije bila izložena bakterijama (A). Biljke istovremeno inokulisane različitim biokontrolnim sojevima i patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21 i upoređene sa inficiranom kontrolnom grupom (C i), koja je bila izložena samo patogenu (B). Poređenje efekta konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju u neinficiranim biljkama (C). Poređenje efekta konzorcijuma sa sojevima koji ga sačinjavaju u inficiranim biljkama (D). Statistički značajne razlike označene su na sledeći način:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) (Preuzeto i modifikovano iz Krstić Tomić et al. (2026)).

## Ekspresija gena povezanih sa odbrambenim odgovorom biljke nakon primene biokontrolnih tretmana

Uticaj biokontrolnih tretmana na signalne puteve uključene u odbranu biljke procenjen je analizom ekspresije gena *NPR1*, *MYC2*, *LOX* i *NCED* primenom qPCR metode. U uslovima indirektno biokontrole, obrazac ekspresije analiziranih gena zavisio je od primenjenog bakterijskog soja (Slika 25).



**Slika 25. Ekspresija gena *NPR1*, *MYC2*, *LOX* i *NCED* u listovima šećerne repe u uslovima indirektno biokontrole.** Seme šećerne repe tretirano je biokontrolnim sojevima MRh275 (A), JRh226 (B), JRh266 (C) ili konzorcijumom T2 (D). Ekspresija gena analizirana je kod neinficiranih biljaka i biljaka inokulisanih patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21. Inficirana kontrolna grupa (C i) nije bila izložena bakterijama pre inokulacije patogenom. Ekspresija gena u grupi C i upoređena je sa ekspresijom kod inficiranih biljaka tretiranih biokontrolnim izolatima (MRh275 i, JRh226 i, JRh266 i i T2 i), kao i sa neinficiranim tretiranim biljkama (MRh275, JRh226, JRh266 i T2). Takođe su izvršena poređenja između neinficiranih i inficiranih biljaka prethodno tretiranih istim biokontrolnim agensom. Relativni nivoi ekspresije normalizovani su u odnosu na referentni gen *25S rRNK*, pri čemu je neinficirana netretirana kontrola korišćena kao referentni uzorak. Statistički značajne razlike označene su na sledeći način:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) (Preuzeto i modifikovano iz Krstić Tomić et al. (2026)).

U biljkama tretiranim sojem *Bacillus safensis* MRh275 (Slika 25A) nisu utvrđene značajne razlike u ekspresiji gena *NPR1* između inficirane kontrole (C i) i tretiranih biljaka, bez obzira na prisustvo patogena. Međutim, ekspresija ovog gena bila je značajno viša kod inficiranih biljaka tretiranih sojem MRh275 u poređenju sa neinficiranim tretiranim biljkama. Za gen *MYC2*, značajno povećanje nivoa transkripata zabeleženo je samo kod inficiranih tretiranih biljaka u odnosu na inficiranu kontrolu. Tretman sojem *B. safensis* MRh275 i u prisustvu i u odsustvu patogena doveo je do povećane

ekspresije gena *LOX* u odnosu na inficiranu kontrolu, dok za gen *NCED* nisu utvrđene značajne razlike između analiziranih tretmana.

Kod biljaka tretiranih sojem *Bacillus pseudomycooides* JRh226 (Slika 25B), ekspresija gena *NPRI* i *NCED* nije pokazala statistički značajne promene. Sa druge strane, nivo transkripata gena *MYC2* bio je značajno niži kod neinficiranih biljaka tretiranih biokontrolnim sojem biljaka u odnosu i na inficiranu kontrolu i na inficiranih biljaka tretiranih biokontrolnim sojem. Ekspresija gena *LOX* bila je značajno viša kod inficiranih biljaka tretiranih sojem *B. pseudomycooides* JRh226 u poređenju sa inficiranom kontrolom i neinficiranim tretiranim biljkama.

Analiza ekspresije gena *NPRI* pokazala je da su inficirane biljke tretirane sojem *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266 (Slika 25C) ispoljile značajno viši nivo ekspresije u odnosu na neinficirane tretirane biljke i inficiranu kontrolu. Za gen *MYC2*, inficirana kontrola i inficiran tretman biokontrolnim sojem pokazali su viši nivo transkripata u odnosu na tretirane neinficirane biljke, što je bilo u skladu sa trendom uočenim kod soja JRh226. Takođe, ekspresija gena *LOX* bila je značajno viša kod inficiranih biljaka tretiranih ovim sojem nego u inficiranoj kontroli. Ekspresija gena *NCED* bila je značajno viša kod neinficiranih biljaka tretiranih sojem *S. maltophilia* JRh266 u odnosu na inficirane tretirane biljke.

Za razliku od pojedinačnih sojeva, tretman konzorcijumom T2 (Slika 25D) uglavnom je doveo do smanjene ekspresije analiziranih gena. Inficirana kontrola pokazala je značajno višu ekspresiju gena *NPRI*, *MYC2*, *LOX* i *NCED* u poređenju sa neinficiranim i inficiranim biljkama tretiranim konzorcijumom. Zanimljivo je da su svi tretmani sa konzorcijumom pokazali nivo ekspresije niže od onih registrovanih kod zdravih biljaka.

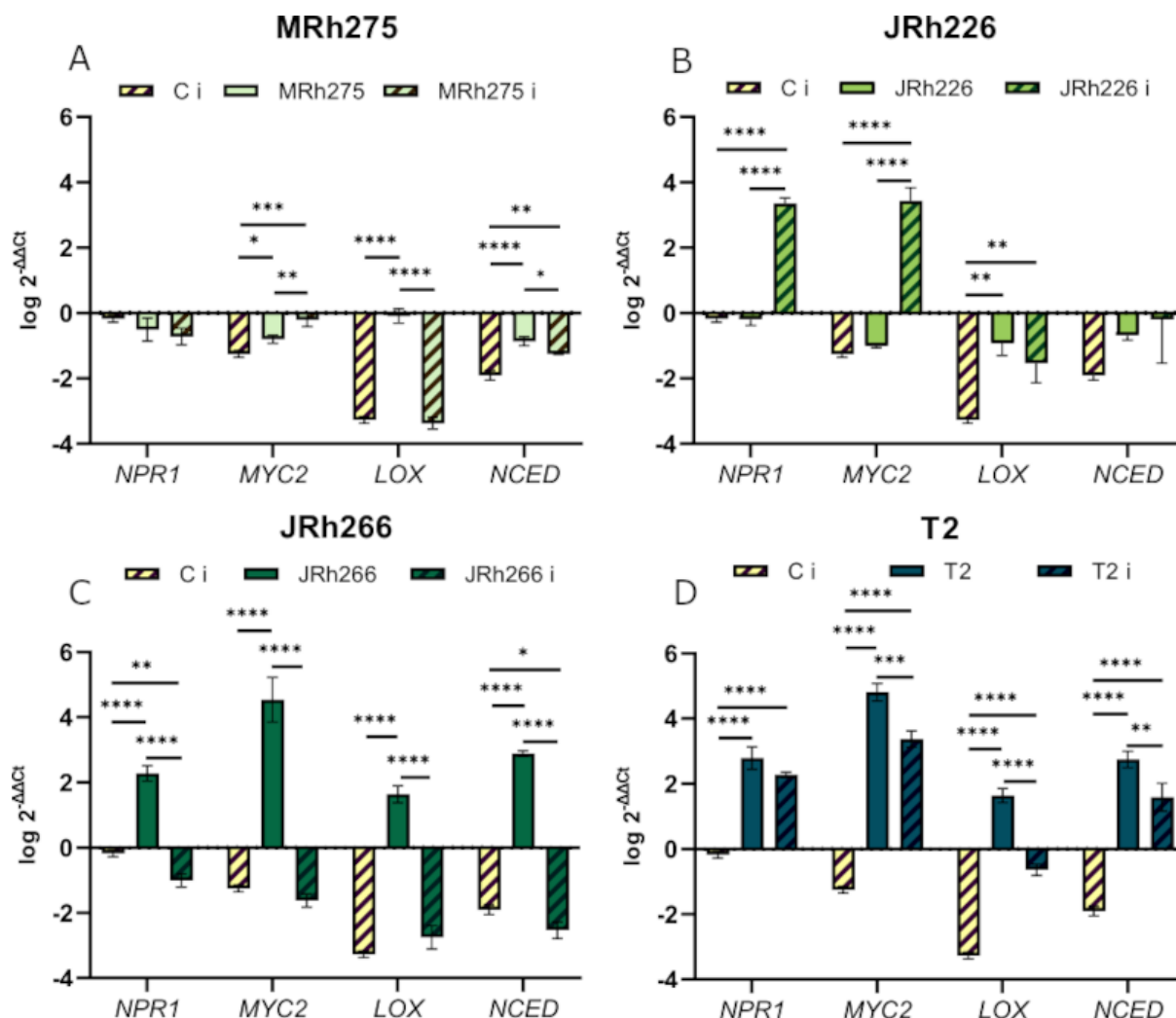
Ekspresija gena *NPRI*, *MYC2*, *LOX* i *NCED* analizirana je i u uslovima direktne biokontrole, pri čemu su patogen i biokontrolni agensi istovremeno primenjivani na biljke (Slika 26). Kod biljaka tretiranih sojem *B. safensis* MRh275 (Slika 26A), nisu utvrđene značajne razlike u ekspresiji gena *NPRI* između analiziranih tretmana. Nasuprot tome, ekspresija gena *MYC2* bila je značajno viša kod biljaka tretiranih sojem *B. safensis* MRh275, kao i kod inficiranih biljaka tretiranih ovim sojem, u poređenju sa inficiranom kontrolom. Za gen *LOX*, biljke tretirane sojem *B. safensis* MRh275 bez prisustva patogena, pokazale su višu ekspresiju u odnosu na biljke kojima je dodat i patogen (inficirana kontrola i inficirani tretman biokontrolnim sojem). Ekspresija gena *NCED* bila je značajno viša kod biljaka tretiranih sojem *B. safensis* MRh275 i kod inficiranih biljaka tretiranih ovim sojem u odnosu na inficiranu kontrolu, pri čemu je najveća ekspresija zabeležena kod neinficiranih tretiranih biljaka. Ipak, nivoi ekspresije svih analiziranih gena bili su niži od onih registrovanih kod zdravih biljaka.

Nakon tretmana sojem *B. pseudomycooides* JRh226 (Slika 26B), inficirane biljke pokazale su značajno višu ekspresiju gena *NPRI* i *MYC2* u poređenju sa inficiranom kontrolom i neinficiranim tretiranim biljkama. Za gen *LOX*, i neinficirane i inficirane biljke tretirane sojem *B. pseudomycooides* JRh226 pokazale su značajno višu ekspresiju u odnosu na inficiranu kontrolu, iako su vrednosti ostale niže od onih zabeleženih kod zdravih biljaka. Za gen *NCED* nisu utvrđene statistički značajne razlike između analiziranih tretmana.

Analiza biljaka izloženih soju *S. maltophilia* JRh266 (Slika 26C) pokazala je da je ekspresija gena *NPRI* bila značajno viša kod neinficiranih tretiranih biljaka u odnosu na inficiranu kontrolu i inficirane biljke tretirane istim sojem. Sličan obrazac uočen je i za gene *MYC2*, *LOX* i *NCED*. Za gen *NPRI* i *NCED* je osim navedenih razlika uočeno da je i ekspresija u inficiranoj kontroli bila je viša nego kod inficiranih biljaka tretiranih sojem *S. maltophilia* JRh266.

Tretman konzorcijumom T2 (Slika 26D) doveo je do značajno više ekspresije gena *NPRI* kod neinficiranih i inficiranih biljaka u poređenju sa inficiranom kontrolom. Sličan obrazac ekspresije zabeležen je i za gene *MYC2*, *LOX* i *NCED*. Međutim, za sve analizirane gene nivoi transkripata bili

su značajno viši kod neinficiranih biljaka tretiranih konzorcijumom nego kod inficiranih biljaka tretiranih istim konzorcijumom.



**Slika 26. Ekspresija gena *NPR1*, *MYC2*, *LOX* i *NCED* u listovima šećerne repe u uslovima direktne biokontrole.** Biljke su tretirane biokontrolnim sojem MRh275 (A), JRh226 (B), JRh266 (C) ili konzorcijumom T2 (D), pojedinačno ili istovremeno sa patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21. Inficirana kontrolna grupa (C i) nije bila izložena bakterijama pre inokulacije patogenom. Ekspresija gena u grupi C i upoređena je sa ekspresijom kod inficiranih biljaka tretiranih biokontrolnim izolatima (MRh275 i, JRh226 i, JRh266 i i T2 i), kao i sa neinficiranim tretiranim biljkama (MRh275, JRh226, JRh266 i T2). Takođe su izvršena poređenja između neinficiranih i inficiranih biljaka tretiranih istim biokontrolnim agensom. Relativni nivoi ekspresije normalizovani su u odnosu na referentni gen *25S rRNK*, pri čemu je neinficirana netretirana kontrola korišćena kao referentni uzorak. Statistički značajne razlike označene su na sledeći način:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) (Preuzeto i modifikovano iz Krstić Tomić et al. (2026)).

# DISKUSIJA

Metabarkodiranje *16S rRNA* gena danas predstavlja jednu od standardnih metoda za proučavanje strukture i diverziteta bakterijskih zajednica u različitim životnim sredinama, uključujući i mikrobiome biljaka (Jiang et al., 2023; Lopes et al., 2023). Ova metoda omogućava sveobuhvatan uvid u taksonomski sastav bakterijske zajednice i praćenje promena u njenoj strukturi tokom vremena, ali samo prisustvo određenog taksona ne pruža informaciju o njegovim stvarnim funkcionalnim osobinama, niti omogućava direktnu procenu njegovog potencijala za stimulaciju rasta biljaka ili biološku kontrolu. Zbog toga se postavlja pitanje u kojoj meri podaci dobijeni metabarkodiranjem mogu ukazati na prisustvo bakterija koje istovremeno poseduju više osobina korisnih za biljku. U tom kontekstu, jedan od važnih aspekata ovog istraživanja bio je poređenje rezultata dobijenih metodom nezavisnom od kultivacije, odnosno metabarkodiranjem gena *16S rRNA*, sa rezultatima dobijenim metodom zavisnom od kultivacije, koja je obuhvatila izolaciju bakterija na različitim mikrobiološkim podlogama i njihovu naknadnu funkcionalnu karakterizaciju. Za razliku od metabarkodiranja, koje pruža uvid u širu strukturu bakterijske zajednice, kultivacija omogućava dobijanje bakterijskih kultura i njihovu detaljnu fenotipsku i funkcionalnu karakterizaciju, što je od posebnog značaja za identifikaciju i selekciju kandidata sa potencijalom za primenu kao biofertilizatora ili bioloških agenasa za suzbijanje biljnih patogenata. Međutim, metoda kojom se vrši izolacija bakterija ne omogućava sveobuhvatan prikaz ukupne bakterijske zajednice, budući da značajan broj mikroorganizama još uvek nije moguće uspešno gajiti u laboratorijskim uslovima (McIlwaine et al., 2024). Stoga kombinovani pristup, koji objedinjuje metode nezavisne od kultivacije sa metodama zasnovanim od izolacije i kultivacije, predstavlja najadekvatniji okvir za povezivanje informacija o taksonomskom sastavu bakterijske zajednice sa njenim funkcionalnim potencijalom i za selekciju kandidata sa perspektivom za primenu u održivoj poljoprivredi.

Ovakav komplementaran pristup posebno je značajan u istraživanju biljnih mikrobioma, jer taksonomska zastupljenost određene bakterije ne mora nužno biti proporcionalna njenom funkcionalnom značaju. Bakterijski takson koji je prisutan u maloj relativnoj zastupljenosti može posedovati osobine od velikog značaja za biljku, dok dominantni član zajednice ne mora istovremeno imati izražen potencijal za promociju rasta biljke ili biokontrolu (Banerjee et al., 2018). Dodatno, rezolucija metabarkodiranja zavisi od izabranog regiona gena *16S rRNA*, kvaliteta sekvenciranja i dostupnosti referentnih sekvenci, zbog čega blisko srodni taksoni ne mogu uvek biti pouzdano razdvojeni (Poretsky et al., 2014). Stoga se rezultati metabarkodiranja mogu smatrati veoma značajnim za opisivanje strukture zajednice, ali ne i dovoljnim za direktnu selekciju funkcionalno najperspektivnijih bakterijskih izolata.

Kako bi se što bolje istražio deo mikrobioma šećerne repe koji je moguće gajiti i identifikovati bakterije sa potencijalno korisnim osobinama, uzorci rizosfere i filozofere zasejavani su na različite mikrobiološke podloge. Najveća raznovrsnost vrsta iz rizosfere dobijena je na podlozi, koja je sadržala ekstrakt korena šećerne repe (REa, eng. **R**oot **E**xtract **a**gar). Ova podloga je prethodno pokazala efikasnost u izolaciji bakterija iz rizosfere kaktusa i sukulentnih biljaka, pri čemu su izolovani predstavnici rodova *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* i *Azospirillum* (Youssef et al., 2016). U ovom istraživanju, na ovoj podlozi takođe je izolovan veći broj predstavnika roda *Bacillus*, ali i rodova *Pseudomonas*, *Microbacterium* i *Acinetobacter*. Posebno je značajno da je, iako je najveća ukupna raznovrsnost rizosfernih bakterija dobijena na podlozi sa ekstraktom korena šećerne repe, najveći broj izolata sa osobinama korisnim za biljku dobijen na bogatoj neselektivnoj hranljivoj podlozi (0.01 TSA, eng. 0.01 **T**ryptic **S**oy **A**gar). Ova podloga sadrži relativno niske koncentracije izvora ugljenika i azota, uključujući dekstrozu, tripton pepton i fiton pepton. Na ovoj podlozi izolovani su predstavnici rodova *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Brucella*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Acinetobacter*. Većina izolata imala je više korisnih osobina, naročito sposobnost stimulacije klijanja, produkcije siderofora i antagonističkog delovanja prema ispitivanim patogenima. Efikasnost ove podloge u izolaciji bakterija sa većim brojem korisnih osobina u skladu je sa prethodnim

istraživanjima u kojima je ova podloga korišćena za izolaciju bakterija koje stimulišu rastenje uljane repice i *Rhus tripartitus* (Alotaibi et al., 2022; Benaissa et al., 2018; Kurm et al., 2019). Ipak, način na koji ova podloga favorizuje upravo takve bakterijske grupe još uvek nije u potpunosti razjašnjen.

Ovi rezultati pokazuju da izbor podloge ne utiče samo na broj izolovanih bakterija, već i na sastav i funkcionalni potencijal dobijenih izolata. Različite podloge stvaraju različite nutritivne uslove i time favorizuju rast pojedinih članova mikrobijalne zajednice, zbog čega podloga koja omogućava izolaciju najvećeg broja taksona ne mora istovremeno biti i najpogodnija za dobijanje bakterija sa željenim biološkim osobinama. U tom smislu, dodatak ekstrakata biljnih organa može doprineti stvaranju nutritivnih uslova koji su sličniji onima u prirodnom staništu, mikrobiomu biljke i tako omogućiti rast bakterijskih grupa koje se teže razvijaju na standardnim laboratorijskim podlogama (Sarhan et al., 2019).

U filsoferi je najveća raznovrsnost vrsta dobijena na hranljivom agaru, komercijalnoj neselektivnoj hranljivoj podlozi, dok je najveći broj izolata sa osobinama korisnim za biljku dobijen na podlozi koja je bila obogaćena ekstraktom lista šećerne repe (LEa, eng. Leaf Extract agar). Ovaj rezultat je posebno značajan jer pokazuje da podloge koje u sebi sadrže biljne ekstrakte mogu imati prednost kada je cilj izolacija bakterija sa funkcionalnim osobinama, čak i kada standardne bogate podloge daju veći ukupan broj ili raznovrsnost izolata. U tom smislu, bogate podloge mogu biti korisne za opis zajednice koja se može kultivisati, dok biljni ekstrakti mogu predstavljati efikasniji selekциони faktor kada je cilj pronalaženje bakterija koje su ekološki povezane sa konkretnim domaćinom i potencijalno poseduju osobine značajne za njegov rastenje i zaštitu.

Upoređujući periode uzorkovanja (maj, jul i oktobar), najveća zastupljenost izolata sa korisnim osobinama uočena je u julu, kako u rizosferi, tako i u filsoferi. Među posebno značajnim izolatima izolovanih u ovom mesecu izdvojeni su *Bacillus safensis* i *Enterobacter ludwigii*, koji su pokazali osam od deset ispitivanih korisnih osobina. Soj *B. safensis* JRh276 je izolovan iz rizosfere na podlozi obogaćenoj ekstraktom zemljišta i fitagelom korišćenim kao agensom za očvršćavanje. Ovaj soj pokazao je sposobnost stimulacije klijanja, produkcije siderofora i solubilizacije fosfata, u skladu sa prethodno opisanim PGP potencijalom vrste *Bacillus safensis* (T. Wu et al., 2019). Pozitivni efekti ove vrste na rastenje biljaka i toleranciju na abiotički stres prethodno su potvrđeni kod kukuruza (Azeem et al., 2022) i pšenice (Chakraborty et al., 2013). U ovom istraživanju dodatno je pokazano da je *B. safensis* JRh276 pokazao antagonističku aktivnost prema svim ispitivanim patogenima šećerne repe. Ovakva kombinacija osobina čini ovaj soj posebno interesantnim kandidatom za dalju funkcionalnu karakterizaciju. Dva soja *E. ludwigii* JRh243 i JRh264 izolovana iz rizosfere tokom jula, na bogatoj neselektivnoj hranljivoj podlozi i podlozi se ekstraktom zemlje, respektivno, iako su pripadala istoj vrsti i poticala iz istog mikrostaništa i perioda uzorkovanja, izolati nisu imali potpuno identičan funkcionalni profil. Oba soja su pokazala sposobnost stimulacije klijanja, produkcije siderofora i aktivnosti prema svim ispitivanim patogenima, dok je JRh243 pokazao sposobnost solubilizacije fosfata, a JRh264 produkcije egzopolisaharida. Ova razlika između izolata iste vrste predstavlja važan rezultat jer ukazuje da taksonomska identifikacija na nivou vrste nije dovoljna za procenu biološkog potencijala pojedinačnog izolata. Fenotipska varijabilnost između soja iste vrste ima važan značaj za selekciju mikroorganizama namenjenih primeni u biljnoj proizvodnji. Prisustvo određenog taksona samo po sebi ne garantuje ispoljavanje osobina povezanih sa promocijom rasta biljaka ili biokontrolom, jer se njihova ekspresija može razlikovati između pojedinačnih sojeva. Zbog toga izbor potencijalnih bioloških agenasa ne bi trebalo zasnivati samo na taksonomskoj pripadnosti, već i na funkcionalnoj karakterizaciji pojedinačnih izolata. Pored toga, obećavajuće osobine utvrđene u laboratorijskim uslovima potrebno je potvrditi u uslovima koji bolje odražavaju složenost interakcija između biljke, mikroorganizma i patogena (Mesele et al., 2026). U drugim istraživanjima, sojevi vrste *E. ludwigii* su, takođe, povezani sa različitim osobinama promocije rasta biljaka, uključujući solubilizaciju fosfata, stimulaciju razvoja bočnih korenova i antagonističko delovanje prema pojedinim patogenim gljivama (Bendaha & Belaouni, 2020; Shoebitz et al., 2009). U ovom istraživanju, aktivnost sojeva JRh243 i JRh264 prema patogenima šećerne repe dodatno podržava

njihov potencijal za primenu u biološkoj zaštiti, ali konačna procena njihove efikasnosti zahteva dalja ispitivanja u uslovima *in planta*. Međutim, s obzirom na to da pojedini predstavnici roda *Enterobacter* mogu imati oportunistički patogeni potencijal, neophodno je pre potencijalne primene ovih sojeva sprovesti i odgovarajuću procenu njihovih bezbednosnih karakteristika i potencijalnih faktora rizika (Keswani et al., 2019).

Pored sojeva *E. ludwigii* i *B. safensis*, tokom jula je izolovano više sojeva *Stenotrophomonas maltophilia* (JL30, JL5, JRh233, JRh235, JL41, JRh239, JRh266, JL47, JL56, JL67, JL71, JL 9, JRh205.2, JRh240, JL15, JL37 i JL55) iz rizosfere i filosfere. Zajednička karakteristika ovih sojeva bila je antagonistička aktivnost prema ispitivanim patogenima šećerne repe. *S. maltophilia* je poznata po različitim interakcijama sa biljkama, a njena sposobnost stimulacije rastenja opisana je kod više biljnih vrsta, naročito u uslovima abiotičkog stresa (Alexander et al., 2019; R. Singh & Jha, 2017). Prisustvo ove vrste u oba mikrostaništa i njena aktivnost prema patogenima ukazuju na mogućnost šire ekološke uloge, ali istovremeno naglašavaju potrebu za detaljnijom procenom specifičnosti interakcije između izolata, domaćina i patogena. Ipak, njihova potencijalna primena u biološkoj zaštiti zahteva i detaljnu procenu bezbednosnih karakteristika, imajući u vidu da pojedine vrste ovog roda mogu biti povezane sa oportunističkim patogenim delovanjem (Keswani et al., 2019).

*Acinetobacter calcoaceticus* MRh107 je izolovan iz rizosfere u maju na neselektivnoj hranljivoj podlozi, ima najveći broj korisnih osobina među izolatima iz tog perioda. Vrste roda *Acinetobacter* već su povezivane sa promocijom rastenja različitih vrsta biljaka, uključujući *Lemna minor* i *Lactuca sativa* (Suzuki et al., 2014). Ovaj rezultat ukazuje da potencijalno korisne bakterije mogu biti prisutne i tokom ranijih faza razvoja biljke, ali da njihova zastupljenost i funkcionalni profil mogu značajno varirati tokom vegetacionog perioda.

U oktobru je iz uzorka rizosfere, zasejanog na podlogu obogaćenu metanolnim ekstraktom zemljišta (MSEM, eng. Methanol Soil Extract Medium), izolovan soj *Pantoea ananatis* ORh24, sa najvećim brojem korisnih osobina. Ovaj soj pokazao je pozitivne sve funkcionalne osobine, izuzev produkcije cijanovodonika (HCN), uz izraženu aktivnost prema više patogena šećerne repe. Posebno je interesantno da je *P. ananatis* vrsta koja je u literaturi povezana kako sa patogenim delovanjem na biljke (Weller-Stuart et al., 2017), tako i sa osobinama koje mogu doprineti promociji njihovog rastenja (Duchateau et al., 2026; Lu et al., 2021). Ovakva dualnost dodatno naglašava da sama identifikacija vrste nije dovoljna za procenu njenog biološkog efekta, već je neophodno okarakterisati konkretne izolate i proceniti njihov efekat na biljku u kontrolisanim eksperimentima. U istom periodu izolovan je i soj *Bacillus pumilus* ORh92, koje je pokazao sve pozitivne testirane PGP osobine, osim produkcije HCN i pozitivnog uticaja na klijavost semena. Prethodna istraživanja ukazuju da predstavnici ove vrste mogu proizvoditi različite biljne hormone i druge supstance povezane sa promocijom rastenja biljaka (Dobrzyński et al., 2022). Njihovo prisustvo među funkcionalno interesantnim izolatima dobijenim u kasnijoj fazi razvoja šećerne repe dodatno podržava pretpostavku da se funkcionalni potencijal bakterija biljnog mikrobioma koje je moguće gajiti, menja tokom vegetacionog perioda.

U ovom istraživanju sezonska dinamika se nije ogledala samo u promeni taksonomskog sastava, već i u promeni broja vrsta izolovanih bakterija sa korisnim osobinama. U prethodnim istraživanjima mikrobiom šećerne repe analiziran je iz različitih aspekata, uključujući sezonske promene mikrobioma lateralnog korena (Ikeda et al., 2023), prostorno-vremenske promene endofitnih bakterijskih zajednica (Shi et al., 2014), uticaj različitih sistema đubrenja na rizobiom (Hudz, 2021), kao i povezanost bakterijske zajednice lista sa osetljivošću biljke na virusne (Majumdar et al., 2022) i fungalne bolesti (Broccanello et al., 2022). To ukazuje da analiza sezonskih promena mikrobioma može imati praktičan značaj za identifikaciju perioda u kojima je verovatnije izolovati bakterijske kandidate sa željenim funkcionalnim karakteristikama.

Analiza podataka metabarkodiranja nije pokazala statistički značajne promene parametara alfa diverziteta između sezona, iako je broj OTU jedinica opadao od maja prema oktobru. Sličan obrazac

sezonske dinamike mikrobioma rizosfere prethodno je opisan kod šećerne repe, pri čemu je diverzitet rastao između juna i avgusta, dostizao relativnu stabilizaciju tokom avgusta, a zatim opadao u septembru (Ikeda et al., 2023). Ovakvi rezultati ukazuju da sezonske promene ne moraju nužno dovesti do značajnih promena ukupne strukture zajednice na nivou alfa diverziteta, ali mogu biti praćene promenama u zastupljenosti pojedinačnih taksona i njihovim međusobnim odnosima.

Sezonska dinamika mikrobioma može biti posledica istovremenog delovanja većeg broja biotičkih i abiotičkih faktora, pri čemu se njihov uticaj može razlikovati između pojedinih biljnih mikrostaništa. Rizosfera predstavlja sredinu relativno bogatu organskim materijama poreklom iz zemljišta i korenovih eksudata, čiji se sastav može menjati u zavisnosti od fiziološkog statusa i razvojne faze biljke (Vives-Peris et al., 2020). Nasuprot tome, filosfera je neposredno izložena atmosferskim uslovima i većim oscilacijama temperature i vlažnosti, ultravioletnom zračenju i ograničenoj dostupnosti hranljivih materija, zbog čega predstavlja izrazito selektivno mikrostanište za mikroorganizme (Vorholt, 2012). Pored abiotičkih uslova, na strukturu zajednice i njenu sezonsku dinamiku mogu uticati i karakteristike biljnog domaćina, interakcije među mikroorganizmima i antropogeni faktori (W. Huang et al., 2024). Stoga se razlike u bakterijskom diverzitetu između rizosfere i filosofere mogu posmatrati kao posledica različitih ekoloških uslova koji karakterišu ova dva mikrostaništa. U skladu sa tim, u ovom istraživanju zabeležen je niži bakterijski diverzitet u filosferi u odnosu na rizosferu, što je u saglasnosti sa prethodno opisanim razlikama između ova dva mikrostaništa (Thompson et al., 1993). U periodu obuhvaćenom istraživanjem, prosečna temperatura u Srbiji tokom jula 2022. godine bila je viša nego u maju i oktobru, što bi moglo predstavljati jedan od faktora koji su doprineli izraženoj promeni relativne zastupljenosti dominantnih bakterijskih taksona tokom jula. Međutim, ovakav obrazac treba tumačiti sa oprezom, budući da vremenska podudarnost između promene temperature i promene strukture bakterijske zajednice sama po sebi ne predstavlja dokaz uzročno-posledične veze.

Pored abiotičkih uslova, na strukturu zajednice mogu uticati i karakteristike biljnog domaćina, interakcije među mikroorganizmima i antropogeni faktori (W. Huang et al., 2024). Stoga se razlike u bakterijskom diverzitetu između rizosfere i filosofere mogu posmatrati kao posledica različitih ekoloških uslova koji karakterišu ova dva mikrostaništa. U skladu sa tim, u ovom istraživanju zabeležen je niži bakterijski diverzitet u filosferi u odnosu na rizosferu, što je u saglasnosti sa prethodno opisanim razlikama između ova dva mikrostaništa (Thompson et al., 1993). Istovremeno, sezonske promene u temperaturi, vlažnosti i drugim faktorima životne sredine, zajedno sa promenama u fiziologiji biljke tokom vegetacionog razvoja, mogu dodatno doprineti promenama u strukturi filosoferne zajednice.

Kao i u prethodnim istraživanjima, Actinobacteriota i Proteobacteria bili su najzastupljeniji razdeli u rizosferi (Hudz, 2021; Ikeda et al., 2023; Mendes et al., 2011) detektovani metodom metabarkodiranja, tokom svih analiziranih sezona. Na nižim taksonomskim nivoima uočena je visoka zastupljenost roda *Bacillus*, koji obuhvata veliki broj bakterija poznatih po osobinama povezanim sa promocijom rastenja biljaka (Narayanan et al., 2022). Značajna zastupljenost roda *Bacillus* u rizosferi šećerne repe u skladu je sa prethodnim nalazima (Ikeda et al., 2023), iako je u ranijim istraživanjima njegova visoka zastupljenost bila izraženija tokom ranijih faza razvoja biljke. Među vrstama koje su bile zastupljene u većem broju u rizosferi tokom različitih perioda izdvojile su se *Bacillus niacini* i *Bacillus simplex*. Prisustvo *B. niacin* može biti povezano sa sposobnošću ove bakterije da koristi nikotinsku kiselinu, prisutnu u eksudatima korena šećerne repe, kao izvor ugljenika i azota (de Oliveira et al., 2021). *B. simplex* je široko rasprostranjena bakterija zemljišta, a prethodno je pokazano da može doprineti stimulaciji rastenja drugih biljnih vrsta, uključujući soju i kukuruz (Senger et al., 2022). Međutim, na osnovu samog prisustva ovih bakterija u rizosferi ne može se zaključiti da one direktno utiču na rastenje šećerne repe, što predstavlja važno ograničenje interpretacije podataka dobijenih metabarkodiranjem. Još jedan takson koji je bio zastupljen u većoj meri bio je rod *Nitrososphaera*, ranije uočenog sa visokom zastupljenošću u rizosferi kukuruza (Cano-Serrano et al., 2026) i masline (Caliz et al., 2015). Predstavnici ovog roda pripadaju arheama

koje učestvuju u procesu oksidacije amonijaka, koji je važan za kruženje azota i rastenje biljaka (Reyes et al., 2020). Njihova relativno visoka zastupljenost u rizosferi šećerne repe mogla bi biti povezana sa dostupnošću azotnih jedinjenja u zemljištu, posebno imajući u vidu da je reč o zemljištu koje je bilo pod uticajem mineralnog đubrenja (Zarraonaindia et al., 2020). Prisustvo mikroorganizama uključenih u ciklus azota dodatno ukazuje na činjenicu da mikrobiom rizosfere ne predstavlja samo skup potencijalno korisnih bakterija, već funkcionalno kompleksnu zajednicu koja učestvuje u kruženju elemenata i dostupnosti hranljivih materija biljci.

U filosferi su, slično kao i u rizosferi, Actinobacteriota i Proteobacteria predstavljale dominantne bakterijske grupe. Iako je ukupni diverzitet filosferne zajednice bio niži u odnosu na rizosferu, njena struktura je pokazala prisustvo različitih bakterijskih taksona koji su se razlikovali u relativnoj zastupljenosti tokom vegetacionog perioda. U analiziranoj filosfernoj zajednici najzastupljeniji bakterijski rod bio je *Komagataeibacter*. Predstavnici ovog roda prethodno su registrovani u epifitnim bakterijskim zajednicama na površini plodova različitih biljnih vrsta (Gao et al., 2023; C. Zhang et al., 2026), dok prema dostupnoj literaturi njihovo prisustvo na listovima drugih biljnih vrsta nije prethodno zabeleženo. Vrste roda *Komagataeibacter* imaju sposobnost oksidacije etanola i drugih ugljeničnih jedinjenja (R. Gomes et al., 2018), kao i sinteze bakterijske celuloze, koja može doprineti formiranju biofilma i kolonizaciji biljnih površina (Augimeri et al., 2015). Drugi najzastupljeniji rod bio je *Acidothermus*, koji je registrovan u različitim biljnim mikrostaništima, uključujući rizosferu i filosferu (Lin et al., 2022; Sommer et al., 2024). Predstavnici ovog roda poznati su po izraženoj celulolitičkoj aktivnosti, što je povezano sa prisustvom više gena koji kodiraju enzime uključene u razgradnju biljnih strukturnih ugljenih hidrata (Barabote et al., 2009). Među najčešće detektovanim vrstama u filosferi izdvojena je *Komagataeibacter saccharivorans*, s tim da se njena zastupljenost značajno smanjuje tokom jula meseca. Njena funkcionalna uloga u filosferi šećerne repe još uvek nije dovoljno poznata. Njeno prisustvo, međutim, ukazuje na značaj detaljnijeg proučavanja pojedinačnih članova filosferne zajednice, naročito onih koji se pojavljuju u većoj relativnoj zastupljenosti, ali čija funkcionalna povezanost sa domaćinom još nije razjašnjena.

Kada se rezultati metabarkodiranja uporede sa rezultatima izolacije, postaje jasno da je metoda zavisna od kultivacije omogućila identifikaciju određenih potencijalno korisnih bakterijskih grupa koje nisu bile detektovane metodom nezavisnom od kultivacije. Ukupan broj efektivnih sekvenci dobijen u ovom istraživanju iznosio je 2,072 miliona, dok je detektovano ukupno 179 vrsta. U poređenju sa pojedinim prethodnim istraživanjima mikrobioma šećerne repe, u kojima je primenjena veća dubina sekvenciranja, dobijen je manji broj sekvenci (Shi et al., 2014). Ove niže vrednosti mogu biti posledica razlika u dubini sekvenciranja, ali i primenjenom V3-V4 regionu gena za *16S rRNA*. Izbor hipervarijabilnog regiona može značajno uticati na taksonomsku rezoluciju, budući da se pojedini regioni razlikuju u sposobnosti razlikovanja blisko srodnih taksona (Johnson et al., 2019). Sekvenciranje dužih fragmenata, odnosno većeg dela ili celog gena *16S rRNA*, može pružiti dodatnu filogenetsku informaciju i omogućiti precizniju taksonomsku klasifikaciju, posebno na nivou vrste. Zbog toga činjenica da određeni rod ili vrsta nisu detektovani metabarkodiranjem ne mora nužno značiti da su potpuno odsutni iz uzorka, već može biti posledica njihove niske relativne zastupljenosti, ograničenja primenjene metode ili nedovoljne rezolucije korišćenog regiona.

Upravo zbog ovoga pojedini potencijalno korisni rodovi, uključujući rodove *Brucella*, *Enterobacter* i *Paenarthrobacter*, identifikovani su samo pristupom kultivacije. Među detektovanim rodovima koji su prethodno povezivani sa promocijom rastenja šećerne repe nalazili su se *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Nocardioide* (Okazaki et al., 2021), *Enterobacter* i *Pantoea* (Petrović et al., 2024). Sa druge strane, istraživanje je ukazalo i na nekoliko rodova povezanih sa šećernom repom koji su u okviru ovog istraživanja po prvi put izdvojeni kao potencijalno korisni na osnovu ispitivanih funkcionalnih osobina, uključujući *Achromobacter*, *Brucella*, *Pseudoxanthomonas*, *Paenarthrobacter* i *Peribacillus*. Ipak, važno je naglasiti da određeni rodovi detektovani metabarkodiranjem nisu bili zastupljeni među kultivisanim izolatima, što dodatno ukazuje na komplementarnost ova dva pristupa u karakterizaciji bakterijske zajednice. Među takvim

rodovima, *Komagataeibacter* se izdvojio po relativno visokoj učestalosti u rezultatima metabarkodiranja, iako nije bio detektovan među izolovanim bakterijama.

Ipak, rezultate dobijene u *in vitro* testovima treba tumačiti sa izvesnim oprezom. Prisustvo određene funkcionalne osobine u laboratorijskim uslovima ne garantuje da će se ista osobina ispoljiti i u biljci. Efikasnost bakterijskog izolata zavisi od njegove sposobnosti da kolonizuje odgovarajuće biljno mikrostanište, uspostavi stabilnu interakciju sa domaćinom i održi funkcionalnu aktivnost u prisustvu drugih mikroorganizama i promenljivih abiotičkih uslova. Zbog toga je sledeći korak u evaluaciji ovih izolata bio potvrđivanje njihovog biokontrolnog potencijala u *in planta* eksperimentima, kao i razumevanje mehanizama kojima ovi mikroorganizmi mogu doprineti povećanju otpornosti šećerne repe prema patogenu *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21.

U skladu sa tim, poređena su dva pristupa biološke kontrole, direktna i indirektna primena biokontrolnih sojeva bakterija, pri čemu je dodatno upoređivan efekat konzorcijuma T2 sa pojedinačnih bakterijskih sojevima koji ga sačinjavaju (*Bacillus safensis* MRh275 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266). Direktna biokontrola, koja je podrazumevala istovremenu inokulaciju biokontrolnih bakterija i patogena, dovela je do jasnog smanjenja razvoja lezija, što ukazuje na neposredan antagonistički efekat primenjenih bakterijskih sojeva. Ovakav rezultat bio je očekivan na osnovu prethodno utvrđene *in vitro* antagonističke aktivnosti odabranih izolata. Međutim, interesantnije je to što je indirektni pristup pokazao izraženije i stabilnije efekte na parametre povezane sa aktivacijom odbrambenog sistema biljke. Ovo ukazuje da efekat korisnih bakterija nije ograničen na ispoljavanje antagonističkog delovanja bakterija prema patogenu, već da prethodna interakcija biljke sa bakterijskim stimulusom može pripremiti biljku za efikasniji odgovor nakon naknadne infekcije.

Jedan od ključnih parametara korišćenih za procenu odbrambenog odgovora biljke bila je koncentracija vodonik peroksida. Reaktivne kiseonične vrste, uključujući  $H_2O_2$ , imaju dvojaku ulogu u interakcijama biljke sa mikroorganizmima. Sa jedne strane, njihovo nagomilavanje može biti deo ranog odgovora biljke na percepciju mikroorganizma ili patogena i doprineti aktivaciji signalnih puteva. Sa druge strane, prekomerna akumulacija ROS može dovesti do oksidativnog stresa i oštećenja ćelijskih struktura. Zbog toga sama povećana koncentracija  $H_2O_2$  ne mora nužno označavati uspešniju aktivaciju odbrane. Funkcionalni značaj ROS odgovora zavisi od njegove intenzivnosti, vremenske dinamike i sposobnosti biljke da održava redoks homeostazu (M. He et al., 2018). U našem istraživanju, kod indirektne primene, povećane koncentracije  $H_2O_2$  u neinficiranim biljkama tretiranim pojedinačnim sojevima ukazuju na kontrolisanu aktivaciju oksidativnog signalnog sistema nakon kontakta sa korisnim mikroorganizmima. Sličan obrazac ranije je opisan kod biljaka paprike tretiranih bakterijom *Pseudomonas putida* A32 (Mesaroš et al., 2025), gde je povećanje  $H_2O_2$  u odsustvu patogena povezano sa signalnim procesima koji prate kolonizaciju korisnim mikroorganizmima (Apel & Hirt, 2004). Međutim, kod T2 konzorcijuma bazalni nivoi  $H_2O_2$  ostali su niži. Takav rezultat može ukazivati na drugačiji obrazac regulacije redoks statusa, pri kome se signalni kapacitet biljke povećava bez izražene bazalne akumulacije  $H_2O_2$  (Zheng et al., 2025). Nakon infekcije patogenom, značajno povećanje koncentracije  $H_2O_2$  uočeno je samo kod biljaka tretiranih sojem *Bacillus pseudomycoides* JRh226, dok je kod ostalih tretmana koncentracija vodonik peroksida bila niža u odnosu na inficiranu kontrolu. Ovakav obrazac ukazuje da JRh226 može snažnije aktivirati oksidativnu komponentu odgovora nakon infekcije, dok ostali tretmani mogu doprineti efikasnijoj kontroli akumulacije ROS i smanjenju oksidativnog stresa kod biljke (Mittler et al., 2022). Kod direktne primene koncentracije  $H_2O_2$  pokazale su varijabilniji obrazac. U pojedinim tretmanima povećana akumulacija  $H_2O_2$  nakon infekcije može biti posledica istovremenog prisustva patogena i biokontrolnog mikroorganizma. Ove razlike naglašavaju značaj redoks homeostaze u razlikovanju regulisane aktivacije odbrambenog odgovora od odgovora izazvanih stresom (Noctor et al., 2018; Tripathi et al., 2024). Zbog toga se razlike između direktnog i indirektnog pristupa biokontroli ne mogu svesti samo na razlike u intenzitetu ROS produkcije, već ih treba posmatrati u kontekstu sposobnosti biljke da uspostavi ravnotežu između signalne funkcije ROS i njihovog uklanjanja.

Superoksid dismutaza predstavlja jednu od prvih linija antioksidativne zaštite biljke. Ovaj enzim katalizuje transformaciju superoksidnih anjona u  $H_2O_2$ , koji se zatim uklanja ili dalje metaboliše pomoću drugih antioksidativnih enzima, uključujući peroksidaze. Zbog toga se aktivnost superoksid dismutaze i ukupnih peroksidaza ne može posmatrati potpuno nezavisno od koncentracije  $H_2O_2$ . Njihova koordinisana aktivnost predstavlja važan deo regulacije ROS homeostaze (Rajput et al., 2021). Kod indirektno primene, povećana aktivnost superoksid dismutaze u neinficiranim biljkama tretiranim *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266 i T2 konzorcijumom ukazuje da korisni mikroorganizmi mogu uticati na bazalni kapacitet antioksidativnog sistema. Nakon infekcije, izraženije promene aktivnosti superoksid dismutaze i peroksidaze dodatno ukazuju na specifičnu modulaciju odbrambenih puteva u zavisnosti od primenjenog tretmana. Slična aktivacija antioksidativnih enzima nakon infekcije prethodno je opisana kod biljaka kikirikija tretiranih bakterijom *Bacillus siamensis* YB-1632 (Chang et al., 2025). Povećanje aktivnosti peroksidaza nakon infekcije može imati višestruki značaj. Pored uklanjanja  $H_2O_2$ , peroksidaze učestvuju u ojačavanju ćelijskog zida kroz oksidativno umrežavanje njegovih strukturnih komponenti. Na taj način, enzimski odgovor može istovremeno doprineti kontroli ROS i formiranju fizičke barijere koja otežava dalje širenje patogena (Kaur et al., 2022; Mittler et al., 2022). Rezultate aktivnosti superoksid dismutaze i peroksidaza zato treba posmatrati zajedno sa koncentracijom  $H_2O_2$ . Povećana aktivnost superoksid dismutaze može doprineti stvaranju  $H_2O_2$ , dok peroksidaze učestvuju u njegovom uklanjanju. Zbog toga povećana aktivnost ovih enzima uz kontrolisanu koncentraciju  $H_2O_2$  može ukazivati na efikasnu regulaciju ROS homeostaze. Nasuprot tome, povećana koncentracija  $H_2O_2$  bez odgovarajućeg povećanja antioksidativne aktivnosti može ukazivati na izraženiji oksidativni stres (Smirnoff & Arnaud, 2019). Ovakvo tumačenje je u skladu sa savremenim shvatanjem ROS kao molekula koji, u zavisnosti od koncentracije, prostorne i vremenske dinamike i sposobnosti biljke da ih kontroliše, mogu istovremeno učestvovati u signalizaciji i doprineti oksidativnom oštećenju (Foyer, 2026). Kod direktnog pristupa u neinficiranim biljkama uočena je karakteristična kombinacija povećane aktivnosti peroksidaza i smanjene aktivnosti superoksid dismutaze. Ovakav obrazac može ukazivati na specifičnu regulaciju metabolizma ROS i bazalnog odbrambenog sistema. Međutim, sama promena aktivnosti odbrambenih enzima u odsustvu naknadnog stresnog stimulusa nije dovoljna za potvrdu „priming“ efekta, koji podrazumeva povećanu spremnost biljke za brži i intenzivniji odgovor na naknadni stres (Vlot et al., 2021). Stoga se uočene promene aktivnosti peroksidaze i superoksid dismutaze pre mogu tumačiti kao promena bazalnog redoks i odbrambenog statusa biljke, nego kao dokaz uspostavljenog „priming“ efekta (Kaur et al., 2022). Nakon infekcije, peroksidazna aktivnost ostala je povećana kod određenih tretmana, dok promene aktivnosti superoksid dismutaze nisu bile statistički značajne. To ukazuje da bi kod ovih tretmana peroksidaze mogle imati izraženiju ulogu u odgovoru biljke na infekciju. Slične promene u antioksidativnim enzimima su ranije uočene i kod drugih biljaka (H. Nguyen et al., 2025). Ovakvi rezultati su u skladu sa konceptom indukovane systemske rezistencije (ISR), kod kojeg korisni mikroorganizmi ne moraju izazvati trajnu aktivaciju svih komponenti odbrane, već mogu pripremiti biljke da nakon pojave patogena aktivira odgovarajuće odbrambene mehanizme (Charpe et al., 2025; Conrath et al., 2015; Mauch-Mani et al., 2017).

Dodatni dokaz za potencijalnu sposobnost indirektnog biokontrolnog pristupa da pokrene ISR pružaju rezultati aktivnosti fenilalanin amonijum-lijaze. Ovaj enzim je ključni u fenilpropanoidnom metabolizmu i učestvuje u usmeravanju metabolizma fenilalanina ka biosintezi niza sekundarnih metabolita, uključujući fenolna jedinjenja i prekursore lignina. Zbog toga promena aktivnosti ovog enzima može ukazivati na metaboličko preusmeravanje resursa ka putevima koji doprinose odbrani biljke (Ortiz & Sansinenea, 2023). Povećana aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze u neinficiranim biljkama tretiranim *Bacillus safensis* MRh275 i *Bacillus pseudomycooides* JRh226 ukazuje na njihov potencijal da pokrenu ISR i pripreme biljku za napad patogenom. Aktivacija PAL može usmeriti metabolički tok ka biosintezi fenolnih jedinjenja, fitoaleksina i komponenti povezanih sa formiranjem i ojačavanjem ćelijskog zida. U tom smislu, povećana bazalna aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze PAL nakon tretmana korisnim bakterijama može predstavljati jedan od pokazatelja da je biljka

metabolički pripremljena za brži odgovor na infekciju (Dutta et al., 2022; Vogt, 2010). Kod inficiranih biljaka, povećana aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze registrovana je nakon tretmana sojem *S. maltophilia* JRh266. Ovaj odgovor može predstavljati aktivaciju fenilpropanoidnog metabolizma indukovanu infekcijom, pri čemu povećana aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze potencijalno doprinosi stvaranju odbrambenih metabolita i povećanju lignifikacije na mestu infekcije (X. Wu et al., 2025). Nasuprot tome, kod direktnog pristupa aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze nije bila indukovana u neinficiranim biljkama, što ukazuje da ovaj metabolički put nije bio aktiviran pre kontakta sa patogenom. Nakon infekcije, značajno povećanje aktivnosti fenilalanin amonijum-lijaze uočeno je samo kod biljaka tretiranih *B. pseudomycoides* JRh226. S obzirom na to da je ovaj tretman istovremeno bio povezan sa značajnim smanjenjem razvoja lezija, odgovor fenilalanin amonijum-lijaze može predstavljati jedan od mehanizama koji doprinose njegovom biokontrolnom efektu. Ovi rezultati ukazuju na to da, za razliku od direktnog pristupa, indirektni tretman može omogućiti dovoljno vremena za uspostavljanje ISR i pratećih promena u odbrambenom statusu biljke, dok kod direktnog pristupa takve promene pre infekcije nije moguće uočiti (Backer et al., 2018; Conrath et al., 2006).

Posebno zanimljiv aspekt istraživanja predstavlja poređenje efekta pojedinačnih bakterijskih sojeva sa T2 konzorcijumom. U indirektnom pristupu T2 konzorcijum nije dosledno nadmašio najefikasnije pojedinačne sojeve u pogledu smanjenja veličine lezija. Međutim, konzorcijum je u više slučajeva izazvao izraženije i uravnoteženije biohemijske promene. Tako su neinficirane biljke tretirane T2 konzorcijumom pokazale povećanu aktivnost superoksod dismutaze i ukupnih peroksidaza uz istovremeno nižu koncentraciju  $H_2O_2$ . Ovakav obrazac može ukazivati na povećan kapacitet pripremanja biljke za antioksidativni odgovor i efikasniju regulaciju ROS. Ovaj rezultat je važan jer pokazuje da procena efikasnosti konzorcijuma ne treba da se zasniva isključivo na jednom fenotipskom parametru, kao što je veličina lezije. Konzorcijum može ostvarivati korist kroz promenu fiziološkog stanja biljke i povećanje njene sposobnosti da odgovori na stres, čak i kada neposredno smanjenje simptoma nije veće nego kod najboljeg pojedinačnog soja. Prednost konzorcijuma može proizlaziti iz komplementarnosti funkcionalnih osobina različitih članova, njihove sposobnosti kolonizacije različitih niša ili aktivacije različitih komponenti odbrambenog sistema (Sarma et al., 2015). Ovi efekti bili su najizraženiji pri indirektnoj primeni, u odsustvu infekcije, što ukazuje na to da se glavna prednost konzorcijuma T2 ogleda u pripremi biljke za brži i kontrolisaniji odgovor na stres, a ne u direktnom suzbijanju patogena. Ovakav efekat je u skladu sa savremenim konceptom indukovane pripremljenosti biljke mikroorganizmima i značajem interakcija između biljke i njenog mikrobioma u aktivaciji odbrambenih odgovora (Pieterse et al., 2014; Riseh et al., 2025; Salwan et al., 2023). Sa druge strane, kod direktne primene konzorcijum je pokazao najveće smanjenje veličine lezija i nadmašio pojedinačne sojeve. Istovremeno, kod direktne primene T2 je bio povezan sa nižom akumulacijom  $H_2O_2$ , povećanom aktivnošću odbrambenih enzima, iako te promene nisu uvek bile statistički značajne, kao i sa izraženijom ekspresijom analiziranih gena. Slični rezultati opisani su u istraživanju Berendsen et al. (2018), koje je pokazalo da razvoj infekcije kod biljaka može podstaći formiranje korisnih mikrobijalnih konzorcijuma sa izraženijim zaštitnim efektima u poređenju sa pojedinačnim sojevima, ukazujući na značaj sinergističkih interakcija u odbrani biljke. Ovakvi efekti verovatno proizlaze iz kombinacije komplementarnih osobina različitih članova konzorcijuma, uključujući produkciju metabolita, efikasniju kolonizaciju i istovremenu aktivaciju više odbrambenih puteva, što je prethodno opisano za mikrobijalne konzorcijume (J. Hu et al., 2016; Rezaee Danesh et al., 2025). Ovakva razlika između direktne i indirektno primene ukazuje da kombinacija sojeva ne mora nužno da dovede do zbirnih efekata (De Vrieze et al., 2018). Njegova aktivnost zavisi od načina primene i konteksta u kome se primenjuje, uključujući fiziološko stanje biljke i prisustvo patogena. Savremena istraživanja mikrobijalnih konzorcijuma ukazuju upravo na to da interakcije između članova mogu biti pozitivne, neutralne ili negativne, a da ukupni efekat zavisi od ekoloških uslova i funkcionalnih odnosa između sojeva (Maciag et al., 2023; Niu et al., 2017; Vorholt et al., 2017).

Kako bi se detaljnije razjasnila molekularna osnova direktnog i indirektnog biokontrolnog efekta i utvrdila njihova povezanost sa mehanizmima indukovane sistemske rezistencije, analizirana je

ekspresija četiri gena povezana sa različitim komponentama odbrambenog i stresnog odgovora biljke. To su geni *NPRI*, *MYC2*, *LOX* i *NCED*. *NPRI* predstavlja jedan od ključnih regulatora signalizacije povezane sa salicilnom kiselinom i ima centralnu ulogu u uspostavljenju sistemske rezistencije. *MYC2* je važan transkripcioni faktor povezan sa signalizacijom jasmonata i koordinira aktivaciju odbrambenih gena, dok *LOX* kodira lipoksigenazu uključenu u biosintezu jasmonata, koji učestvuje i u lokalnom i sistematskom imunskom odgovoru. *NCED* kodira ključni enzim biosinteze apscisinske kiseline, koja ima važnu ulogu u regulaciji odgovora biljke na stres, uključujući regulaciju stoma, čime se povećava otpornost na patogene koje napadaju biljku ulazeći kroz njihove otvore, a jedan od takvih patogena je i *Pseudomonas syringae*. Analiza ova četiri gena omogućila je sagledavanje odgovora biljke kroz više međusobno povezanih signalnih puteva, umesto posmatranja samo jednog odbrambenog mehanizma. Pri interpretaciji ovih rezultata važno je imati u vidu da ISR ne predstavlja aktivaciju jednog specifičnog signalnog puta, već složen odgovor biljke u kome međusobno deluju različiti signalni putevi i regulatorni mehanizmi. U ovaj proces uključeni su hormoni poput jasmonata, etilena, salicilne kiseline i apscisinske kiseline, kao i ROS i različiti transkripcioni regulatori (Vieira et al., 2024). Zbog toga posmatranje ekspresije gena zajedno sa koncentracijom  $H_2O_2$  i aktivnostima antioksidativnih enzima i PAL omogućava potpuniji uvid u koordinaciju odbrambenog odgovora biljke i pruža osnovu za poređenje odgovora izazvanih direktnim i indirektnim strategijama biološke kontrole.

Kod indirektno biokontrole, povećana ekspresija *LOX* u biljkama tretiranim *B. safensis* MRh275 i *S. maltophilia* JRh266, zajedno sa povećanom ekspresijom *MYC2* i *NPRI* prvenstveno nakon infekcije, ukazuje na potencijalnu aktivaciju odbrambenog odgovora povezanih sa jasmonatnom i salicilnom kiselinom (Hönig et al., 2023; Y. Yu et al., 2022). Ovaj rezultat je posebno značajan kada se posmatra zajedno sa povećanom aktivnošću superoksod dismutaze i peroksidaze, kao i kontrolisanom koncentracijom  $H_2O_2$ , koja je blago smanjena u inficiranim biljkama, ukazujući na regulaciju oksidativnog stresa, a ne na njegovu akumulaciju (González et al., 2024; Mittler et al., 2022). Zajedno, ovi rezultati podržavaju hipotezu da indirektna primena odabranih bakterijskih sojeva može aktivirati ISR u biljci. Slična koordinacija između promena u ekspresiji odbrambenih gena i aktivnosti antioksidativnih enzima opisana je kod Nedeljković et al. (2025). Povećana aktivnost fenilalanin amonijum-lijaze nakon tretiranja semena sojem *S. maltophilia* JRh266 dodatno dopunjuje ovaj obrazac, uključujući promenu pozicije lignina i akumulaciju fitoaleksina. Tako aktivacija fenilpropanoidnog metabolizma može doprineti povećanoj sposobnosti biljke da nakon infekcije formira strukturne i hemijske barijere. Ovakav koordinisan odgovor predstavlja jednu od ključnih razlika između prostog neposrednog antagonizma prema patogenu i biokontrole gde mikroorganizmi pripremaju biljku. Kod indirektno biokontrole korisni mikroorganizmi mogu promeniti stanje domaćina tako da biljka postane sposobnija da reaguje na naknadni napad, pri čemu se povećava njena otpornost na patogene.

Za razliku od indirektnog pristupa, direktna biokontrola generalno je izazvala snažnije, ali manje koordinisane promene u analiziranim parametrima. Kod biljaka tretiranih *B. pseudomycoides* JRh226 i T2 konzorcijumom registrovana je značajna indukcija gena povezanih sa različitim signalnim putevima, uključujući salicilnu, jasmonatnu i apscisinsku kiselinu. Posebno je interesantno što je kod T2 tretmana ekspresija pojedinih gena bila viša u biljkama tretiranim samo biokontrolnim mikroorganizmima nego u biljkama istovremeno izloženim patogenu. Ovo može ukazivati da prisustvo patogena menja ili čak umanjuje signalni odgovor izazvan biokontrolnim tretmanom (Pieterse et al., 2009; Tsuda & Somssich, 2015). Istovremeno, enzimski odgovori pratili su obrazac promena u ekspresiji gena, jer je koncentracija  $H_2O_2$  uglavnom bila smanjena u inficiranim biljkama tretiranim *B. pseudomycoides* JRh226 i T2 konzorcijumom. Ovakva kombinacija rezultata može ukazivati na snažan indukovani odgovor izazvan tretmanom i infekcijom, a ne na koordinisani redoks priming. Ovi rezultati ukazuju na to da efikasnost biološke kontrole nije određena isključivo suzbijanjem patogena. Sposobnost biljke da usklađuje transkripcioni i biohemijski odbrambeni odgovor, posebno pri primeni indirektnih strategija, može doprineti održivom i energetski efikasnijem

jačanju imuniteta biljke (Charpe et al., 2025; Huot et al., 2014; Kaleh et al., 2025; Vos et al., 2013; K. Yu et al., 2019).

U celini, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da bakterijski mikrobiom šećerne repe predstavlja značajan izvor raznovrsnih mikroorganizama sa potencijalom za biološku kontrolu biljnih patogena. Integracijom pristupa zasnovanih na karakterizaciji sezonske dinamike mikrobioma, izolaciji i funkcionalnoj karakterizaciji bakterijskih sojeva, *in planta* potvrdi njihovog biokontrolnog potencijala i analizi molekularnih i biohemijskih odgovora biljke, pokazano je da odabrani bakterijski sojevi mogu doprineti smanjenju razvoja bolesti i modulaciji odbrambenog sistema šećerne repe. Poseban značaj imaju rezultati koji ukazuju na potencijal bakterija za aktivaciju mehanizama povezanih sa indukovanom sistemskom rezistencijom. Time je uspostavljena funkcionalna veza između bakterijskog mikrobioma šećerne repe, osobina njegovih članova i sposobnosti odabranih bakterija da utiču na otpornost biljke prema patogenu.

Za procenu praktične primenljivosti izdvojenih izolata potrebna je dalja validacija u uslovima oglednog polja, uključujući procenu njihove efikasnosti u različitim agroekološkim uslovima, uticaja na prinos i tehnološki kvalitet šećerne repe, stabilnosti efekta i kompatibilnosti sa postojećim merama zaštite i tehnologijom proizvodnje. Pri izboru kandidata za potencijalnu primenu, pored efikasnosti i stabilnosti biokontrolnog efekta, trebalo bi proceniti i biosigurnost, ekološku prihvatljivost i regulatorne aspekte njihove potencijalne primene.

# ZAKLJUČCI

1. Mikrobom šećerne repe predstavlja dinamičnu i funkcionalno kompleksnu zajednicu bakterija čiji se sastav i diverzitet menjaju tokom različitih faza rastenja i razvića biljke. Primena 15 različitih selektivnih i obogaćenih podloga omogućila je izdvajanje 635 bakterijskih izolata i proširila uvid u kultivabilnu komponentu bakterijske zajednice šećerne repe.

2. Sekvenciranje nove generacije omogućilo je detaljniju karakterizaciju sezonske dinamike bakterijskog mikrobioma šećerne repe i identifikaciju taksonomskih grupa čija zastupljenost zavisi od fenološke faze biljke. Na nivou razdela, sastav mikrobioma bio je relativno stabilan, uz dominaciju Actinobacteriota i Proteobacteria u oba staništa, dok su se sezonske promene izraženije ispoljile na nivou rodova i vrsta, posebno u filosferi, gde je zabeležena izražena sezonska promena zastupljenosti dominantnog roda *Komagataeibacter* i vrste *Komagataeibacter saccharivorans*, čija je relativna zastupljenost bila značajno smanjena u julu. U rizosferi je dominirao rod *Bacillus* i vrste *Bacillus niacini* i *Bacillus simplex*, koji su bili stabilno zastupljeni tokom svih perioda vegetacije.

3. Izolovani bakterijski sojevi pokazali su različite funkcionalne osobine povezane sa promocijom rastenja biljke i biološkom kontrolom patogenih mikroorganizama, uključujući sposobnost stimulacije klijavosti, produkciju egzopolisaharida, siderofora, cijanovodonika (HCN), solubilizaciju fosfata, kao i antagonističku aktivnost prema patogenima šećerne repe, uključujući tri soja bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P16, P21 i CFBR2437, kao i gljiva *Fusarium oxysporum* i *Rhizoctonia solani*. Najveći broj istovremeno ispoljenih funkcionalnih osobina iznosio je osam, pri čemu su ovaj nivo funkcionalne raznovrsnosti pokazali sojevi *Acinetobacter calcoaceticus* MRh107, *Bacillus safensis* JRh276, *Enterobacter ludwigii* JRh243 i JRh264, *Pantoea ananatis* ORh24 i *B. pumilus* ORh92, što ih izdvaja kao perspektivne kandidate za dalju evaluaciju u cilju promocije rastenja biljaka i biološke kontrole patogenih mikroorganizama.

4. Odabrani bakterijski sojevi pokazali su biokontrolni potencijal u *in planta* uslovima, ukazujući na moguću povezanost funkcionalnih osobina utvrđenih tokom *in vitro* karakterizacije sa smanjenjem razvoja bolesti izazvane patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21. Efikasnost biokontrolnog tretmana zavisila je od primenjenog bakterijskog soja i načina njegove primene, pa su tako sojevi *Bacillus pseudomyoides* JRh226 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266 značajno smanjili razvoj lezija u oba pristupa biokontrole, dok je konzorcijum T2 pokazao efikasnost pri direktnoj primeni.

5. Promene koncentracije  $H_2O_2$  i aktivnosti enzima superoksid dismutaze i ukupnih peroksidaza potvrđuju da bakterijski tretmani modulišu redoks odgovor šećerne repe tokom interakcije sa patogenom, pri čemu je intenzitet i smer odgovora zavisio od primenjenog soja, prisustva patogena i načina primene. Indirektna primena, naročito tretman konzorcijumom T2, bila je praćena izraženijim promenama koncentracije  $H_2O_2$  i aktivnosti enzima superoksid dismutaze i ukupnih peroksidaza nakon infekcije, što ukazuje na aktivno uključivanje bakterijskih tretmana u regulaciju ROS odgovora i održavanje redoks homeostaze biljke.

6. Promene aktivnosti fenilalanin amoniju-lijaze ukazuju na uključenost fenilpropanoidnog metabolizma u odgovor šećerne repe na bakterijske tretmane, pri čemu se efekat razlikovao u zavisnosti od načina primene i prisustva patogena. Indirektna primena sojeva *Bacillus safensis* MRh275 i *Bacillus pseudomyoides* JRh226 povećala je bazalnu aktivnost fenilalanin amoniju-lijaze kod neinficiranih biljaka, dok je nakon infekcije povećanje zabeleženo kod soja *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266, što ukazuje na aktivaciju fenilpropanoidnog metabolizma za efikasniji odbrambeni odgovor. Kod direktne primene indukcija fenilalanin amoniju-lijaze bila je izraženija tek

nakon infekcije i zavisila je od soja, pri čemu je *B. pseudomycooides* JRh226 pokazao povećanje aktivnosti povezano sa smanjenjem razvoja lezija.

7. Analiza ekspresije gena *NPRI*, *MYC2*, *LOX* i *NCED* pokazala je da bakterijski izolati različito utiču na komponente signalnih puteva salicilne, jasmonatne i apscisinske kiseline. Kod indirektnog tretmana sojevima *Bacillus safensis* MRh275 i *Stenotrophomonas maltophilia* JRh266 nakon infekcije je posebno izražena bila indukcija *MYC2* i *NPRI*. Kod direktne primene, soj *B. pseudomycooides* JRh226 pokazao je izraženu indukciju gena nakon infekcije uključenih u više signalnih puteva, što ukazuje na izražen, ali specifičan odgovor biljke na određene bakterijske tretmane.

8. Mikrobijalni konzorcijum T2 pokazao je da kombinovanje bakterijskih sojeva može pružiti dodatnu funkcionalnu vrednost, ali da njegov efekat zavisi od više parametara. Kod indirektno primene, T2 nije nadmašio najefikasnije pojedinačne sojeve u smanjenju razvoja lezija, ali je pokazao izraženiji uticaj na biohemijske pokazatelje povezane sa regulacijom antioksidativnog odgovora. Nasuprot tome, pri direktnoj primeni T2 je ostvario najveće smanjenje razvoja lezija i pokazao izraženiji ukupni biokontrolni efekat u odnosu na pojedinačne sojeve. Dobijeni rezultati ukazuju da prednost konzorcijuma ne proizlazi nužno iz aditivnog efekta njegovih članova, već iz njihove komplementarnosti, čiji se efekat ispoljava u zavisnosti od konteksta primene.

9. Direktna i indirektna primena biokontrolnih bakterija dovele su do različitih obrazaca odgovora biljke. Direktna primena bila je posebno povezana sa neposrednim smanjenjem razvoja lezija, dok je indirektna primena, odnosno prethodni tretman biljaka bakterijama pre infekcije, pokazala izraženiji potencijal za modulaciju fizioloških i molekularnih mehanizama odbrane biljke. Ovi rezultati ukazuju da izbor načina i vremena primene biokontrolnog mikroorganizma predstavljaju važne faktore u razvoju efikasne strategije biološke zaštite šećerne repe.

# LITERATURA

- Ajeethan, N., Abbey, Lord, & Yurgel, S. N. (2026). Role of Plant GrowthPromoting Microbes in Plant Growth and Development. *Applied Microbiology (Switzerland)*, 6(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol6020034>
- Alexander, A., Singh, V. K., Mishra, A., & Jha, B. (2019). Plant growth promoting rhizobacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 augments endurance against N2 starvation by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogea*. *PLoS ONE*, 14(9), e0222405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222405>
- Ali, S., Tyagi, A., & Mir, Z. A. (2024). Plant Immunity: At the Crossroads of Pathogen Perception and Defense Response. *Plants*, 13(11), 1434. <https://doi.org/10.3390/plants13111434>
- Alotaibi, F., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2022). In-Depth Characterization of Plant Growth Promotion Potentials of Selected Alkanes-Degrading Plant Growth-Promoting Bacterial Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 13, 863702. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.863702>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Andreote, F. D., & Pereira e Silva, M. de C. (2017). Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.011>
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Corpas, F. J., Ortega-Villasante, C., Hernandez, L. E., Tuteja, N., Sofo, A., Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2022). Editorial: Recent Insights Into the Double Role of Hydrogen Peroxide in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 843274. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.843274>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Augimeri, R. V., Varley, A. J., & Strap, J. L. (2015). Establishing a role for bacterial cellulose in environmental interactions: Lessons learned from diverse biofilm-producing Proteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01282>
- Azeem, M. A., Shah, F. H., Ullah, A., Ali, K., Jones, D. A., Khan, M. E. H., & Ashraf, A. (2022). Biochemical Characterization of Halotolerant *Bacillus safensis* PM22 and Its Potential to Enhance Growth of Maize under Salinity Stress. *Plants*, 11(13), 1721. <https://doi.org/10.3390/plants11131721>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bacon, C. W., & White, J. F. (2016). Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. *Symbiosis*, 68, 87–98. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0350-2>
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384, 413–431. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>
- Banerjee, S., Schlaeppli, K., & van der Heijden, M. G. A. (2018). Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 567–576. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>
- Barabote, R. D., Xie, G., Leu, D. H., Normand, P., Necsulea, A., Daubin, V., Médigue, C., Adney, W. S., Xin, C. X., Lapidus, A., Parales, R. E., Detter, C., Pujic, P., Bruce, D., Lavire, C., Challacombe, J. F., Brettin, T. S., & Berry, A. M. (2009). Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* IIB provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Research*, 19(6), 1033–1043. <https://doi.org/10.1101/gr.084848.108>

- Bashir, I., War, A. F., Rafiq, I., Reshi, Z. A., Rashid, I., & Shouche, Y. S. (2022). Phyllosphere microbiome: Diversity and functions. *Microbiological Research*, 254, 126888. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126888>
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Benaissa, A., Djebbar, R., & Abderrahmani, A. (2018). Diversity of plant growth promoting rhizobacteria of rhus tripartitus in arid soil of Algeria (Ahaggar) and their physiological properties under abiotic stresses. *Advances in Horticultural Science*, 32(4), 525–534. <https://doi.org/10.13128/ahs-22424>
- Bendaha, M. E. A., & Belaouni, H. A. (2020). Effect of the endophytic plant growth promoting *Enterobacter ludwigii* EB4B on tomato growth. *Hellenic Plant Protection Journal*, 13(2), 54–65. <https://doi.org/10.2478/hppj-2020-0006>
- Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., De Jonge, R., Burgman, W. P., Burmølle, M., Herschend, J., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2018). Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME Journal*, 12(6), 1496–1507. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0093-1>
- Berić, T., Urdaci, M. C., Stanković, S., & Knežević-Vukčević, J. (2009). RAPD analysis of genetic diversity and qualitative assessment of hydrolytic activities in a collection of *Bacillus* sp. isolate. *Archives of Biological Sciences*, 61(4), 645–652. <https://doi.org/10.2298/ABS0904645B>
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Brader, G., Compant, S., Vescio, R., Mitter, B., & Trognitz, F. (2017). Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and non-pathogenic endophytes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2559. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Broccanello, C., Ravi, S., Deb, S., Bolton, M., Secor, G., Richards, C., Maretto, L., Lucia, M. C. Della, Bertoldo, G., Orsini, E., Ronquillo-López, M. G., Concheri, G., Campagna, G., Squartini, A., & Stevanato, P. (2022). Bacterial endophytes as indicators of susceptibility to Cercospora Leaf Spot (CLS) disease in Beta vulgaris L. *Scientific Reports*, 12(1), 10719. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14769-8>
- Caliz, J., Montes-Borrego, M., Triadó-Margarit, X., Metsis, M., Landa, B. B., & Casamayor, E. O. (2015). Influence of edaphic, climatic, and agronomic factors on the composition and abundance of nitrifying microorganisms in the rhizosphere of commercial olive crops. *PLoS ONE*, 10(5), e0125787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125787>
- Cannea, F. B., & Padiglia, A. (2025). Antioxidant Defense Systems in Plants: Mechanisms, Regulation, and Biotechnological Strategies for Enhanced Oxidative Stress Tolerance. *Life*, 15(8), 1293. <https://doi.org/10.3390/life15081293>
- Cano-Serrano, S., Castelán-Sánchez, H. G., Oyaregui-Cabrera, H., Hernández, L. G., Pérez-Pérez, M. C., Santoyo, G., & Orozco-Mosqueda, M. del C. (2026). Assessment of Bacterial Diversity and Rhizospheric Community Shifts in Maize (*Zea mays* L.) Grown in Soils with Contrasting Productivity Levels. *Plants*, 15(1), 130. <https://doi.org/10.3390/plants15010130>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pěa, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Chakraborty, A. P., & Dey, P. L. (2013). Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. *World*

- Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 789–803. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1234-8>
- Chang, Y., Dong, Q., Zhang, L., Goodwin, P. H., Xu, W., Xia, M., Zhang, J., Sun, R., Wu, C., Wu, K., Xu, S., & Yang, L. (2025). Peanut Growth Promotion and Biocontrol of Blight by *Sclerotium rolfsii* with Rhizosphere Bacterium, *Bacillus siamensis* YB-1632. *Agronomy*, 15(3), 568. <https://doi.org/10.3390/agronomy15030568>
- Charpe, A. M., Aglave, B., & Ghosh, D. K. (2025). Microbial-mediated induced resistance: interactive effects for improving crop health. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1660944. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1660944>
- Chen, Q., Song, Y., An, Y., Lu, Y., & Zhong, G. (2024). Mechanisms and Impact of Rhizosphere Microbial Metabolites on Crop Health, Traits, Functional Components: A Comprehensive Review. *Molecules*, 29(24), 5922. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules29245922>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M. A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., & Mauch-Mani, B. (2006). Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1062–1071. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062>
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for Enhanced Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 97–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- Cui, J., Liu, J., Li, J., Cheng, D., & Dai, C. (2022). Genome-wide sequence identification and expression analysis of N6-methyladenosine demethylase in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *PeerJ*, 10, e12719. <https://doi.org/10.7717/peerj.12719>
- Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., & Dashti, H. M. (2009). Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41(2), 117–122.
- de Oliveira Costa, L. E., de Queiroz, M. V., Chaer Borges, A., de Moraes, C. A., & de Araújo, E. F. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1562–1575. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400041>
- Desoignies, N., Schramme, F., Ongena, M., & Legrève, A. (2013). Systemic resistance induced by *Bacillus* lipopeptides in *Beta vulgaris* reduces infection by the rhizomania disease vector *Polymyxa betae*. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 416–421. <https://doi.org/10.1111/mpp.12008>
- De Vrieze, M., Germanier, F., Vuille, N., & Weisskopf, L. (2018). Combining Different Potato-Associated *Pseudomonas* Strains for Improved Biocontrol of *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2573. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02573>
- Dhiman, A. S., Taliadoros, D., Stukenbrock, E. H., McGrath, J. M., Emrani, N., & Jung, C. (2025). Signatures in domesticated beet genomes pointing at genes under selection in a sucrose-storing root crop. *BMC Biology*, 23(1), 299. <https://doi.org/10.1186/s12915-025-02422-5>
- Dlamini, S. P., Akanmu, A. O., & Babalola, O. O. (2022). Rhizospheric microorganisms: The gateway to a sustainable plant health. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 925802. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.925802>
- Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., & Dybek, B. (2022). Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1069053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1069053>
- Draycott, A. P. (2006). *Sugar Beet*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470751114>
- Duchateau, S., Borrego, C., Verdelet, S., Dorey, S., Aziz, A., Dhondt-Cordelier, S., Gauthier, C., Déziel, É., Cordelier, S., & Crouzet, J. (2026). Growth-promoting and biocontrol features of *Pantoea ananatis* BRT175 in tomato. *Biological Control*, 212, 105949. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2025.105949>

- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Dutta, P., Muthukrishnan, G., Gopalasubramaiam, S. K., Dharmaraj, R., Karuppaiah, A., Loganathan, K., Periyasamy, K., Pillai, M. A., Upamanya, G. K., Boruah, S., Deb, L., Kumari, A., Mahanta, M., Heisnam, P., & Mishra, A. K. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and its mechanisms against plant diseases for sustainable agriculture and better productivity. *Biocell*, 46(8), 1843–1859. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.019291>
- Dworkin, M., & Foster, J. W. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75(5), 592–603. <https://doi.org/10.1128/jb.75.5.592-603.1958>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Ahmed, A. I., Mahmood, M., El-Tahan, A. M., Ebrahim, A. A. M., Abd El-Mageed, T. A., Negm, S. H., Selim, S., Babalghith, A. O., Elrys, A. S., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2022). Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 13, 923880. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923880>
- Eurostat. (2025). *Key figures on the European food chain – 2025 edition*. <https://doi.org/10.2785/8194502>
- Fatima, H., Ishaque, S., Hashim, M., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, S. (2023). Role of hydrogen peroxide in plant and crosstalk with signaling networks, growth, and development. *Hormonal Cross-Talk, Plant Defense and Development: Plant Biology, Sustainability and Climate Change*, 195–224. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95375-7.00002-1>
- Foyer, C. H. (2026). Emerging concepts of reactive oxygen species functions in plants. *Biochemical Society Transactions*, 54(4), 393–402. <https://doi.org/10.1042/BST20250107>
- Francioli, D., Lentendu, G., Lewin, S., & Kolb, S. (2021). DNA metabarcoding for the characterization of terrestrial microbiota—pitfalls and solutions. *Microorganisms*, 9(2), 361. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361>
- Gao, Q., Zhang, Y., Gao, C., Li, H., Cheng, Y., Qian, X., Zhang, L., Liu, J., Ogunyemi, S. O., & Guan, J. (2023). The Microbial Diversity in Relation to Postharvest Quality and Decay: Organic vs. Conventional Pear Fruit. *Foods*, 12(10), 1980. <https://doi.org/10.3390/foods12101980>
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinoso, W. A. (2018). Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 139–151. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Gomes, T., Pereira, J. A., Benhadi, J., Lino-Neto, T., & Baptista, P. (2018). Endophytic and Epiphytic Phyllosphere Fungal Communities Are Shaped by Different Environmental Factors in a Mediterranean Ecosystem. *Microbial Ecology*, 76(3), 668–679. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1161-9>
- González, M. C., Roitsch, T., & Pandey, C. (2024). Antioxidant Responses and Redox Regulation Within Plant-Beneficial Microbe Interaction. *Antioxidants*, 13(12), 1553. <https://doi.org/10.3390/antiox13121553>
- Haider, F. U., Liu, T., Aguila, L. C. R., Shahzad, B., Habiba, Zhang, P., & Li, X. (2026). Harnessing Antioxidants for Abiotic Stress Management: Mechanistic Insights and Prospects for Sustainable Agriculture. *Antioxidants*, 15(3), 1–54. <https://doi.org/10.3390/antiox15030337>

- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- He, C., Zhang, M., Li, X., & He, X. (2023). Seasonal dynamics of phyllosphere epiphytic microbial communities of medicinal plants in farmland environment. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1328586. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1328586>
- He, M., He, C. Q., & Ding, N. Z. (2018). Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* —a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 624–653. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.3.624-653.2000>
- Hönig, M., Roeber, V. M., Schmülling, T., & Cortleven, A. (2023). Chemical priming of plant defense responses to pathogen attacks. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1146577. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1146577>
- Hou, S., Liu, Z., Shen, H., & Wu, D. (2019). Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 646. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00646>
- Hu, J., Wei, Z., Friman, V. P., Gu, S. H., Wang, X. F., Eisenhauer, N., Yang, T. J., Ma, J., Shen, Q. R., Xu, Y. C., & Jousset, A. (2016). Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression. *MBio*, 7(6), e01790–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01790-16>
- Hu, F., Zhang, Y., & Guo, J. (2023). Identification and characterization of lipoxygenase (LOX) genes involved in abiotic stresses in yellow horn. *PLoS ONE*, 18(10), e0292898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292898>
- Huang, J., Yao, C., Sun, Y., Ji, Q., & Deng, X. (2022). Virulence-related regulatory network of *Pseudomonas syringae*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 6259–6270. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.011>
- Huang, W. F., Li, J., Huang, J. A., Liu, Z. H., & Xiong, L. G. (2024). Review: Research progress on seasonal succession of phyllosphere microorganisms. *Plant Science*, 338, 111898. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111898>
- Hudz, S. O. (2021). Formation of the eubacterial complex in the rhizosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*) under different fertilization systems. *Biotechnologia Acta*, 14(1), 81–87. <https://doi.org/10.15407/biotech14.01.81>
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*, 7(8), 1267–1287. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
- Ikeda, S., Okazaki, K., Takahashi, H., Tsurumaru, H., & Minamisawa, K. (2023). Seasonal Shifts in Bacterial Community Structures in the Lateral Root of Sugar Beet Grown in an Andosol Field in Japan. *Microbes and Environments*, 38(1), ME22071. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME22071>
- Islam, F., Khan, M. S. S., Chen, H., & Chen, J. (2024). Utilizing effector-triggered immunity (ETI) as a robust priming agent to protect plants from pathogens. *Stress Biology*, 4(1), 51. <https://doi.org/10.1007/s44154-024-00204-7>
- Jammer, A., Albacete, A., Schulz, B., Koch, W., Weltmeier, F., van der Graaff, E., Pfeifhofer, H. W., & Roitsch, T. G. (2020). Early-stage sugar beet taproot development is characterized by three distinct physiological phases. *Plant Direct*, 4(7), e00221. <https://doi.org/10.1002/pld3.221>
- Jiang, H., Xu, X., Fang, Y., Ogunyemi, S. O., Ahmed, T., Li, X., Yang, Y., Yan, C., Chen, J., & Li, B. (2023). Metabarcoding reveals response of rice rhizosphere bacterial community to rice bacterial leaf blight. *Microbiological Research*, 270, 127344. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127344>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. In *Nature*, 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jovcic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L., & Kojic, M. (2009). Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Archives of Biological Sciences*, 61(2), 159–164. <https://doi.org/10.2298/abs0902159j>
- Junglee, S., Urban, L., Sallanon, H., & Lopez-Lauri, F. (2014). Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *American Journal of Analytical Chemistry*, 5(11), 730–736. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.511081>
- Kaleh, A. M., Singh, P., Ooi Chua, K., & Harikrishna, J. A. (2025). Modulation of plant transcription factors and priming of stress tolerance by plant growth-promoting bacteria: a systematic review. *Annals of Botany*, 13(3), 387–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcae166>
- Kamran, M., Burdiak, P., & Karpiński, S. (2025). Crosstalk Between Abiotic and Biotic Stresses Responses and the Role of Chloroplast Retrograde Signaling in the Cross-Tolerance Phenomena in Plants. *Cells*, 14(3), 176. <https://doi.org/10.3390/cells14030176>
- Kato, S., Yamagishi, A., Daimon, S., Kawasaki, K., Tamaki, H., Kitagawa, W., Abe, A., Tanaka, M., Sone, T., Asano, K., & Kamagata, Y. (2018). Isolation of previously uncultured slowgrowing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), e00807–e00818. <https://doi.org/10.1128/AEM.00807-18>
- Kaur, S., Samota, M. K., Choudhary, M., Choudhary, M., Pandey, A. K., Sharma, A., & Thakur, J. (2022). How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2), 485–504. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01146-y>
- Keswani, C., Prakash, O., Bharti, N., Vilchez, J. I., Sansinenea, E., Lally, R. D., Borriss, R., Singh, S. P., Gupta, V. K., Fraceto, L. F., de Lima, R., & Singh, H. B. (2019). Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria. *Science of the Total Environment*, 690, 841–852. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.046>
- Khan, N. (2025). Molecular Insights into ABA-Mediated Regulation of Stress Tolerance and Development in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(16), 7872. <https://doi.org/10.3390/ijms26167872>
- Khatoon, H., Chavan, D. D., Anokhe, A., & Kalia, V. (2022). Catalase Test: A biochemical protocol for bacterial identification. *AgriCos E-Newsletter*, 3(1), 53–55.
- Kholostiakov, V., Burns, B., Ridgway, H., & Padamsee, M. (2025). Effects of fungicides on the beneficial seed-borne microbiome and seedling development of a long-lived myrtaceae tree species. *Symbiosis*, 96(2), 133–154. <https://doi.org/10.1007/s13199-025-01064-z>
- Kleinhofs, A., Haskins, F. A., & Gorz, H. J. (1966). Relationship of Phenylalanine Ammonia-lyase Activity to o -Hydroxycinnamic Acid Content in *Melilotus alba*. *Plant Physiology*, 41(8), 1276–1279. <https://doi.org/10.1104/pp.41.8.1276>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Krstić Tomić, T., Atanasković, I., Nikolić, I., Joković, N., Stević, T., Stanković, S., Berić, T., & Lozo, J. (2023). Culture-Dependent and Metabarcoding Characterization of the Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Microbiome for High-Yield Isolation of Bacteria with Plant Growth-Promoting Traits. *Microorganisms*, 11(6), 1538. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061538>
- Krstić Tomić, T., Nedeljković, M., Mesaroš, A., Todorović, J., Pešaković, M., Stanković, S., & Lozo, J. (2026). Comparative Biocontrol Efficacy and Mechanisms of Indirect and Direct Application Methods Against Leaf Spot Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Sugar Beet. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(11), 4672. <https://doi.org/10.3390/ijms27114672>
- Kurm, V., Van Der Putten, W. H., & Hol, W. H. G. (2019). Cultivation-success of rare soil bacteria is not influenced by incubation time and growth medium. *PLoS ONE*, 14(1), e0210073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210073>

- Labiza, B. de J. L. (2024). *Exploring the evolution of Burkholderia multivorans as it interacts with macrophages and forms multicellular aggregates* [Master's thesis, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa]
- Li, C., Xu, M., Cai, X., Han, Z., Si, J., & Chen, D. (2022). Jasmonate Signaling Pathway Modulates Plant Defense, Growth, and Their Trade-Offs. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3945. <https://doi.org/10.3390/ijms23073945>
- Li, Q. H., Yu, X. T., Chen, L., Zhao, G., Li, S. Z., Zhou, H., Dai, Y., Sun, N., Xie, Y. F., Gao, J. S., Li, D. H., Sun, X., & Guo, N. (2021). Genome-wide identification and expression analysis of the NCED family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *PLoS ONE*, 16(2), e0246021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246021>
- Lin, Q., Wang, Y., Li, M., Xu, Z., & Li, L. (2022). Ecological niche selection shapes the assembly and diversity of microbial communities in *Casuarina equisetifolia* L. *Frontiers in Plant Science*, 13, 988485. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.988485>
- Lopes, A. C. de A., Mendes, L. W., Brito, K. A. da S. B., da Silva, J. L., Rocha, S. M. B., Antunes, J. E. L., Oliveira, L. M. de S., Melo, V. M. M., Oliveira, F. A. S., Pereira, A. P. de A., Costa, G. do N., da Silva, V. B., Gomes, R. L. F., de Alcantara Neto, F., & Araujo, A. S. F. (2023). Rhizospheric microbial community in plant species from the Phaseolus genus. *Applied Soil Ecology*, 182, 104731. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104731>
- López-Pagán, N., Rufián, J. S., Luneau, J., Sánchez-Romero, M. A., Aussel, L., van Vliet, S., Ruiz-Albert, J., & Beuzón, C. R. (2025). Pseudomonas syringae subpopulations cooperate by coordinating flagellar and type III secretion spatiotemporal dynamics to facilitate plant infection. *Nature Microbiology*, 10(4), 958–972. <https://doi.org/10.1038/s41564-025-01966-0>
- Lozo, J., Danojević, D., Jovanović, Ž., Nenadović, Ž., Fira, D., Stanković, S., & Radović, S. (2022). Genotype-Dependent Antioxidative Response of Four Sweet Pepper Cultivars to Water Deficiency as Affected by Drought-Tolerant *Bacillus safensis* SS-2.7 and *Bacillus thuringiensis* SS-29.2 Strains. *Horticulturae*, 8(3), 236. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030236>
- Lu, L., Chang, M., Han, X., Wang, Q., Wang, J., Yang, H., Guan, Q., & Dai, S. (2021). Beneficial effects of endophytic Pantoea ananatis with ability to promote rice growth under saline stress. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1919–1931. <https://doi.org/10.1111/jam.15082>
- Luo, L., Meng, H., & Gu, J.-D. (2017). Microbial extracellular enzymes in biogeochemical cycling of ecosystems. *Journal of Environmental Management*, 197, 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.023>
- Maake, T. W., & Sibisi, P. (2025). Microbial Antagonists for the Control of Plant Diseases in Solanaceae Crops: Current Status, Challenges, and Global Perspectives. *Bacteria*, 4(3), 29. <https://doi.org/10.3390/bacteria4030029>
- Maciag, T., Koziel, E., Rusin, P., Otulak-Koziel, K., Jafra, S., & Czajkowski, R. (2023). Microbial Consortia for Plant Protection against Diseases: More than the Sum of Its Parts. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12227. <https://doi.org/10.3390/ijms241512227>
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Majumdar, R., Strausbaugh, C. A., Vincill, E. D., Eujayl, I., & Galewski, P. J. (2022). Leaf Bacteriome in Sugar Beet Shows Differential Response against Beet curly top virus during Resistant and Susceptible Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8073. <https://doi.org/10.3390/ijms23158073>
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M. J., Pozo, M. J., Ton, J., van Dam, N. M., & Conrath, U. (2016). Recognizing Plant Defense Priming. *Trends in Plant Science*, 21(10), 818–822. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.009>
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>

- McIlwaine, D. B., Moore, M., Corrigan, A., Niemaseck, B., & Nicoletti, D. (2024). A Comparison of the Microbial Populations in a Culture-Dependent and a Culture-Independent Analysis of Industrial Water Samples. *Applied Microbiology*, 4(3), 1079–1090. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030073>
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., Van Der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>
- Mesaroš, A., Nedeljković, M., Atanasković, I., Anđelković, M., Danojević, D., Stanković, S., & Lozo, J. (2025). The Role of Root Endophyte *Pseudomonas putida* A32 in the Protection of Two Pepper Genotypes from *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. *Horticulturae*, 11(5), 536. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11050536>
- Mesele, E., Gebreslassie, G., Yaekob, A. T., & Semere, T. (2026). Molecular Mechanisms of Plant Growth–Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Biofertilization and Disease Suppression of Crops. *International Journal of Agronomy*, 2026(1), 9398708. <https://doi.org/10.1155/ioa/9398708>
- Mishra, S., Roychowdhury, R., Ray, S., Hada, A., Kumar, A., Sarker, U., Aftab, T., & Das, R. (2024). Salicylic acid (SA)-mediated plant immunity against biotic stresses: An insight on molecular components and signaling mechanism. *Plant Stress*, 11, 100427. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100427>
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(10), 663–679. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638–649. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>
- Morris, C. E., Monteil, C. L., & Berge, O. (2013). The life history of *pseudomonas syringae*: Linking agriculture to earth system processes. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 85–104. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102402>
- Mourad, E. F., Sarhan, M. S., Daanaa, H. S. A., Abdou, M., Morsi, A. T., Abdelfadeel, M. R., Elsayey, H., Nemr, R., El-Tahan, M., Hamza, M. A., Abbas, M., Youssef, H. H., Abdelhadi, A. A., Amer, W. M., Fayez, M., Ruppel, S., & Hegazi, N. A. (2018). Plant materials are sustainable substrates supporting new technologies of plant-only-based culture media for in vitro culturing of the plant microbiota. *Microbes and Environments*, 33(1), 40–49. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17135>
- Movahedi, A., Aghaei-Dargiri, S., Barati, B., Kadkhodaei, S., Wei, H., Sangari, S., Yang, L., & Xu, C. (2022). Plant Immunity Is Regulated by Biological, Genetic, and Epigenetic Factors. *Agronomy*, 12(11), 2790. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112790>
- Narayanan, M., Pugazhendhi, A., & Ma, Y. (2022). Assessment of PGP traits of *Bacillus cereus* NDRMN001 and its influence on *Cajanus cajan* (L.) Millsp. phytoremediation potential on metal-polluted soil under controlled conditions. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1017043. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1017043>
- Nedeljković, M., Mesaroš, A., Radosavljević, M., Đorđević, N., Stanković, S., Lozo, J., & Atanasković, I. (2025). Type III Secretion System-Mediated Induction of Systemic Resistance by *Pseudomonas marginalis* ORh26 Enhances Sugar Beet Defence Against *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. *Plants*, 14(11), 1621. <https://doi.org/10.3390/plants14111621>
- Negi, R., Sharma, B., Jan, T., Kaur, T., Chowdhury, S., Kapoor, M., Singh, S., Kumar, A., Rai, A. K., Rustagi, S., Shreaz, S., Kour, D., Ahmed, N., Kumar, K., & Yadav, A. N. (2024). Microbial Consortia: Promising Tool as Plant Bioinoculants for Agricultural Sustainability. *Current Microbiology*, 81(8), 222. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03755-0>
- Ngou, B. P. M., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2022). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *Plant Cell*, 34(5), 1447–1478. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>

- Ngou, B. P. M., Heal, R., Wyler, M., Schmid, M. W., & Jones, J. D. G. (2022). Concerted expansion and contraction of immune receptor gene repertoires in plant genomes. *Nature Plants*, 8(10), 1146–1152. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01260-5>
- Nguyen, H. T., Pham, T. T., Nguyen, P. T., Dinh, N. C. G., Le, M. T., Nguyen, T. D., Nguyen, T.-T., & Nguyen, V.-B. (2025). Microbial biocontrol in agriculture: from mechanistic Understanding to field application. *Discover Plants*, 2(1), 334. <https://doi.org/10.1007/s44372-025-00421-y>
- Nguyen, T. M., Seo, C., Ji, M., Paik, M. J., Myung, S. W., & Kim, J. (2018). Effective soil extraction method for cultivating previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(24), e01145–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01145-18>
- Nikolić, I., Glatter, T., Ranković, T., Berić, T., Stanković, S., & Diepold, A. (2023). Repertoire and abundance of secreted virulence factors shape the pathogenic capacity of *Pseudomonas syringae* pv. aptata. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1205257. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1205257>
- Nikolić, I., Stanković, S., Dimkić, I., Berić, T., Stojšin, V., Janse, J., & Popović, T. (2018). Genetic diversity and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. aptata isolated from sugar beet. *Plant Pathology*, 67(5), 1194–1207. <https://doi.org/10.1111/ppa.12831>
- Ninkuu, V., Aluko, O. O., Yan, J., Zeng, H., Liu, G., Zhao, J., Li, H., Chen, S., & Dakora, F. D. (2025). Phenylpropanoids metabolism: recent insight into stress tolerance and plant development cues. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1571825. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1571825>
- Niu, B., Paulson, J. N., Zheng, X., & Kolter, R. (2017). Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(12), E2450–E2459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616148114>
- Niu, B., Wang, W., Yuan, Z., Sederoff, R. R., Sederoff, H., Chiang, V. L., & Borriess, R. (2020). Microbial Interactions Within Multiple-Strain Biological Control Agents Impact Soil-Borne Plant Disease. *Frontiers in Microbiology*, 11, 585404. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585404>
- Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.013>
- Noorani, S., Sardar, A., & Naz, F. (2025). Bacterial Antagonists against Plant Pathogens: Mode of Actions. *Emerging Research Nexus*, 2(1), 85–92. <https://doi.org/10.70788/ern.2.1.2025.18>
- Okazaki, K., Tsurumaru, H., Hashimoto, M., Takahashi, H., Okubo, T., Ohwada, T., Minamisawa, K., & Ikeda, S. (2021). Community analysis-based screening of plant growth-promoting bacteria for sugar beet. *Microbes and Environments*, 36(2), ME20137. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20137>
- Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2023). Phenylpropanoid Derivatives and Their Role in Plants' Health and as antimicrobials. *Current Microbiology*, 80(12), 380. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03502-x>
- Palma, V., Gutiérrez, M. S., Vargas, O., Parthasarathy, R., & Navarrete, P. (2022). Methods to Evaluate Bacterial Motility and Its Role in Bacterial–Host Interactions. *Microorganisms*, 10(3), 563. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030563>
- Petrović, M., Janakiev, T., Grbić, M. L., Unković, N., Stević, T., Vukićević, S., & Dimkić, I. (2024). Insights into Endophytic and Rhizospheric Bacteria of Five Sugar Beet Hybrids in Terms of Their Diversity, Plant-Growth Promoting, and Biocontrol Properties. *Microbial Ecology*, 87(1), 19. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02329-0>
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Poodeetip, N., Kong-Ngern, K., Homchuen, S., Toparkngam, B., & Trelo-Ges, V. (2012). Hydrogen Peroxide and Peroxidase Activity as Potential Indicators on Adaptability of Plants to Salinity Stress Condition. *International Journal of Environmental and Rural Development*, 3(1), 85–89. [https://doi.org/10.32115/ijerd.3.1\\_85](https://doi.org/10.32115/ijerd.3.1_85)

- Poretsky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS ONE*, 9(4), e93827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., & Mandzhieva, S. (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. In *Biology*, 10(4), 267. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
- Republički zavod za statistiku (2026). *Biljna proizvodnja, od 2005*. <https://data.stat.gov.rs/Home/Result/130102?languageCode=sr-Latn>
- Reyes, C., Hodgskiss, L. H., Kerou, M., Pribasni, T., Abby, S. S., Bayer, B., Kraemer, S. M., & Schleper, C. (2020). Genome wide transcriptomic analysis of the soil ammonia oxidizing archaeon *Nitrososphaera viennensis* upon exposure to copper limitation. *ISME Journal*, 14(11), 2659–2674. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0715-2>
- Rezaee Danesh, Y., Mulet, J. M., & Porcel, R. (2025). Bridging Microbial Biocontrol and Phytochemical Biopesticides: Synergistic Approaches for Sustainable Crop Protection. *Plants*, 14(22), 3453. <https://doi.org/10.3390/plants14223453>
- Riseh, R. S., Fathi, F., Vazvani, M. G., & Tarkka, M. T. (2025). Plant Colonization by Biocontrol Bacteria and Improved Plant Health: A Review. *Frontiers in Bioscience – Landmark*, 30(1), 23223. <https://doi.org/10.31083/FBL23223>
- Rslan, W. M., Abo-Hegazy, S. R. E., Abd-Elhalim, H. M., & Masri, M. I. (2025). Multifaceted role of rhizospheric bacteria in enhancing sugar beet growth through biofilm formation, salt stress mitigation and biocontrol potential. *International Journal of Agriculture & Biology*, 34(05), 340505–340505. <https://doi.org/10.152390>
- Salwan, R., Sharma, M., Sharma, A., & Sharma, V. (2023). Insights into plant beneficial microorganism-triggered induced systemic resistance. *Plant Stress*, 7, 100140. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100140>
- Santoyo, G. (2022). How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. *Journal of Advanced Research*, 40, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.11.020>
- Sarhan, M. S., Hamza, M. A., Youssef, H. H., Patz, S., Becker, M., ElSawey, H., Nemr, R., Daanaa, H. S. A., Mourad, E. F., Morsi, A. T., Abdelfadeel, M. R., Abbas, M. T., Fayez, M., Ruppel, S., & Hegazi, N. A. (2019). Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture media – A review. *Journal of Advanced Research*, 19, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.002>
- Sarkar, S. F., & Guttman, D. S. (2004). Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1999–2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1999-2012.2004>
- Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, S., & Singh, H. B. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.001>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sehrawat, A., Sindhu, S. S., & Glick, B. R. (2022). Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*, 32(1), 15–38. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60058-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60058-9)
- Senger, M., Moresco, E., Dalbosco, M., Santin, R., Inderbitzin, P., & Barrocas, E. N. (2022). Methods to quantify *Bacillus simplex*-based inoculant and its effect as a seed treatment on field-grown corn and soybean in Brazil. *Journal of Seed Science*, 44. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v44263329>
- Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L. A., Naamala, J., Lyu, D., Rabileh, M., Zajonc, J., & Smith, D. L. (2021). PGPR in Agriculture: A Sustainable Approach to Increasing Climate Change Resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 667546. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>

- Shi, Y., Lou, K., & Li, C. (2009). Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. *Biology and Fertility of Soils*, 45(6), 645–653. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0376-9>
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J., & Lou, K. (2014). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(14), 6375–6385. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5720-9>
- Shoebitz, M., Ribaud, C. M., Pardo, M. A., Cantore, M. L., Ciampi, L., & Curá, J. A. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1768–1774. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.031>
- Singh, A., Yadav, V. K., Chundawat, R. S., Soltane, R., Awwad, N. S., Ibrahim, H. A., Yadav, K. K., & Vicas, S. I. (2023). Enhancing plant growth promoting rhizobacterial activities through consortium exposure: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1099999. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1099999>
- Singh, R. P., & Jha, P. N. (2017). The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1945. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01945>
- Smirnoff, N., & Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221(3), 1197–1214. <https://doi.org/10.1111/nph.15488>
- Sommer, A., Wenig, M., Knappe, C., Kublik, S., Foesel, B. U., Schlöter, M., & Vlot, A. C. (2024). A salicylic acid-associated plant-microbe interaction attracts beneficial *Flavobacterium* sp. to the *Arabidopsis thaliana* phyllosphere. *Physiologia Plantarum*, 176(4), e14483. <https://doi.org/10.1111/pp1.14483>
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- Subić, J., Kovačević, V., & Jeločnik, M. (2018). Sugar Beet Production in Serbia: Estimation of Damages Caused by Climate Factor. *Proceedings from the VII International Conference - Competitiveness of Agro-Food and Environmental Economy*, 7, 24–34.
- Suzuki, W., Sugawara, M., Miwa, K., & Morikawa, M. (2014). Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.007>
- Thompson, I. P., Bailey, M. J., Fenlon, J. S., Fermor, T. R., Lilley, A. K., Lynch, J. M., McCormack, P. J., McQuilken, M. P., Purdy, K. J., Rainey, P. B., & Whipps, J. M. (1993). Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil*, 150(2), 177–191. <https://doi.org/10.1007/BF00013015>
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant Growth-Promoting Bacteria of Soil: Designing of Consortia Beneficial for Crop Production. *Microorganisms*, 11(12), 2864. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122864>
- Tripathi, D. K., Bhat, J. A., Antoniou, C., Kandhol, N., Singh, V. P., Fernie, A. R., & Fotopoulos, V. (2024). Redox Regulation by Priming Agents Toward a Sustainable Agriculture. *Plant and Cell Physiology*, 65(7), 1087–1102. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcae031>
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Tsuda, K., & Somssich, I. E. (2015). Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist*, 206(3), 932–947. <https://doi.org/10.1111/nph.13286>
- Valente, I. d. L., Wancura, J. H. C., Zobot, G. L., & Mazutti, M. A. (2025). Endophytic and Rhizospheric Microorganisms: An Alternative for Sustainable, Organic, and Regenerative Bioinput

- Formulations for Modern Agriculture. *Microorganisms*, 13(4), 813. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms13040813>
- Vieira, M.E.O., Vieira Nunes, V., Costa Calazans, C., & Silva-Mann, R. (2024). Unlocking plant defenses: Harnessing the power of beneficial microorganisms for induced systemic resistance in vegetables – A systematic review. *Biological Control*, 188, 105428. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105428>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Vlot, A. C., Sales, J. H., Lenk, M., Bauer, K., Brambilla, A., Sommer, A., Chen, Y., Wenig, M., & Nayem, S. (2021). Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*, 229(3), 1234–1250. <https://doi.org/10.1111/nph.16953>
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 828–40. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
- Vorholt, J. A., Vogel, C., Carlström, C. I., & Müller, D. B. (2017). Establishing Causality: Opportunities of Synthetic Communities for Plant Microbiome Research. *Cell Host and Microbe*, 22(2), 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.004>
- Vos, I. A., Pieterse, C. M. J., & Van Wees, S. C. M. (2013). Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathology*, 62(S1), 43–55. <https://doi.org/10.1111/ppa.12105>
- Weller-Stuart, T., De Maayer, P., & Coutinho, T. (2017). *Pantoea ananatis*: genomic insights into a versatile pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 18(9), 1191–1198. <https://doi.org/10.1111/mpp.12517>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, X., Wen, H., Suprun, A., & Zhu, H. (2025). Ethylene Signaling in Regulating Plant Growth, Development, and Stress Responses. *Plants*, 14(3), 309. <https://doi.org/10.3390/plants14030309>
- Wei, Y. S., Javed, T., Liu, T. T., Ali, A., & Gao, S. J. (2025). Mechanisms of Absciscic acid (ABA)-mediated plant defense responses: An updated review. *Plant Stress*, 15, 100724. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100724>
- Wolfgang, A., Temme, N., Tilcher, R., & Berg, G. (2023). Understanding the sugar beet holobiont for sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1151052. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1151052>
- Wu, T., Xu, J., Liu, J., Guo, W. H., Li, X. Bin, Xia, J. B., Xie, W. J., Yao, Z. G., Zhang, Y. M., & Wang, R. Q. (2019). Characterization and initial application of endophytic *Bacillus safensis* strain ZY16 for improving phytoremediation of oil-contaminated saline soils. *Frontiers in Microbiology*, 10, 991. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00991>
- Wu, X., Zhu, S., He, L., Cheng, G., Li, T., Meng, W., & Wen, F. (2025). Phenylalanine Ammonia-Lyase: A Core Regulator of Plant Carbon Metabolic Flux Redistribution—From Molecular Mechanisms and Growth Modulation to Stress Adaptability. *Plants*, 14(24), 3811. <https://doi.org/10.3390/plants14243811>
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- Xu, X., Nielsen, L. J. D., Song, L., Maróti, G., Strube, M. L., & Kovács, Á. T. (2023). Enhanced specificity of *Bacillus* metataxonomics using a tuf-targeted amplicon sequencing approach. *ISME Communications*, 3(1), 126. <https://doi.org/10.1038/s43705-023-00330-9>
- Yadav, M., Satija, S., Awasthi, S., Singh, I. K., & Singh, A. (2026). Lipxygenases: The gatekeepers in plant resilience against biotic stress. *Plant Gene*, 45, 100557. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2025.100557>

- Yan, M., Zhao, X., Li, X., He, Z., Hua, J., Wei, L., Sun, Y., Wan, C., & Huang, S. (2025). Molecular Cloning, Bioinformatics, and Expression Analysis of the NPR1 Homolog in Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plants*, 14(23), 3557. <https://doi.org/10.3390/plants14233557>
- Youssef, H. H., Hamza, M. A., Fayez, M., Mourad, E. F., Saleh, M. Y., Sarhan, M. S., Suker, R. M., Eltahlawy, A. A., Nemr, R. A., El-Tahan, M., Ruppel, S., & Hegazi, N. A. (2016). Plant-based culture media: Efficiently support culturing rhizobacteria and correctly mirror their in-situ diversity. *Journal of Advanced Research*, 7(2), 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.07.005>
- Yu, K., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. A. H. M., & Berendsen, R. L. (2019). Beneficial microbes going underground of root immunity. *Plant Cell and Environment*, 42(10), 2860–2870. <https://doi.org/10.1111/pce.13632>
- Yu, X. Q., Niu, H. Q., Liu, C., Wang, H. L., Yin, W., & Xia, X. (2024). PTI-ETI synergistic signal mechanisms in plant immunity. *Plant Biotechnology Journal*, 22(8), 2113–2128. <https://doi.org/10.1111/pbi.14332>
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., & Niu, D. (2022). Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. *Plants*, 11(3), 386. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>
- Yuan, M., Ngou, B. P. M., Ding, P., & Xin, X. F. (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102030. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030>
- Zarraonaindia, I., Martínez-Goñi, X. S., Liñero, O., Muñoz-Colmenero, M., Aguirre, M., Abad, D., Baroja-Careaga, I., de Diego, A., Gilbert, J. A., & Estonba, A. (2020). Response of horticultural soil microbiota to different fertilization practices. *Plants*, 9(11), 1501. <https://doi.org/10.3390/plants9111501>
- Zavaliev, R., Mohan, R., Chen, T., & Dong, X. (2020). Formation of NPR1 Condensates Promotes Cell Survival during the Plant Immune Response. *Cell*, 182(5), 1093–1108.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.016>
- Zeng, T., Su, H., Wang, M., He, J., Gu, L., Wang, H., Du, X., Wang, C., & Zhu, B. (2025). The Role of MYC2 Transcription Factors in Plant Secondary Metabolism and Stress Response Mechanisms. *Plants*, 14(8), 1255. <https://doi.org/10.3390/plants14081255>
- Zhang, C., Wan, R., Nong, S., Huang, W., Al-Rejaie, S. S., Wang, F., Yang, Z., Zhu, Z., & Mohany, M. (2026). Deciphering the interplay between fruit-associated metabolites and bacterial communities across four distinct mango cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 17, 1754579. <https://doi.org/10.3389/fpls.2026.1754579>
- Zhang, Z., Li, C., Li, S., Sun, Y., Li, N., & Li, G. (2025). Microbial Agents Enhance Sugar Beet Yield and Quality as an Alternative to Chemical Fertilizers. *Agronomy*, 15(12), 2838. <https://doi.org/10.3390/agronomy15122838>
- Zhao, L., Li, S., Yu, Q., Zhang, C., Wang, L., Jiang, Y., Wu, Z., & Pi, Z. (2023). Vernalization Promotes GA-Mediated Bolting Initiation via the Inhibition of ABA and JA Biosynthesis. *Agronomy*, 13(5), 1251. <https://doi.org/10.3390/agronomy13051251>
- Zheng, C., Chen, J. P., Wang, X. W., & Li, P. (2025). Reactive Oxygen Species in Plants: Metabolism, Signaling, and Oxidative Modifications. *Antioxidants*, 14(6), 617. <https://doi.org/10.3390/antiox14060617>
- Zhu, J., Chen, H., Liu, L., Xia, X., Yan, X., Mi, X., Liu, S., & Wei, C. (2024). JA-mediated MYC2/LOX/AOS feedback loop regulates osmotic stress response in tea plant. *Horticultural Plant Journal*, 10(3), 931–946. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.10.014>

# PRILOZI

Prilog 1. Produkcija egzoenzima 635 bakterijskih izolata

| Izolati izolovani maja meseca |                                      |         |            |            |          |          |          |
|-------------------------------|--------------------------------------|---------|------------|------------|----------|----------|----------|
| Izolat                        | Vrsta                                | Amilaza | Proteinaza | Želatinaza | Mananaza | Celulaza | Katalaza |
| ML1                           |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML2                           | <i>Pseudomonas lutea</i>             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML3                           |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML4                           |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML5                           |                                      | -       | -          | -          | -        | +        | +        |
| ML8                           |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML10                          | <i>Stenotrophomonas tumulicola</i>   | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML11                          | <i>Peribacillus frigoritolerans</i>  | +       | +          | -          | -        | +        | +        |
| ML15                          | <i>Bacillus thuringiensis</i>        | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML16                          |                                      | +       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML17                          | <i>Metabacillus dongyingensis</i>    | +       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML18                          | <i>Metabacillus dongyingensis</i>    | +       | -          | -          | -        | +        | +        |
| ML19                          |                                      | -       | -          | +          | -        | -        | +        |
| ML20                          |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML21                          | <i>Curtobacterium allii</i>          | +       | +          | -          | -        | -        | +        |
| ML25                          | <i>Arthrobacter ginsengisoli</i>     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML26                          |                                      | -       | -          | -          | +        | -        | +        |
| ML27                          |                                      | -       | +          | -          | -        | +        | +        |
| ML28                          | <i>Pseudomonas paracarnis</i>        | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML29                          |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML30                          |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML31                          |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML156                         |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML158                         | <i>Curtobacterium herbarum</i>       | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML159                         | <i>Pseudomonas lurida</i>            | +       | +          | -          | +        | +        | +        |
| ML162                         | <i>Bacillus thuringiensis</i>        | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML164                         |                                      | -       | -          | -          | -        | +        | +        |
| ML166                         |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML168                         |                                      | -       | -          | +          | -        | -        | +        |
| ML169.2                       |                                      | +       | -          | +          | -        | -        | +        |
| ML170                         | <i>Pseudomonas grimontii</i>         | -       | -          | -          | +        | +        | +        |
| ML171                         |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML172                         |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML173                         | <i>Micrococcus yunnanensis</i>       | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML254                         |                                      | -       | +          | +          | +        | +        | +        |
| ML255                         |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| ML257                         |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| MR32                          |                                      | -       | -          | +          | +        | +        | +        |
| MR33                          |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| MR35                          |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| MR36                          | <i>Metabacillus idriensis</i>        | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| MR37                          | <i>Chryseobacterium lactis</i>       | +       | -          | +          | -        | -        | +        |
| MR38                          |                                      | -       | +          | -          | -        | +        | +        |
| MR39                          | <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> | +       | -          | +          | +        | -        | +        |
| MR40                          |                                      | +       | +          | -          | -        | -        | +        |
| MR41.1                        |                                      | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| MR41.2                        |                                      | +       | -          | -          | -        | +        | +        |

|         |                                           |   |   |   |   |   |   |
|---------|-------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| MR44    | <i>Microbacterium foliorum</i>            | + | - | + | - | - | + |
| MR45    |                                           | + | - | - | - | - | + |
| MR46    |                                           | + | - | - | + | - | + |
| MR47    |                                           | + | - | + | - | - | + |
| MR48    |                                           | - | + | + | - | - | + |
| MR49    |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MR50    | <i>Pseudomonas korensi</i>                | - | + | + | - | + | + |
| MR174   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MR175   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| MR179   |                                           | - | - | - | - | + | + |
| MR180   | <i>Peribacillus simplex</i>               | - | + | - | - | + | + |
| MR181   | <i>Acinetobacter</i> sp.                  | - | - | - | - | - | + |
| MR182   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MR184   |                                           | - | + | + | + | - | + |
| MR185   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MR186   | <i>Rhodococcus</i> sp.                    | - | - | - | - | - | + |
| MR189   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MR190   | <i>Pantoea agglomerans</i>                | - | - | - | - | - | + |
| MR191   |                                           | - | + | - | - | + | + |
| MR192   |                                           | + | - | - | - | + | + |
| MR193   |                                           | + | - | + | + | - | + |
| MR194   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| MR195   | <i>Stenotrophomonas</i> sp.               | - | + | + | - | - | + |
| MR197   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| MR198   | <i>Pantoea agglomerans</i>                | - | - | + | + | - | + |
| MR199   | <i>Serratia inhibens</i>                  | - | + | + | - | - | + |
| MR200   | <i>Serratia inhibens</i>                  | - | - | - | - | + | + |
| MR201   | <i>Arthrobacter bambusae</i>              | + | - | + | + | + | + |
| MR202   |                                           | - | + | - | + | - | + |
| MR203   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MR204   |                                           | + | + | + | - | - | + |
| MR205   | <i>Serratia</i> sp.                       | - | - | + | - | + | + |
| MR208   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh51   |                                           | + | - | - | - | - | + |
| MRh53   | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> | + | - | - | - | - | + |
| MRh54   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh55   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| MRh57   | <i>Pseudomonas proteolytica</i>           | + | + | + | - | + | + |
| MRh58   | <i>Streptomyces exfoliatus</i>            | + | + | - | - | + | + |
| MRh59   |                                           | + | - | - | - | - | + |
| MRh61   | <i>Advenella kashmirensis</i>             | - | - | - | + | - | + |
| MRh62   | <i>Glutamicibacter halophytocola</i>      | + | - | - | - | - | + |
| MRh64   | <i>Microbacterium foliorum</i>            | + | + | + | + | - | + |
| MRh65   | <i>Rhodococcus jostii</i>                 | + | - | + | - | + | + |
| MRh66   |                                           | + | + | - | - | - | + |
| MRh67.1 | <i>Microbacterium</i> sp.                 | - | - | + | - | - | + |
| MRh67.2 |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh68   | <i>Bacillus thuringiensis</i>             | + | + | + | - | - | + |
| MRh69   | <i>Bacillus safensis</i>                  | - | + | - | - | - | + |

|         |                                           |   |   |   |   |   |   |
|---------|-------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| MRh70   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| MRh71   | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>        | - | - | - | - | - | + |
| MRh72   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh73   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| MRh74   | <i>Bacillus safensis</i>                  | - | + | - | + | + | + |
| MRh75   | <i>Rhodococcus jostii</i>                 | - | - | - | - | - | + |
| MRh76.1 |                                           | + | + | - | - | - | + |
| MRh76.2 |                                           | + | - | - | - | - | + |
| MRh77   |                                           | + | - | - | - | - | + |
| MRh78   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh79   | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>        | - | + | - | - | - | + |
| MRh80   | <i>Pseudomonas</i> sp.                    | - | - | - | - | + | + |
| MRh81   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh82   |                                           | - | + | - | - | + | + |
| MRh83   |                                           | - | + | - | - | + | + |
| MRh84   | <i>Arthrobacter bambusae</i>              | + | + | + | - | + | + |
| MRh85   |                                           | + | - | - | - | - | + |
| MRh86   | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> | + | - | - | - | - | + |
| MRh87   |                                           | - | - | - | + | - | + |
| MRh92   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh93   | <i>Stenotrophomonas lactitubi</i>         | - | - | - | - | - | + |
| MRh94   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh95   |                                           | - | - | + | - | - | + |
| MRh96   | <i>Pseudomonas lini</i>                   | - | - | - | - | - | + |
| MRh97.1 |                                           | + | + | - | - | - | + |
| MRh97.2 | <i>Pseudomonas baetica</i>                | - | - | - | - | - | + |
| MRh98   |                                           | + | + | + | - | - | + |
| MRh99   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh100  | <i>Arthrobacter bambusae</i>              | - | - | - | + | - | + |
| MRh102  |                                           | - | - | - | + | - | + |
| MRh103  | <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>     | - | - | - | - | + | + |
| MRh105  | <i>Pseudomonas brenneri</i>               | - | - | - | - | + | + |
| MRh106  |                                           | + | + | - | - | - | + |
| MRh107  | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>        | - | + | - | + | + | + |
| MRh108  |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh109  |                                           | + | - | - | - | - | + |
| MRh110  |                                           | + | + | + | + | - | + |
| MRh112  |                                           | - | - | - | + | - | + |
| MRh113  |                                           | - | + | - | + | + | + |
| MRh115  | <i>Glutamicibacter halophytocola</i>      | + | - | - | - | + | + |
| MRh116  | <i>Glutamicibacter halophytocola</i>      | - | - | - | - | + | + |
| MRh117  |                                           | + | - | - | - | - | + |
| MRh119  |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh121  |                                           | - | - | - | - | - | + |
| MRh122  | <i>Rhodococcus jostii</i>                 | - | - | + | - | - | + |
| MRh123  | <i>Arthrobacter pescens</i>               | - | + | + | - | + | + |
| MRh124  | <i>Arthrobacter globiformis</i>           | - | - | - | - | + | + |
| MRh125  | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>        | - | - | - | - | - | + |
| MRh126  |                                           | - | - | - | - | - | + |

|        |                                                  |   |   |   |   |   |   |
|--------|--------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| MRh127 | <i>Bacillus</i> sp.                              | - | - | - | - | + | + |
| MRh129 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh130 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh132 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh134 |                                                  | - | + | - | - | + | + |
| MRh135 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh136 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh137 | <i>Bacillus</i> sp.                              | - | - | - | - | - | + |
| MRh138 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh139 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh141 | <i>Stenotrophomonas lactitubi</i>                | - | + | - | - | - | + |
| MRh143 |                                                  | - | - | - | - | + | + |
| MRh144 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh145 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh147 |                                                  | - | - | - | - | + | + |
| MRh148 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh149 |                                                  | - | + | + | - | + | + |
| MRh150 | <i>Streptomyces cyaneochromogenes</i>            | - | - | - | - | - | + |
| MRh151 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh154 | <i>Bacillus</i> sp.                              | - | + | - | - | - | + |
| MRh155 | <i>Arthrobacter bussei</i>                       | - | - | - | - | - | + |
| MRh210 |                                                  | + | - | - | - | - | + |
| MRh214 | <i>Microbacterium profundum</i>                  | + | - | + | + | + | + |
| MRh215 |                                                  | + | - | + | - | - | + |
| MRh216 |                                                  | - | - | + | - | + | + |
| MRh217 |                                                  | - | + | - | - | - | + |
| MRh218 |                                                  | - | - | + | - | - | + |
| MRh219 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh220 |                                                  | - | - | - | - | + | + |
| MRh221 |                                                  | + | - | + | - | - | + |
| MRh222 |                                                  | - | - | - | - | + | + |
| MRh224 |                                                  | - | - | - | - | + | + |
| MRh225 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>               | + | - | - | - | - | + |
| MRh226 |                                                  | - | - | + | - | + | + |
| MRh227 |                                                  | - | + | - | - | + | + |
| MRh228 | <i>Variovorax paradoxus</i>                      | - | - | - | - | - | + |
| MRh229 |                                                  | + | + | + | - | + | + |
| MRh230 | <i>Rhodococcus</i> sp./ <i>Nocardia coeliaca</i> | - | - | - | - | + | + |
| MRh231 | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>        | + | + | - | - | - | + |
| MRh232 | <i>Pseudomonas marginalis</i>                    | - | + | - | - | + | + |
| MRh234 | <i>Morganella morganii</i>                       | - | - | - | - | - | + |
| MRh235 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh238 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh241 |                                                  | - | + | - | + | - | + |
| MRh244 | <i>Paenibacillus massiliensis</i>                | + | + | - | - | - | + |
| MRh245 |                                                  | + | - | - | - | - | + |
| MRh247 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh251 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| MRh252 |                                                  | - | - | - | - | + | + |

|        |                                      |   |   |   |   |   |   |
|--------|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| MRh253 |                                      | - | - | - | - | - | + |
| MRh261 | <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> | - | + | + | - | - | + |
| MRh265 |                                      | - | + | - | - | - | + |
| MRh267 |                                      | + | - | - | + | - | + |
| MRh269 | <i>Bacillus thuringiensis</i>        | + | - | - | - | + | + |
| MRh270 |                                      | + | + | + | + | + | + |
| MRh271 | <i>Bacillus thuringiensis</i>        | + | - | + | - | - | + |
| MRh275 | <i>Bacillus safensis</i>             | - | - | - | - | + | + |
| MRh276 |                                      | - | - | - | - | - | + |

| Izolati izolovani jula meseca |                                                             |         |            |            |          |          |          |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------|------------|------------|----------|----------|----------|
| Izolat                        | Vrsta                                                       | Amilaza | Proteinaza | Želatinaza | Mananaza | Celulaza | Katalaza |
| JL1                           |                                                             | -       | -          | -          | -        | +        | +        |
| JL2                           | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                         | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL3                           | <i>Brucella puitosa</i>                                     | +       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL4                           |                                                             | -       | +          | -          | -        | -        | +        |
| JL5                           | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                         | +       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL6                           |                                                             | -       | +          | -          | -        | -        | +        |
| JL7                           |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL8                           |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL9                           | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                         | +       | -          | +          | +        | -        | +        |
| JL10                          | <i>Pantoea agglomerans</i> /Enterobacter<br><i>ludwigii</i> | +       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL11                          | <i>Paenibacillus massiliensis</i>                           | -       | -          | +          | -        | -        | +        |
| JL12.1                        |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL12.2                        |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL13                          |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL14.1                        |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL14.2                        | <i>Acinetobacter courvalinii</i>                            | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL15                          | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                         | -       | -          | +          | -        | -        | +        |
| JL16                          |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL19                          |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL20                          | <i>Paenibacillus massiliensis</i>                           | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL22                          |                                                             | +       | -          | -          | +        | +        | +        |
| JL23                          | <i>Brucella grignonensis</i>                                | +       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL26                          |                                                             | -       | +          | +          | +        | -        | +        |
| JL30                          | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                         | -       | -          | -          | +        | +        | +        |
| JL35                          |                                                             | -       | -          | -          | +        | -        | +        |
| JL37                          | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                         | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL39                          |                                                             | -       | -          | +          | -        | -        | +        |
| JL41                          | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                         | -       | -          | -          | +        | +        | +        |
| JL42                          |                                                             | -       | -          | +          | -        | -        | +        |
| JL44                          |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL47                          | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                         | -       | -          | -          | +        | +        | +        |
| JL48                          |                                                             | -       | +          | -          | -        | -        | +        |
| JL49                          |                                                             | -       | +          | -          | +        | -        | +        |
| JL49.2                        |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL52                          |                                                             | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| JL53                          |                                                             | +       | -          | -          | -        | +        | +        |
| JL54                          | <i>Streptomyces</i> sp.                                     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |

|         |                                                  |   |   |   |   |   |   |
|---------|--------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| JL55    | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>              | - | + | - | - | - | + |
| JL56    | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>              | - | - | - | - | - | + |
| JL60    |                                                  | - | + | - | - | - | + |
| JL62    |                                                  | - | + | - | + | + | + |
| JL65    | <i>Bacillus zanthoxyli/Priestia aryabhattai</i>  | + | - | + | - | - | + |
| JL66    | <i>Pseudomonas</i> sp.                           | + | - | - | - | - | + |
| JL67    | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>              | - | - | - | + | - | + |
| JL70    |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JL71    | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>              | + | + | - | + | - | + |
| JL72    |                                                  | + | - | - | - | - | + |
| JL74    | <i>Brucella pseudogrignonensis</i>               | - | - | + | - | - | + |
| JL75    |                                                  | - | + | - | + | + | + |
| JL76.1  |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JL76.2  |                                                  | + | - | - | - | - | + |
| JL79    |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JL80    | <i>Pantoea agglomerans/Enterobacter ludwigii</i> | + | - | - | - | - | + |
| JR82    | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>               | + | - | - | - | - | + |
| JR83    |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JR84    |                                                  | - | - | + | - | - | + |
| JR85    |                                                  | - | - | + | - | - | + |
| JR86    | <i>Micrococcus yuannensis</i>                    | - | - | - | + | - | + |
| JR87    |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JR88    | <i>Pseudomonas</i> sp.                           | - | - | - | + | + | + |
| JR89    | <i>Achromobacter</i> sp.                         | - | - | - | - | - | + |
| JR90    |                                                  | - | - | + | - | - | + |
| JR91    |                                                  | - | - | - | + | - | + |
| JR92    |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JR93    |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JR95    | <i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>              | - | - | + | - | - | + |
| JR96    |                                                  | + | - | - | - | - | + |
| JR98    | <i>Bacillus</i> sp.                              | + | + | + | - | - | + |
| JR100   | <i>Streptomyces</i> sp.                          | + | - | - | - | - | + |
| JR104   |                                                  | - | + | - | + | + | + |
| JR108.1 | <i>Brucella pseudogrignonensis</i>               | - | - | - | - | - | + |
| JR108.2 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JR109   |                                                  | - | - | - | - | + | + |
| JR110   | <i>Bacillus safensis</i>                         | - | + | + | - | - | + |
| JR111   |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JR111.2 |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JR113   | <i>Raoultella terrigena</i>                      | - | - | - | - | - | + |
| JR114   |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JR115   |                                                  | - | - | - | - | - | + |
| JR116   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>              | - | - | - | + | + | + |
| JR118.1 | <i>Pantoea brenneri</i>                          | + | - | - | - | - | + |
| JR125   | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>               | + | - | - | - | - | + |
| JR126.1 | <i>Agrobacterium</i> sp.                         | - | - | - | - | - | + |
| JR126.2 |                                                  | - | - | - | + | - | + |
| JR129   | <i>Sphingobacterium</i> sp.                      | - | - | + | - | - | + |
| JR130   |                                                  | - | - | - | + | + | + |

|          |                                     |   |   |   |   |   |   |
|----------|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| JR131    |                                     | + | - | - | - | - | + |
| JR133    |                                     | - | - | + | - | - | + |
| JR134    |                                     | - | + | - | + | + | + |
| JR135    | <i>Enterobacter mori</i>            | - | - | - | + | - | + |
| JR139    | <i>Stenotrophomonas</i> sp.         | - | + | - | + | - | + |
| JR141    |                                     | - | - | - | - | + | + |
| JR141.2  |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JR143    | <i>Pseudomonas fulva</i>            | - | - | - | + | + | + |
| JR144    |                                     | - | - | - | + | + | + |
| JR145    |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JR147    |                                     | - | - | - | + | - | + |
| JR148    | <i>Kosakonia cowanii</i>            | - | - | - | - | - | + |
| JR149.1  |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JR151    |                                     | - | - | - | + | - | + |
| JR156    | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i>  | - | - | - | - | - | + |
| JR159    |                                     | + | + | + | - | + | + |
| JR160    | <i>Enterobacter ludwigii</i>        | - | - | - | - | - | + |
| JR161    | <i>Brucella pseudogrignonensis</i>  | - | - | - | - | - | + |
| JRh162   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh163   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh164   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | - | - | + | - | + |
| JRh165   |                                     | - | + | - | - | + | + |
| JRh166   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh167   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh168   | <i>Sphingobacterium canadense</i>   | + | + | - | - | - | + |
| JRh169   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh170   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh171   | <i>Bacillus halotolerans</i>        | - | - | - | - | - | + |
| JRh172   |                                     | - | - | - | - | + | + |
| JRh173   |                                     | - | + | - | - | - | + |
| JRh174   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | + | - | + | - | + |
| JRh175   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | + | - | + | - | + |
| JRh176   | <i>Peribacillus frigoritolerans</i> | - | - | - | - | - | + |
| JRh179   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | + | - | + | + | + |
| JRh181   | <i>Enterobacter ludwigii</i>        | + | - | - | - | - | + |
| JRh182   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | + | + | - | - | - | + |
| JRh185   |                                     | - | + | - | + | + | + |
| JRh187   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh188   | <i>Brucella pseudogrignonensis</i>  | - | - | - | - | - | + |
| JRh189   |                                     | - | - | - | - | + | + |
| JRh190   | <i>Enterobacter ludwigii</i>        | - | - | - | - | - | + |
| JRh191.1 | <i>Sphingobacterium canadense</i>   | + | - | - | - | - | + |
| JRh191.2 |                                     | + | - | - | - | - | + |
| JRh191.3 |                                     | - | + | - | - | - | + |
| JRh192   |                                     | - | + | - | - | - | + |
| JRh193   | <i>Enterobacter ludwigii</i>        | - | - | - | - | - | + |
| JRh194   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh195   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh197   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | - | - | - | - | + |

|            |                                     |   |   |   |   |   |   |
|------------|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| JRh198     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh199     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh201     | <i>Pseudomonas juntendi</i>         | - | + | + | - | + | + |
| JRh202     |                                     | + | - | - | - | - | + |
| JRh205.1   |                                     | + | - | - | - | - | + |
| JRh205.2   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | + | + | - | - | - | + |
| JRh207     |                                     | - | - | - | + | - | + |
| JRh208.1   | <i>Enterobacter ludwigii</i>        | - | - | - | - | - | + |
| JRh208.2   | <i>Achromobacter deleyi</i>         | - | - | - | - | - | + |
| JRh209     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh210     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh211     | <i>Acinetobacter</i> sp.            | - | - | - | - | - | + |
| JRh213     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | + | + | - | - | + |
| JRh216.1   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh216.2   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh219     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh221     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh226     | <i>Bacillus pseudomycoides</i>      | - | - | - | - | - | + |
| JRh227     | <i>Bacillus safensis</i>            | - | - | - | + | - | + |
| JRh233     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | - | - | - | - | + |
| JRh234.1   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | + | - | + | - | + |
| JRh235     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | - | - | - | - | + |
| JRh236     | <i>Elizabethkingia miricola</i>     | - | - | - | - | - | + |
| JRh239     |                                     | - | + | - | + | - | + |
| JRh240     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | - | - | + | - | + |
| JRh242     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh243     | <i>Enterobacter ludwigii</i>        | + | - | - | - | - | + |
| JRh244.1   | <i>Brucella pseudogrignonensis</i>  | - | + | + | - | - | + |
| JRh244.1.2 | <i>Brucella pseudogrignonensis</i>  | - | - | - | - | - | + |
| JRh244.2   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh245     | <i>Bacillus safensis</i>            | - | + | - | - | - | + |
| JRh248     | <i>Bacillus safensis</i>            | - | - | - | - | - | + |
| JRh254     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh255     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh256     |                                     | - | + | + | - | - | + |
| JRh257     |                                     | + | - | - | - | - | + |
| JRh258.1   |                                     | - | - | - | + | + | + |
| JRh258.2   |                                     | - | - | - | + | - | + |
| JRh259     |                                     | - | + | - | - | - | + |
| JRh260     |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh261.1   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh261.2   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh263.1   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh263.2   |                                     | - | - | - | - | - | + |
| JRh264     | <i>Enterobacter ludwigii</i>        | - | - | - | - | - | + |
| JRh265     | <i>Achromobacter</i> sp.            | - | - | + | - | - | + |
| JRh266     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | - | - | - | - | - | + |
| JRh267     | <i>Peribacillus frigiditolerans</i> | - | - | - | - | - | + |
| JRh268     | <i>Bacillus safensis</i>            | - | + | + | + | - | + |

|          |                                           |   |   |   |   |   |   |
|----------|-------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| JRh269   | <i>Bacillus safensis</i>                  | - | - | - | - | - | + |
| JRh270   | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>          | - | - | - | - | - | + |
| JRh272.1 | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> | - | - | - | - | - | + |
| JRh272.2 |                                           | + | - | - | + | + | + |
| JRh273   |                                           | + | - | - | - | - | + |
| JRh275   |                                           | - | - | - | - | - | + |
| JRh276   | <i>Bacillus safensis</i>                  | - | + | - | - | - | + |
| JRh277   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| JRh278   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| JRh279   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| JRh280   | <i>Bacillus safensis</i>                  | + | + | - | - | - | + |
| JRh281   |                                           | - | - | + | - | - | + |
| JRh285   |                                           | + | - | - | - | - | + |
| JRh286   | <i>Enterobacter ludwigii</i>              | + | - | - | - | - | + |
| JRh287   |                                           | - | + | - | - | - | + |
| JRh288   | <i>Pseudomonas grimontii</i>              | + | - | + | - | - | + |
| JRh289   |                                           | + | + | + | - | + | + |
| JRh290   |                                           | - | - | + | - | - | + |

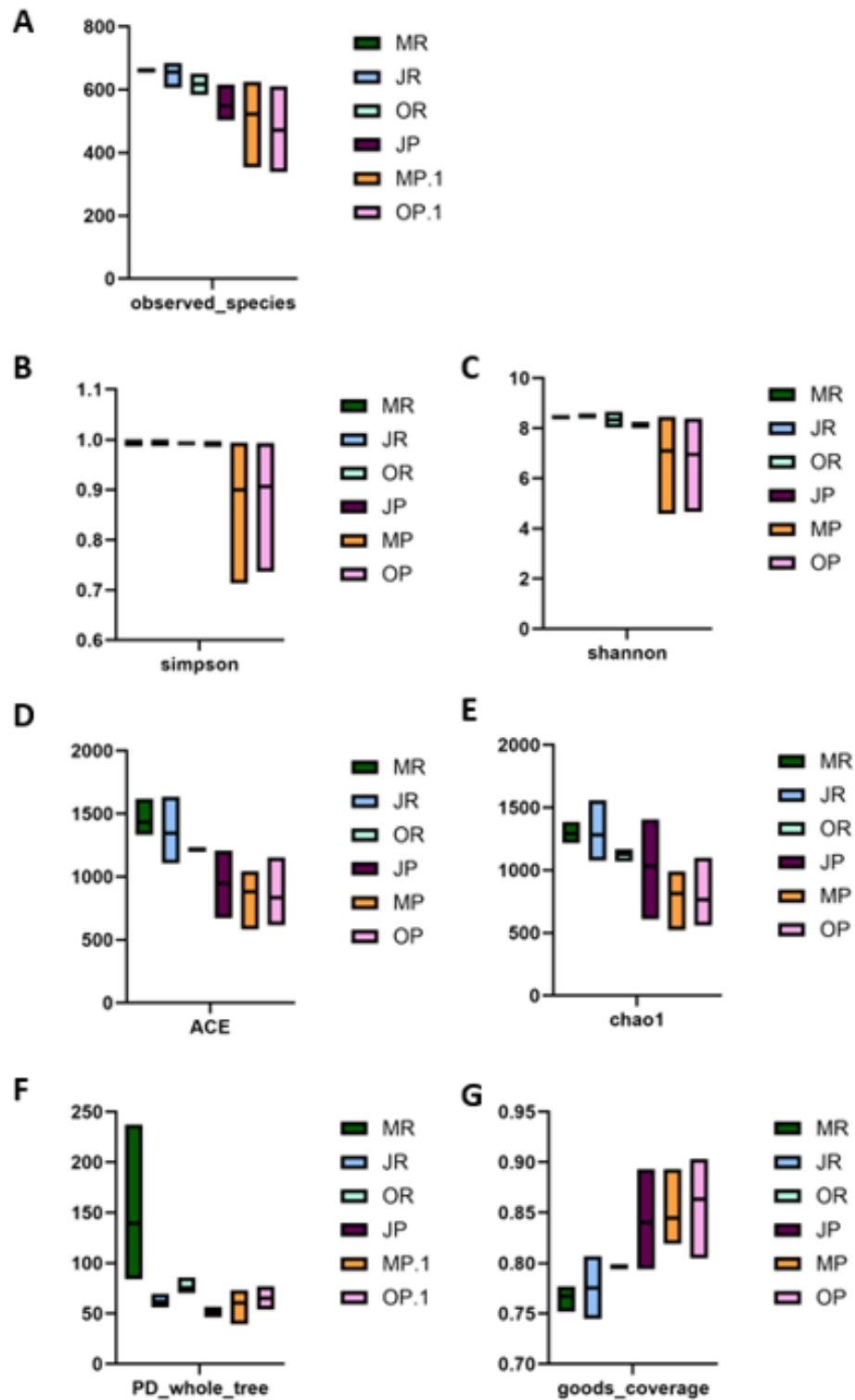
| Izolati izolovani oktobra meseca |                                                     |         |            |            |          |          |          |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------|---------|------------|------------|----------|----------|----------|
| Izolati                          | Vrsta                                               | Amilaza | Proteinaza | Želatinaza | Mananaza | Celulaza | Katalaza |
| OL101                            | <i>Erwinia persicina</i>                            | -       | -          | -          | +        | -        | +        |
| OL102                            |                                                     | -       | -          | -          | -        | +        | +        |
| OL104                            | <i>Pseudomonas grimontii/Arthrobacter sp.</i>       | +       | -          | -          | -        | +        | +        |
| OL105                            |                                                     | -       | -          | +          | +        | +        | +        |
| OL108                            |                                                     | +       | -          | -          | +        | +        | +        |
| OL109                            | <i>Pantoea sp.</i>                                  | +       | -          | -          | +        | +        | +        |
| OL111                            |                                                     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL112                            | <i>Pseudarthrobacter psychrotolerans</i>            | -       | -          | -          | -        | +        | +        |
| OL113.1                          |                                                     | +       | -          | -          | +        | +        | +        |
| OL113.2                          | <i>Acinetobacter lwoffii</i>                        | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL113.3                          |                                                     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL114                            |                                                     | -       | +          | +          | -        | +        | +        |
| OL116                            |                                                     | -       | -          | -          | -        | +        | +        |
| OL117                            |                                                     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL118                            |                                                     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL118.1                          |                                                     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL118.2                          | <i>Arthrobacter subterraneus</i>                    | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL119.1                          |                                                     | -       | -          | -          | -        | +        | +        |
| OL119.2                          | <i>Promicromonospora xylanilytica</i>               | +       | +          | -          | -        | +        | +        |
| OL120                            | <i>Oceanobacillus chungangensis</i>                 | -       | +          | +          | -        | -        | +        |
| OL122                            | <i>Pectobacterium brasiliense</i>                   | -       | -          | -          | -        | -        | -        |
| OL123                            |                                                     | -       | -          | -          | -        | +        | +        |
| OL124                            |                                                     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL125                            |                                                     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL126                            | <i>Pantoea agglomerans/Curtobacterium plantarum</i> | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL127                            | <i>Erwinia persicina</i>                            | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL128                            |                                                     | -       | -          | -          | -        | -        | +        |
| OL129                            | <i>Pseudomonas marginalis</i>                       | -       | -          | -          | -        | +        | +        |

|       |                                                 |   |   |   |   |   |   |
|-------|-------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| OL131 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL133 | <i>Enterobacter</i> sp.                         | - | - | - | - | - | + |
| OL136 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL138 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL139 |                                                 | + | - | - | + | - | + |
| OL140 | <i>Exiguobacterium artemiae</i>                 | + | - | - | - | + | + |
| OL141 | <i>Pseudomonas grimonitii</i>                   | - | + | - | - | + | + |
| OL142 |                                                 | + | - | - | - | + | + |
| OL146 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL147 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL148 | <i>Pantoea agglomerans</i>                      | - | - | - | - | + | + |
| OL149 | <i>Erwinia persicina</i>                        | - | - | + | - | + | + |
| OL150 | <i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>          | - | - | + | - | - | + |
| OL151 |                                                 | - | - | - | - | + | + |
| OL152 | <i>Cytobacillus oceanisediminis</i>             | + | - | - | - | - | + |
| OL154 | <i>Pseudomonas</i> sp.                          | - | + | + | + | + | + |
| OL155 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL156 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL157 |                                                 | + | - | - | + | + | + |
| OL158 | <i>Pseudomonas arenae</i>                       | - | - | - | + | + | + |
| OL159 |                                                 | - | - | - | - | + | + |
| OL160 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL161 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL162 | <i>Pseudomonas</i> sp.                          | - | - | - | - | - | + |
| OL164 | <i>Pantoea agglomerans</i>                      | - | - | - | + | - | + |
| OL165 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL166 |                                                 | - | - | - | + | - | + |
| OL167 | <i>Pantoea agglomerans</i>                      | - | - | - | - | - | + |
| OL168 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL253 |                                                 | - | + | + | + | + | + |
| OL254 | <i>Staphylococcus</i> sp.                       | - | - | - | - | + | + |
| OL257 |                                                 | - | - | - | - | + | + |
| OL258 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL259 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OL260 | <i>Micrococcus</i> sp./ <i>Enterobacter</i> sp. | - | - | + | - | - | + |
| OL262 | <i>Acinetobacter lwoffii</i>                    | - | - | - | - | - | + |
| OL293 |                                                 | - | - | - | + | + | + |
| OR268 |                                                 | - | - | - | - | - | + |
| OR269 | <i>Brevibacterium</i> sp.                       | - | - | - | - | + | + |
| OR270 |                                                 | + | - | - | - | - | + |
| OR271 | <i>Acinetobacter radioresistens</i>             | - | - | - | + | - | + |
| OR272 |                                                 | - | - | - | - | + | + |
| OR273 |                                                 | - | - | + | - | - | + |
| OR276 |                                                 | - | - | + | - | - | + |
| OR277 |                                                 | - | + | - | + | + | + |
| OR278 | <i>Microbacterium</i> sp.                       | - | - | - | - | - | + |
| OR279 | <i>Brevibacterium revespurgense</i>             | - | - | - | - | + | + |
| OR280 | <i>Micrococcus yunnanensis</i>                  | - | - | + | - | - | + |
| OR283 |                                                 | - | - | + | - | - | + |

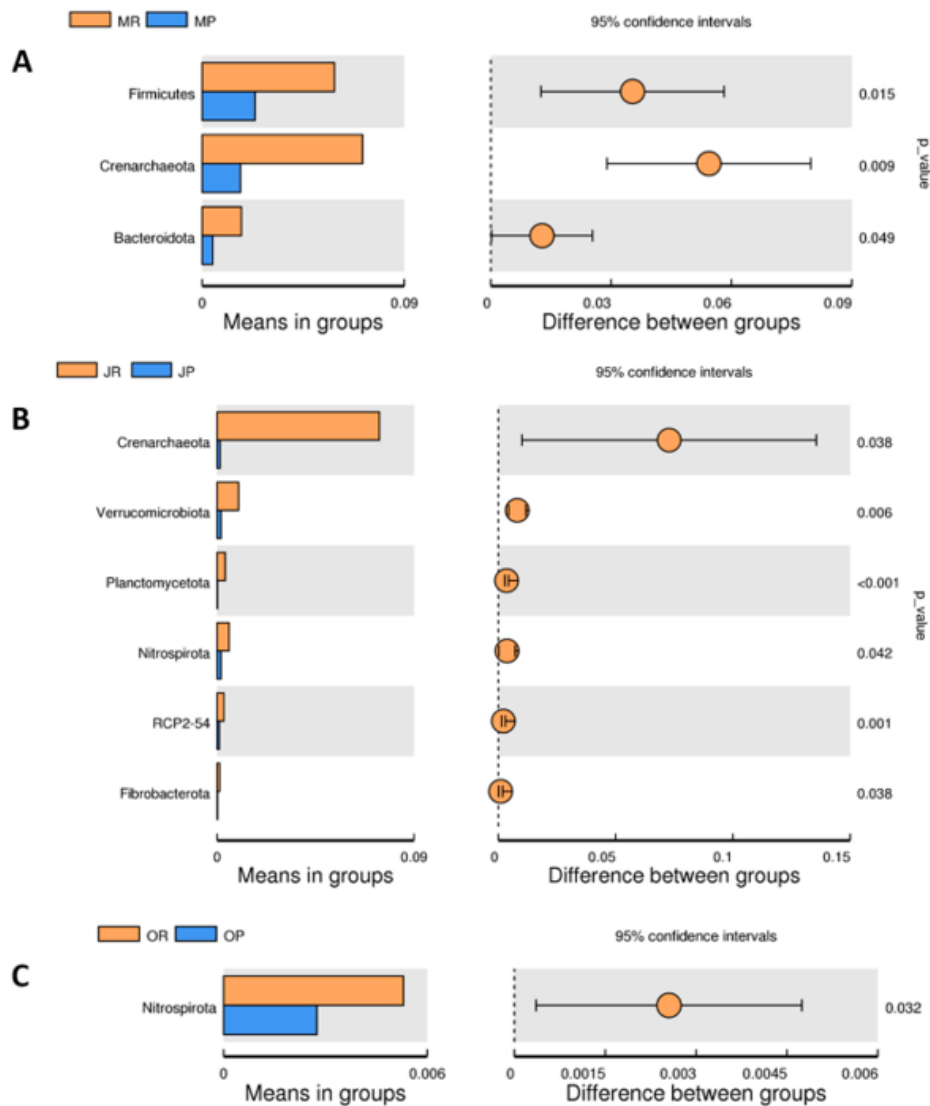
|         |                                                    |   |   |   |   |   |   |
|---------|----------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| OR284   |                                                    | - | - | + | - | - | + |
| OR285   |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| OR286   | <i>Micrococcus yunnaensis</i>                      | - | + | + | - | + | + |
| OR287   | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>          | - | + | + | - | + | + |
| OR288   |                                                    | - | - | - | - | + | + |
| OR289   | <i>Streptococcus rubneri</i>                       | + | - | - | - | + | + |
| OR290   | <i>Paracoccus yeei</i>                             | - | - | - | + | + | + |
| OR291   |                                                    | - | - | - | - | + | + |
| OR292   | <i>Micrococcus yunnanensis</i>                     | - | - | - | - | - | + |
| OR301   |                                                    | - | - | - | + | + | + |
| OR302   |                                                    | - | - | - | + | - | + |
| OR303   |                                                    | + | - | - | - | - | + |
| ORh2    |                                                    | - | + | - | + | + | + |
| ORh3    |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh4    |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh6    |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh7    | <i>Paenibacillus dongdonensis</i>                  | + | - | - | + | + | + |
| ORh10   | <i>Bacillus</i> sp./ <i>Metabacillus idriensis</i> | + | - | - | + | - | + |
| ORh12   |                                                    | - | + | - | - | - | + |
| ORh13   |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh14   | <i>Bacillus licheniformis</i>                      | + | - | - | - | - | + |
| ORh15   |                                                    | - | + | - | - | - | + |
| ORh16   | <i>Bacillus pumilus</i>                            | - | - | - | - | - | + |
| ORh18   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                | - | - | - | + | + | + |
| ORh20   |                                                    | - | + | - | + | + | + |
| ORh22   | <i>Paenibacillus lautus</i>                        | + | - | - | - | + | + |
| ORh24   | <i>Pantoea ananatis</i>                            | - | - | - | - | - | + |
| ORh25.1 | <i>Bacillus pumilus</i>                            | - | + | - | - | + | + |
| ORh25.2 | <i>Pantoea ananatis</i>                            | + | - | - | - | - | + |
| ORh26   | <i>Pseudomonas grimonii</i>                        | - | + | - | - | - | + |
| ORh28   |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh30   |                                                    | + | - | + | - | - | + |
| ORh32   |                                                    | + | - | - | - | - | + |
| ORh33   |                                                    | - | - | + | - | - | + |
| ORh35   |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh36   |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh37   |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh38   |                                                    | + | - | - | - | - | + |
| ORh39   |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh40   |                                                    | + | - | - | - | - | + |
| ORh41   |                                                    | - | - | + | - | - | + |
| ORh43   |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh44   | <i>Brucella pseudogrignonensis</i>                 | - | + | - | + | - | + |
| ORh45   | <i>Macrococcus caseolyticus</i>                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh46   | <i>Rhodococcus sovatis</i>                         | - | - | - | - | - | + |
| ORh47   |                                                    | - | - | - | - | - | + |
| ORh48   | <i>Rhizobium zeae</i>                              | - | - | - | - | - | + |
| ORh51   |                                                    | + | - | - | - | + | + |
| ORh52   | <i>Bacillus safensis</i>                           | + | - | - | - | - | + |

|         |                                                |   |   |   |   |   |   |
|---------|------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| ORh53   |                                                | - | - | - | - | - | + |
| ORh56   |                                                | - | - | - | - | - | + |
| ORh57   |                                                | + | - | - | - | - | + |
| ORh58   |                                                | + | - | + | - | + | + |
| ORh59   | <i>Bacillus</i> sp.                            | + | - | - | - | - | + |
| ORh60.2 | <i>Dietzia maris</i>                           | - | - | + | - | - | + |
| ORh61   | <i>Rhodococcus coprophilus</i>                 | - | - | - | - | - | + |
| ORh64   |                                                | + | - | + | - | - | + |
| ORh67   |                                                | + | - | + | + | - | + |
| ORh69   |                                                | - | - | - | + | + | + |
| ORh71   |                                                | - | + | - | - | - | + |
| ORh72   | <i>Bacillus australimaris</i>                  | - | - | - | + | - | + |
| ORh73   | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>      | - | - | - | - | + | + |
| ORh74   |                                                | - | - | - | + | + | + |
| ORh75   |                                                | - | - | - | + | - | + |
| ORh76   | <i>Bacillus zanthoxyli/Priestia aryabhatai</i> | + | - | - | + | - | + |
| ORh77   | <i>Pseudomonas arenae</i>                      | - | + | - | + | + | + |
| ORh80   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>            | - | - | + | + | - | + |
| ORh81   |                                                | + | + | - | - | + | + |
| ORh82   | <i>Bacillus</i> sp.                            | + | - | - | - | - | + |
| ORh83   |                                                | + | - | - | + | + | + |
| ORh85   |                                                | - | - | - | - | + | + |
| ORh86   |                                                | - | + | - | + | + | + |
| ORh87.1 |                                                | + | - | - | + | - | + |
| ORh87.2 |                                                | + | - | - | - | - | + |
| ORh88   |                                                | - | - | - | + | - | + |
| ORh89   |                                                | - | - | - | - | - | + |
| ORh90.1 |                                                | - | - | - | - | - | + |
| ORh90.2 |                                                | - | - | - | - | - | + |
| ORh91   |                                                | - | - | + | - | - | + |
| ORh92   | <i>Bacillus pumilus</i>                        | - | - | - | - | - | + |
| ORh93   | <i>Bacillus pumilus</i>                        | - | + | - | - | - | + |
| ORh100  | <i>Bacillus pumilus</i>                        | - | - | - | - | - | + |
| ORh242  | <i>Peribacillus simplex</i>                    | + | + | - | + | - | + |
| ORh244  | <i>Pseudomonas canavaninivorans</i>            | + | - | - | - | + | + |
| ORh247  | <i>Bacillus pumilus</i>                        | - | - | - | - | - | + |
| ORh250  | <i>Bacillus</i> sp.                            | - | - | - | - | - | + |
| ORh306  | <i>Peribacillus simplex</i>                    | - | - | - | - | + | + |

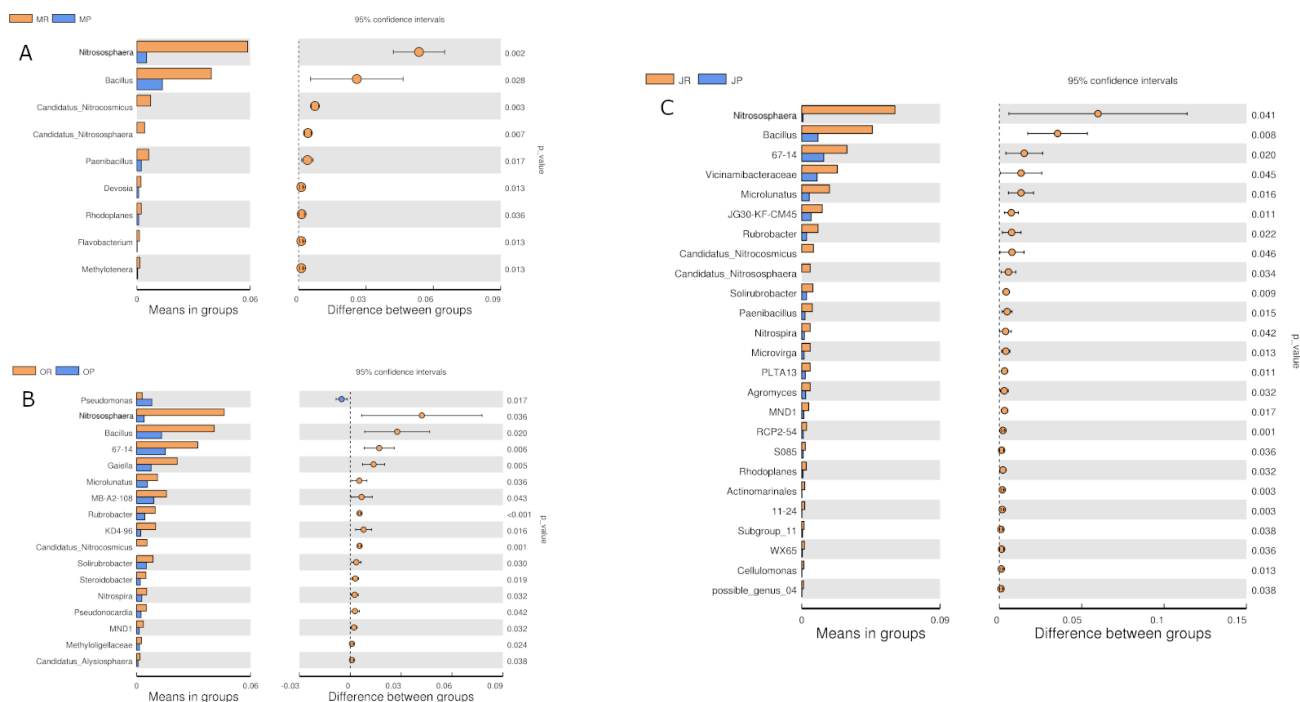
– nema aktivnosti, + pozitivna aktivnost



Prilog 2. Vrednosti indeksa alfa diverziteta (Observed species (A), Simpson (B), Shannon (C), ACE (D), Chao1 (E), PD whole tree (F) i Goods coverage (G)) u uzorcima rizosfere (R) i filofsfe (P) prikupljenim tokom maja (M), jula (J) i oktobra (O) (Preuzeto iz Krstić Tomić et al. (2023)).



Prilog 3. Poređenje zastupljenosti razdela u uzorcima rizosfere (R) i filofsfe (P) prikupljenim u maju (A), julu (B) i oktobru (C). Leva polovina svake fotografije prikazuje učestalost OTU koje pokazuju značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između grupa, pri čemu svaki stubić predstavlja srednju vrednost. Desna polovina slike prikazuje interval pouzdanosti varijacije između grupa. Levi deo svakog kruga predstavlja donju granicu intervala pouzdanosti od 95%, dok desni deo predstavlja gornju granicu. Centar kruga predstavlja razliku srednjih vrednosti. Boja kruga odgovara grupi sa većom srednjom vrednošću (Preuzeto iz Krstić Tomić et al. (2023)).



Prilog 4. Poređenje zastupljenosti rodova u uzorcima rizosfere (R) i filosfere (P) prikupljenim u maju (A), julu (B) i oktobru (C). Leva polovina svake fotografije prikazuje učestalost OTU koje pokazuju značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između grupa, pri čemu svaki stubić predstavlja srednju vrednost. Desna polovina slike prikazuje interval pouzdanosti varijacije između grupa. Levi deo svakog kruga predstavlja donju granicu intervala pouzdanosti od 95%, dok desni deo predstavlja gornju granicu. Centar kruga predstavlja razliku srednjih vrednosti. Boja kruga odgovara grupi sa većom srednjom vrednošću (Preuzeto iz Krstić Tomić et al. (2023)).

## Biografija autora

Tamara G. Krstić Tomić rođena je 16. oktobra 1996. godine u Nišu, Republika Srbija, gde je završila osnovno obrazovanje. 2015. godine. Nakon završetka Gimnazije „Svetozar Marković” 2015. godine, upisala je Osnovne akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, na Departmanu za biologiju i ekologiju, a završila je 2018. godine sa prosečnom ocenom 9,71. Iste godine upisala je Master akademske studije na Departmanu za biologiju i ekologiju, smer Biologija, a završila je 2020. godine sa prosečnom ocenom 10,0, odbranivši master rad pod nazivom „Efekat različitih koncentracija ulja konoplje na životni ciklus vrste *Drosophila melanogaster*”. Bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja za izuzetno nadarene učenike i studente tokom osnovnih i master studija, kao i dobitnica priznanja „Najbolji student akademskih studija” na studijskom programu Biologija. Od 2020. godine student je Doktorskih akademskih studija na Univerzitetu u Beogradu - Biološkom fakultetu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija, podmodul Molekularna mikrobiologija i biotehnologija. U periodu 2020/21-2022/23 školske godine, bila je stipendista Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija. Od 1. februara 2025. godine, zaposlena je najpre na poziciji istraživač-pripravnik, a potom i istraživač-saradnik u Institutu za voćarstvo, Čačak. Autor je i koautor 16 bibliografskih jedinica, koje uključuju naučne radove i saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima.

## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Тамара Г. Крстић Томић

Број индекса: М3004/2020

### Изјављујем

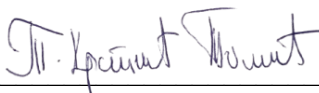
да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација сезонске промене микробиома шећерне репе и корелација са биоконтролним потенцијалом добијених изолата

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_



## Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Тамара Г. Крстић Томић

Број индекса: М3004/2020

Студијски програм: Молекуларна биологија

Наслов рада: Карактеризација сезонске промене микробиома шећерне репе и корелација са биоконтролним потенцијалом добијених изолата

Ментор: др Јелена Лозо

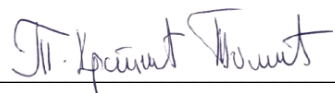
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  


### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација сезонске промене микробиома шећерне репе и корелација са биоконтролним потенцијалом добијених изолата

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

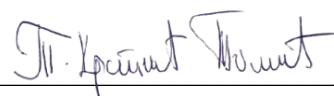
1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_



### Прилог 3.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.