

Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

32/19-5.1.

(Број захтева)

23.09.2020.

(Датум)

Веће научних области
биотехничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Врсте рода *Bacillus* са стимулативним деловањем на раст биљака и њихов потенцијал за
биолошку контролу *Botrytis cinerea* на парадајзу“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Фитомедицина

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

1. Васиљка, Недељко, Драгић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета,
студијски програм):

Универзитет у Новом
Саду

Пољопривредни факултет, Фитомедицина

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2016.

4. Година уписа на докторске студије: 2017/2018.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Пољопривредне науке, модул Фитомедицина

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: Милан Ивановић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације

1. Prokić, A., Zlatković, N., Kuzmanović, N., **Ivanović, M.**, Gašić, K., Pavlović, Ž, Obradović, A. (2020): Identification and characterization of *Dickeya zeae* strains associated with maize stalk soft-rot in northern Serbia. Eur. J. Plant Pathol. 157, 685-691.
2. **Ivanović, M.**, Kuzmanović, N., Gašić, K., Prokić, A., Zlatković, N., Obradović, A. (2019): Specificity and sensitivity of three PCR-based methods for detection of *Erwinia amylovora* in pure culture and plant material. Genetika 51 (3), 1039-1052.
3. Gašić, K., Kuzmanović N., **Ivanović M.**, Prokić A., Šević, M., Obradović, A. (2018): Complete genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* specific bacteriophage KΦ1, its survival and potential in control of pepper bacterial spot. Front. Microbiol. 9:2021.
4. Kuzmanović, N., Biondi, E., **Ivanović, M.**, Prokić, A., Zlatković, N., Bertaccini, A., Obradović, A. (2016): Evaluation of different PCR primers for identification of tumorigenic bacteria associated with grapevine crown gall. Journal of Plant Pathology 98 (2), 311-319.
5. **Ivanović, M.**, Obradović, A., Gašić, K., Minsavage, G. V. Dickstein, E. R. Jones, J. B. (2012): Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population in Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. Eur. J. Plant Pathol. 133 (3), 545-557.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 23.09.2020. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Душан Живковић

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/19-5.1.
Датум: 23.09.2020. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 51. и 52. Правилника о правилима докторских академских студија и члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 23.09.2020. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ тема докторске дисертације коју је поднела **ВАСИЉКА ДРАГИЋ, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«ВРСТЕ РОДА *Bacillus* СА СТИМУЛАТИВНИМ ДЕЛОВАЊЕМ НА РАСТ БИЉАКА И ЊИХОВ ПОТЕНЦИЈАЛ ЗА БИОЛОШКУ КОНТРОЛУ *Botrytis cinerea* НА ПАРАДАЈЗУ»**.

II За ментора се именује др Милан Ивановић, ванредни професор.

III На одлуку о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора сагласност даје одговарајуће Веће научних области Универзитета у Београду.

Образложење

Наставно-научно веће факултета разматрало је и усвојило Извештај о позитивној оцени научне заснованости теме докторске дисертације коју је поднела Васиљка Драгић, мастер.

Наставно-научно веће факултета је приликом доношења одлуке оцењивало да ли је реч о оригиналној идеји и да ли је тема од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Сходно изнетом одлучено је као у диспозитиву.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број:
Дана 07.08.2020. године
Београд - Земун

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Васиљке Драгић, мастер инж. пољопривреде

На основу члана 44. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог одговарајућег већа катедре и мишљења одговарајућег наставно-научног већа института, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 22.07.2020. године донело је одлуку бр. 32/18-3.3. да се образује Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Васиљке Драгић** под насловом:

„Изолација и карактеризација *Bacillus* spp. са стимулативним деловањем на раст биљака и њихов потенцијал за биолошку контролу болести листа и плода парадајза“

Кандидат је дана 31.07.2020. године одбранила пријављену тему докторске дисертације, а потписан записник предат је у Студентску службу истог дана. На основу усаглашених мишљења свих чланова комисије председник Комисије др Александра Булајић, редовни професор (Одлука број: 21/9-1 од 31.07.2020. године) подноси:

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

1.1 Биографија кандидата

Мастер инж. пољопривреде Васиљка Драгић рођена је 05.05.1992. године у Зеници, Босна и Херцеговина. Основну школу „Јован Дучић“ у Бијељини завршила је 2007. године, а гимназију „Филип Вишњић“ у Бијељини 2011. године. Основне академске студије на Пољопривредном факултету Универзитета у Новом Саду, студијски програм Фитомедицина, уписала је 2011. године. Током друге године студија била је стипендиста Минастарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. У периоду од јуна 2014. године до априла 2016. године волонтирала је на Пољопривредном факултету Универзитета у Новом Саду, у Лабораторији за фитопатологију код проф. др Стевана Маширевића, обучавајући се у раду са колекцијом фитопатогених гљива и анализом узорака на присуство патогена. У октобру 2015. године завршава основне академске студије на Пољопривредном факултету Универзитета у Новом Саду са просечном оценом 8,81 одбравивши дипломски рад под насловом: „Микопопулација семена грашка током 2014. године“, оценом 10 (десет). Мастер академске студије на Пољопривредном факултету Универзитета у Новом Саду, студијски програм Фитомедицина, уписала је школске 2015/2016. године, а у новембру

2016. године одбранила је мастер рад под насловом: „Могућност сузбијања значајних проуроковача болести применом биопестицида“, оценом 10 (десет). Од 01.04.2016. до 01.04.2017. године радила је у Институту за ратарство и повртарство Нови Сад, Одељење за крмно биље, у оквиру Јавног позива града Новог Сада за обављање Стручне праксе. Од 02.04.2017. до 02.04.2018. године била је запослена у Институту за ратарство и повртарство Нови Сад, Одељење за Крмно биље, као стручни сарадник на пословима оплемењивања. Од 03.04.2018. до 03.04.2019. године била је ангажована у лабораторијским пословима Одсека за микробиолошке препарате Института за ратарство и повртарство Нови Сад, где је од априла 2019. године наставила ангажман на изради експерименталног дела Докторске дисертације. Докторске академске студије, модул Фитомедицина, уписала је школске 2017/2018, на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду. У звање истраживач-приправник изабрана је 02.08.2019. године у Институту за заштиту биља и животну средину. Укупно је објавила или саопштила четири научна рада. Говори енглески језик.

1.2 Предлог теме докторске дисертације

Предложена тема докторске дисертације **„Изолација и карактеризација *Bacillus* spp. са стимулативним деловањем на раст биљака и њихов потенцијал за биолошку контролу болести листа и плода парадајза“** не одражава јасно предвиђене циљеве, програм и предмет истраживања због чега Комисија предлаже да се наслов предложене теме промени у следећи наслов: **„Врсте рода *Bacillus* са стимулативним деловањем на раст биљака и њихов потенцијал за биолошку контролу *Botrytis cinerea* на парадајзу“** који више одговара предложеном програму истраживања и пружа јасну слику шта ће бити спроведено и шта треба очекивати од истраживања која ће бити обављена.

2. Предмет и циљ дисертације

2.1 Предмет и програм истраживања

Болести биљака проузроковане патогеним микроорганизмима могу довести до смањења приноса и раста биљака, квалитета пољопривредних производа, изазивајући често и угинуће биљака. Agrios (2004) процењује да годишњи губици проузроковани биљним патогенима у свету износе 220 милијарди долара. Осим позитивних ефеката у сузбијању економски значајних организама, употреба хемијских супстанци у заштити биља има и низ негативних последица. Употреба хемикалија је довела до загађења површинских и подземних вода, деградације квалитета земљишта и негативног утицаја на нециљане организме. Прекомерна употреба пестицида последица је не само повећаног обима биљне производње, већ и временом стечене резистентности патогена према активним материјама пестицида. Ова појава последично доводи до потребе за применом пестицида у све већим количинама како би се постигло ефикасно сузбијање и спречили губици у приносу и квалитету. Из ових разлога јавља се потреба за развојем алтернативних мера сузбијања штетних организама укључујући употребу биолошких агенаса, промене у технологији гајења биљака или генетичких модификација биљака.

Проузроковач сиве трулежи *Botrytis cinerea* Pers. (телеоморф *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel) економски је значајан патоген парадајза (Williamson et al., 2007). Осим на парадајзу изазива значајне штете у производњи више од 200 биљних врста (Williamson et al., 2007), а распрострањен је свуда где се гаје биљке домаћини - од хладних зона Аласке до топлих и сувих подручја у Израелу (Yunis and Elad, 1989). Патоген је нарочито деструктиван на сазрелим биљним деловима или на ткиву које

физиолошки стари, мада се инфекција обично остварује у ранијим фенофазама. После остварења инфекције биљни делови без видљивих симптома остају латентно заражени дужи временски период. При повољним временским условима и након физиолошких промена ткива домаћина (сазревање, промена хемијског састава) долази до убрзане деструкције и труљења заражених биљних делова, тако да код ускладиштених плодова без симптома губици постају евидентни тек након њиховог транспорта (Williamson et al., 2007). Сива трулеж може узроковати велике губитке и на биљкама у току вегетације, како у пољу, стакленицима, тако и након складиштења (Chardonnet et al., 2000; Staats et al., 2005; Williamson et al., 2007; Tanović and Ivanović, 2010).

Сузбијање *B. cinerea* у производњи парадајза, нарочито у заштићеном простору, није једноставно. Ова гљива има велики број домаћина који могу представљати извор инокулума, има различите механизме деловања на биљку, развија се и као сапрофит у мртвом биљном ткиву, може преживети у виду мицелије или конидија, а дужи временски период у форми склероција у биљним остацима. Из ових разлога употреба било које појединачне мере контроле не даје добре резултате (Williamson et al., 2007). Превентивне мере спречавања појаве сиве трулежи обухватају регулисање температуре и влажности ваздуха и земљишта у објектима заштићеног простора, спречавање оштећења на биљкама, избалансирану прихрану, као и дезинфекцију супстрата при производњи расада. Хемијско сузбијање ослања се на употребу фунгицида, а у нашој земљи до сада је регистровано пет фунгицида за сузбијање *B. cinerea* у парадајзу (Петровић и Секулић, 2017). Међутим, у свету је регистрована резистентност на неке од активних материја које улазе у састав регистрованих фунгицида за сузбијање *B. cinerea* у нашој земљи као што је хлороталонил (Barak and Edgington, 1984), ципродинил и пириметанил (Fernández-Ortuño et al., 2012) и ипродион (Grabke et al., 2014). Ово указује на потребу изналагања алтернативних мера контроле *B. cinerea*. У прилог овоме говори и податак да, иако је реч о економски значајном патогену, у Србији нема биолошких препарата за сузбијање *B. cinerea* на парадајзу. С друге стране, постоје биолошки препарати на бази *Bacillus* spp. који су регистровани за сузбијање неких других фитопатогених гљива на парадајзу, као што је проузроковач црне пегавости (*Alternaria solani*) и пламењаче (*Phytophthora capsici*) парадајза (Петровић и Секулић, 2017). Међутим, нема података о утицају ових препарата на клијавост и морфолошке параметре пораста клијанаца парадајза. Све ово указује на потребу проучавања врста рода *Bacillus* као најраспрострањенијих бактерија у ризосфери и могућност њихове употребе у биолошкој контроли проузроковача сиве трулежи парадајза, али и као стимулатора раста биљака парадајза.

Истраживања иностраних аутора показују да се врсте рода *Bacillus* могу користити као промотори или стимулатори раста биљака. Kokalis-Burelle et al. (2002) утврдили су статистички значајно повећање раста парадајза у току две вегетационе године, инокулацијом са *B. amyloliquefaciens*. У њиховим огледима повећана је површина листова, број листова, као и тежина корена и стабла. Према наводима Xu et al., (2016) *Bacillus* сојеви SG08-09 и SG09-12 изоловани из земљишта, стимулисали су раст биљака парадајза од 10 до 42% и смањили интензитет болести проузроковане сивом трулежи за 66%. У огледима у стакленику који су спровели Ge et al., (2016) применом соја NKG – 1 (*Bacillus methylotrophicus*) знатно је повећана свежа маса биљака парадајза (27,4%), дужина надземног дела (12,5%) и дужина корена (57,7%) у поређењу са контролом. Применом истог соја у пољу, запажен је пораст висине биљака парадајза (14,7%), пречник стабљике (12,7%) и пречник плода (11,5%). Применом соја *Bacillus subtilis* CBR05 у пластенику укупан садржај фенола и флавоноида у плодовима парадајза је повећан. Такође, инокулацијом биљака парадајза поменути сојем знатно

је повећана антиоксидативна активност и ниво садржаја каретеноида (Chandrasekaran et al., 2019).

Истраживања такође указују да, осим као стимулатори раста, врсте рода *Bacillus* испољавају антифунгално деловање и могу се користити као биолошки агенси у сузбијању проузроковача одређених биљних болести. Сој *B. subtilis* QST713 продукује липопептиде који испољавају фунгицидни ефекат, а примењује се за третирање семена памука, легуминоза и других врста у контроли *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. Такође се примењује и фолијарно у контроли *B. cinerea* на плавом патлићану и парадајзу (Tomlin, 2006). Сој *B. subtilis* изолован са површине агрума био је ефикасан у контроли зелене и плаве плесни цитруса изазване *Penicillium digitatum* и *P. italicum* (Obagwu and Korsten, 2003), док је *B. licheniformis* испољио ефикасност у борби против сиве трулежи парадајза изазваном *B. cinerea* (Lee et al., 2006). Сој *B. subtilis* WXCDD105, из ризосфере парадајза, показао је значајну ефикасност у контроли *B. cinerea* и *Passalora fulva* (*Cladosporium fulvum*) (проузроковач плесивости листа парадајза) (Wang et al., 2018). У испитивањима Kefi et al., (2015) сој BL1 (*Bacillus mojavensis*), BT5 (*Brevibacterium halotolerans*), BR8 (*B. subtilis*) и BF11 (*B. amyloliquefaciens*) показали су значајан ефекат у сузбијању сиве трулежи парадајза са инхибицијом раста патогена од 27% до 53%.

Под појмом биолошки агенси који се користе за сузбијање патогена подразумевају се живи организми или природни продукти њиховог метаболизма (U.S. Environmental Protection Agency, EPA, 2016) и могу се поделити у четири основне групе: микроорганизми (микробиолошки пестициди), други организми (нематодe, инсекти итд.), природне супстанце добијене из живих организама (биохемијски пестициди) и генетички модификоване биљке (Thakore, 2006; U.S. Environmental Protection Agency, EPA, 2016). Биолошки агенси нашли су примену у органској производњи и у оквиру интегрисаних мера заштите разних врста житарица, махунарки, повртарских и воћарских врста, индустријског биља и цвећа узрокованих земљишним, фолијарним и постжетвеним патогенима (Ryan et al., 2009). Предност биолошких агенаса у односу на хемијске производе је брже разлагање у спољашњој средини и мања токсичност према нециљаним организмима (Thakore, 2006; Sawoy et al., 2011). Они се могу примењивати самостално или у комбинацији са конвенционалним пестицидима као део антирезистентне стратегије у циљу смањења појаве резистентних патогена. Једна од предности биолошких агенаса је разноврсност њихових начина деловања. Њихово дејство може бити засновано на конкуренцији за хранљиве састојке и простор, антибиози и имунизацији биљке домаћина. У поређењу са природним екстрактима, микроорганизми као биолошки агенси имају предност у погледу дужине активности јер могу успоставити раст у фитосфери и континуирано стварати биоактивна једињења *in situ* (Sawoy et al., 2011). Њихови продукти могу имати и друге позитивне ефекте на биљке подстицањем раста (биостимулатори) (Antoun and Prevost, 2006; Choudhary and Johri, 2009). Биостимулатори су важан фактор у контексту сталне потребе да се произведе више хране на истим или мањим површинама са истовременом жељом да се смањи употреба минералних ђубрива (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Микроорганизми који поседују комбинацију активности у смислу промоције раста биљака и биолошке контроле патогена имају предност у проучавању и примени биолошких агенаса и биостимулатора у пољопривредној производњи.

Род *Bacillus* показује велику таксономску и метаболичку разноврсност и један је од најчешће коришћених родова бактерија у биолошкој контроли. Први пут је описан 1872. године (Cohn, 1872, loc. cit. Mora Pons, 2013). Представници овог рода су Грам-позитивни, покретни, аеробни или факултативно анаеробни микроорганизми штапићастог облика ћелије, величине 0,5-2,5 μm $\times$ 1,2-10 μm . (Zeigler and Perkins, 2009).

У неповољним условима за раст, одликује их способност продукције дормантних ендоспора, које могу да преживе високе температуре, неповољне рН вредности, недостатак хране и воде (Piggot and Hilbert, 2004). Ендоспоре могу бити централне или терминалне позиције у ћелији, док се саме ћелије појављују појединачно, у паровима или ланцима различите дужине. Врсте рода *Bacillus* су доминантне бактерије у земљишту и ризосфери биљака. Бројност бактерија овог рода варира од 10^6 ћелија по граму у хладнијим до преко 10^8 ћелија по граму земљишта у топлијим пределима (Alexander, 1977). Само три врсте овог рода су патогене, а бројни представници овог рода испољавају позитиван ефекат на раст и принос биљака путем различитих механизма деловања. Механизми деловања *Bacillus* spp. могу бити директни или индиректни, повећањем садржаја хранљивих састојака у ризосфери или сузбијањем фитопатогених микроорганизама. Примарни механизми биоконтроле фитопатогених микроорганизама укључују конкуренцију за хранљиве састојке и простор, антибиозу и индукцију систематске отпорности код биљака (енг: Induced Systemic Resistance, ISR) (Pinchuk et al., 2002; Choudhary and Johri., 2009; Wang et al., 2009). Други механизми биолошке контроле биљних патогена обухватају продукцију ензима, сидерофора и деградацију токсина које продукују патогени (Pessi and Haas, 2000).

Представници рода *Bacillus* изоловани су из широког спектра природних окружења, укључујући биљке и земљиште (Kunst et al., 1997; Stanković et al., 2007), хидротермалне изворе, екстремна окружења, мора (Siefert et al., 2000), као и плитке водене олиготрофне средине (Alcaraz et al., 2008). Род *Bacillus* карактерише фенотипска и генотипска хетерогеност (Slepecky and Hemphill, 2006), испољавајући различита биохемијско-физиолошка својства, попут способности да разлажу различите супstrate биљног и животињског порекла, укључујући целулозу, скроб, протеине и угљоводонике (Zeigler and Perkins, 2009).

Ове бактерије су релативно једноставне за индустријску производњу пошто немају велике нутритивне захтеве. Неке врсте попут *B. subtilis* поседују неколико одлика које им омогућавају и олакшавају преживљавање у ризосфери, а једна од њих је могућност факултативног анаеробног раста у срединама са ниском концентрацијом кисеоника (Nakano and Hullet, 1997). То представља предност у њиховој потенцијалној примени јер концентрација кисеоника може варирати у зависности од временских услова. Још један од разлога велике заинтересованости за род *Bacillus* је разноликост у њиховом начину деловања. Они могу да испоље готово све механизме биоконтроле и биостимулације (Cawoy et al., 2011). Често један сој може деловати кроз неколико механизма биоконтроле. Ово омогућава бактеријама рода *Bacillus* већу ефикасност према различитим патогенима, биљним домаћинима и спољашњим условима, где један механизам може деловати уместо другог. Међутим, у последње време због повећаног еколошког интереса огроман број истраживања је посвећен и другим врстама из рода *Bacillus* у контроли обољења различитих биљака домаћина. Осим *B. subtilis* у употреби су и друге врсте овог рода попут: *B. pumilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и других (Cawoy et al., 2011). Из тог разлога примена антагонистичких бактерија *Bacillus* spp. у биолошкој контроли, како у органској, тако и у конвенционалној пољопривреди, представља нови, еколошки безбеднији и економски исплатив приступ којим би се смањила употреба хемијских супстанци и побољшао квалитет пољопривредних производа (Lazarovits et al., 2014).

Програмом истраживања ове дисертације биће обухваћено:

- Прикупљање узорака земљишта различитих пољопривредних култура из већег броја локалитета у Србији у циљу изолације врста рода *Bacillus*;

- Идентификација одабраних сојева *Bacillus* spp. испитивањем морфолошких, биохемијско-физиолошких и одгајивачких одлика, као и молекуларним методама секвенцирањем 16S rDNK дела генома;
- Изолација *B. cinerea* из плодова и листова парадајза;
- Провера патогености изолата *B. cinerea* и њихова карактеризација проучавањем макроскопских, микроскопских и одгајивачких одлика;
- Молекуларна идентификација и карактеризација изолата *B. cinerea* секвенцирањем ITS rDNK региона;
- Карактеризација и селекција изолата *Bacillus* spp. као потенцијалних стимулатора биљног раста и њихов утицај на клијавост семена и морфолошке параметре клијанаца парадајза;
- Селекција изолата *Bacillus* spp. као потенцијалног агенса за биолошку контролу проузроковача сиве трулежи парадајза и њихова примена у контролисаним условима у биолошкој контроли проузроковача сиве трулежи на листовима и плодовима парадајза.

2.2 Научни циљ истраживања

Циљ истраживања је изолација и селекција *Bacillus* врста са стимулативним деловањем на раст биљака парадајза и испитивање њиховог потенцијала у биолошкој контроли проузроковача сиве трулежи парадајза. Имајући у виду негативан утицај фунгицида на животну средину и нециљане микроорганизме, као и њихову смањену ефикасност услед развоја резистентности, циљ је да се пронађе алтернативно и еколошки прихватљиво решење за сузбијање проузроковача сиве трулежи. Такође, циљ је да се обједини вишеструко позитивно дејство које врсте рода *Bacillus* имају на биљку, подстицањем пораста парадајза и антифунгалним деловањем на патогена. Значај истраживања огледа се и у томе што би се неки од сојева *Bacillus* који ће бити изоловани током ове дисертације могли испитивати и користити на другим биљним врстама осетљивим на заразу *B. cinerea* као што су малина, купина, јагода, винова лоза и друге. Селекција изолата *Bacillus* spp. и њихова примена у биолошкој контроли проузроковача сиве трулежи треба да пружи одговор на смањену ефикасност појединих фунгицида у заштити парадајза. Израда ове дисертације даће прецизнији одговор које врсте рода *Bacillus* са позитивним ефектом на раст биљака парадајза су присутне у нашим агроеколошким условима, али и допринос у проналаску еколошки прихватљивог сузбијања сиве трулежи у производњи парадајза.

3. Основне хипотезе од којих се полази у истраживању

Предложена истраживања полазе од следећих претпоставки:

- Постојање диверзитета врста рода *Bacillus* у ризосфери различитих пољопривредних култура.
- Сојеви *Bacillus* spp. изоловани из земљишта могу имати позитиван утицај на клијавост семена, раст и развој биљака парадајза.
- Сојеви *Bacillus* spp. изоловани из земљишта који позитивно утичу на раст биљака парадајза могу испољити антифунгалну активност према проузроковачу сиве трулежи парадајза *B. cinerea* у *in vitro* условима.

- Применом изолованих сојева *Bacillus* spp. може се смањити интензитет заразе листова и плодова парадајза инокулисаних *B. cinerea* у контролисаним условима.

4. Методе које ће се применити у истраживањима

4.1 Прикупљање узорака ризосферног земљишта

Узорци за изолацију *Bacillus* spp. биће прикупљени са већег броја локалитета и из различитих ратарских, повртарских, воћних биљних врста у Србији и обухватиће ризосферно земљиште са кореном биљака. Након узорковања, сви узорци биће смештени у полиетиленске кесе ради заштите од прекомерног исушивања приликом транспорта и чувани при 4 °C до момента изолације (Barillot et al., 2012).

4.2 Анализа основних хемијских својстава земљишта

За анализу основних хемијских својстава земљишта, у циљу испитивања свих нивоа хранљивих састојака у земљишту, са свих локалитета одредиће се: активна киселост у води и у KCl (супституциона киселост), слободни калцијум карбонат (CaCO₃) волуметријском методом помоћу Scheibler-овог калциметра, садржај хумуса оксидацијом органске материје, укупног азота микроелементалном анализом, лакоприступачног фосфора спектрофотометријски и лакоприступачног калијума пламенфотометријски, користећи стандардне методе испитивања (Хацић и сар., 2004).

4.3 Изолација бактерија и добијање чистих култура *Bacillus* spp.

Изолација бактерија из ризосферног земљишта биће извршена методама разређења и исцрпљивања (Collins and Lyne, 1984). Након припреме серије децималних разређења (10⁻⁴ - 10⁻⁶) суспензије земљишта одговарајућег разређења биће засејане у Петри посуде са претходно разливеним стерилним месопептонским агаром (МРА). Након 48 h инкубације при температури од 30°C, колоније које изгледом подсећају на колоније *Bacillus* spp. биће издвојене и неколико пута рекултивисане на истој подлози како би се добиле чисте културе.

4.4 Морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке одлике изолата *Bacillus* spp.

Од морфолошких одлика изолата биће проучен облик, бојење по Граму и присуство ендоспора. Од одгајивачких одлика проучиће се пораст при 45°C, pH 8 и 7% NaCl, као и покретљивост. Биохемијско-физиолошка карактеризација обухватиће: активност каталазе, хидролиза желатина, способност коришћења цитрата и редукција нитрата (Vos et al., 2009; Chun and Vidaver, 2001).

4.5 Молекуларна идентификација одабраних изолата *Bacillus* spp.

Молекуларна идентификација одабраних изолата *Bacillus* spp. биће извршена помоћу методе ланчане реакције полимеразе (енг. Polymerase Chain Reaction, PCR). Након изолације ДНК бактерија применом комерцијалног кита Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Немачка), за идентификацију изолата користиће се 16S rDNA секвенца која ће бити умножена применом прајмера 27F (fD1) и 1492R (rP3) (Weisburg et al., 1991). Пречишћавање и секвенцирање PCR производа биће урађено у Macrogen Inc., Сеул, Јужна Кореја. Добијене секвенце гена биће обрађене у програму FinchTV Version

1.4.0. (<http://www.geospiza.com>) и депоноване у NCBI (National Center for Biotechnology Information) банку гена.

4.6 Изолација и карактеризација *Botrytis cinerea* - проузроковача сиве трулежи

Изолација *B. cinerea* биће извршена на PDA подлогу из листова и плодова парадајза са симптомима сиве трулежи коришћењем стандардних миколошких метода. Након добијања моноспоријалних изолата испитаће се патогеност на вештачки инокулисаним плодовима и листовима парадајза. Од макроскопских морфолошких одлика биће проучен изглед колонија, боја, обод, спорулација и просечни дневни пораст колонија на PDA. Микроскопске морфолошке одлике обухватиће испитивање облика и величине конидија (Ellis, 1971; Tanović et al., 2011.)

4.7 Молекуларна идентификација изолата *Botrytis cinerea*

Осим методама конвекционалне идентификације, одабрани изолати *B. cinerea* биће идентификовани секвенцирањем ITS rDNK региона. Изолација ДНК изолата биће извршена коришћењем комерцијалног кита Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Хилден, Немачка). Умножавање специфичних делова биће извршено коришћењем ITS1F (Gardes and Bruns, 1993) и ITS4 (White et al., 1990) прајмера након чега ће се извршити пречишћавање и секвенцирање PCR продуката у Macrogen Europe, (Амстердам, Холандија) истим прајмерима који су коришћени за умножавање. Добијене секвенце биће обрађене помоћу програма ClustalW (Thompson et al. 1994) и Mega 6.0 (Tamura et al., 2013) и депоноване у GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) банку гена. Идентификација ће бити извршена упоређивањем добијених секвенци са доступним секвенцама изолата *B. cinerea* у банци гена коришћењем BLAST анализе (енг. Basic Local Alignment Search Tool).

4.8 Карактеризација изолата *Bacillus* spp. као потенцијалних стимулатора биљног раста

Карактеризација изолата као потенцијалних стимулатора биљног раста обавиће се проучавањем PGP одлика (енг. Plant Growth Promotion) изолата обухватиће одређивање способности продукције индол – 3 – сирћетне киселине (IAA), растварања неорганских једињења фосфора (P – солубилизација). За квантитативну анализу продукције IAA користиће се течна подлога (MPB) са додатком 250 и 500 µg ml⁻¹ L – триптофана (прекурсор IAA) (Glickman and Dessaux, 1995). Способност бактерија да растварају неорганске фосфате биће испитана на PVK подлози (Pikovskaya, 1948) са додатком 0,5% трикалцијум фосфата Ca₃(PO₄)₂.

4.9 Утицај одабраних изолата *Bacillus* spp. на клијавост семена и морфолошке параметре клијанаца парадајза

Утицај инокулације одабраних изолата *Bacillus* spp. у стимулацији биљног раста у лабораторијским условима испитаће се на клијавост семена, као и морфолошке параметре клијанаца парадајза. Испитивање утицаја антагонистичких бактерија рода *Bacillus* на клијавост семена парадајза извршиће се стандардним тестом клијавости (ISTA, 2016). У огледу користиће се сорта парадајза Новосадски јабучар, селекционисани у Одељењу за повртарство, Института за ратарство и повртарство Нови Сад. Тест ће бити изведен наклијавањем 100 семена у четири понављања. Очитавања енергије клијавости и клијавости семена парадајза вршиће се 7 и 14 дана након инокулације. Након оцене клијавости, из сваког понављања, случајним избором

издвојиће се по 10 поника и мерити дужина надземног дела и корена (цм), као и свежа и сува маса надземног дела и корена (г). Резултати ће бити обрађени користећи стандардне статистичке методе, анализа варијансе и Tukey тест.

4.10 Селекција изолата *Bacillus* spp. за биолошку контролу проузроковача сиве трулежи парадајза *B. cinerea*

Селекција изолата ће се извршити кроз испитивање антифунгалне активности изолованих сојева *Bacillus* spp. према изолатима *B. cinerea* добијених током израде ове докторске дисертације методом двојне култивације. Метода се заснива на гајењу култура фитопатогених гљива са одговарајућим антагонистом у истој Петри посуди (Ху et al., 2016). У истраживањима ће бити коришћени изолати добијени током израде ове дисертације као и изолати из Колекције фитопатогених гљива Катедре за фитопатологију, Института за фитомедицину, Пољопривредног факултета-Универзитета у Београду. Након 7 дана инкубације детектоваће се антифунгална активност, мерењем радијуса колоније гљиве у правцу бактеријске колоније и радијуса колоније гљиве у контролној посуди. Проценат инхибиције раста (PGI) израчунаће се помоћу формуле: $PGI (\%) = \frac{KR - R1}{KR} \times 100$, где KR представља удаљеност (мм) од тачке инокулације до маргине колоније у контролама, а R1 раздаљину фунгалног раста од тачке инокулације до маргине колоније у правцу антагониста у двојним културама. Тест ће се радити у три понављања. За обраду резултата користиће се стандардне статистичке методе, анализа варијансе и Tukey тест.

4.11 Примена *Bacillus* spp. у биолошкој контроли проузроковача сиве трулежи парадајза

Примена *Bacillus* spp. у заштити парадајза од проузроковача сиве трулежи у контролисаним условима биће испитана на основу модификоване методе Ge et al., (2016). Листови и плодови парадајза одвојени од биљака биће инокулисани одабраним сојевима *Bacillus* spp. и постављени на филтер папир. Након површинске дезинфекције и сушења листова и плодова, мицелијарни дискови *B. cinerea*, старости пет дана, биће постављени у близини лисних нерава или на повређену кокожицу плода парадајза. Као контролна варијанта користиће се листови и плодови парадајза инокулисани *B. cinerea* који претходно нису инокулисани сојевима *Bacillus* spp. Листови и плодови парадајза одржаваће се при 25°C, током 7 дана. Пречник лезије формиране на листовима и плодовима мериће се према скали Lee et al., (2006), где 0 представља (нема видљивих симптома), 1 (0,1 - 5 %), 2 (5,1 - 20%), 3 (20,1 - 40%) и 4 (40,1 - 100%). Оглед ће бити постављен по случајном блок систему са четири понављања. За обраду резултата користиће се стандардне статистичке методе, анализа варијансе и Fisher-ов тест.

5. Очекивани резултати и научни допринос

Сазнања о пропратним негативним ефектима примене хемијских средстава у пољопривреди повећала су интерес за изучавање корисних ризосферних микроорганизама и њиховој примени у пољопривреди. Очекује се да ће истраживања у оквиру ове докторске дисертације дати одговор о распрострањању и диверзитету представника рода *Bacillus* у ризосфери различитих пољопривредних култура у нашој земљи. Проучавање PGP одлика указаће на механизам деловања ових микроорганизама на пораст биљака, док ће инокулација семена парадајза дати одговоре о могућности коришћења различитих врста рода *Bacillus* као стимулатора раста биљака. Очекује се да

ће током израде ове докторске дисертације бити изоловани сојеви *Bacillus* spp. који, осим позитивног утицаја на пораст биљака парадајза, имају и антифунгално деловање на проузроковача сиве трулежи парадајза *B. cinerea*, што ће представљати значајан допринос овој мало проученој области у свету. Огледи у контролисаним условима даће одговор на могућност коришћења изолованих сојева *Bacillus* spp. у биолошкој контроли сиве трулежи на листовима и плодовима парадајза. Ово су прва истраживања у нашој земљи у којима ће врсте рода *Bacillus* бити коришћене за биолошку контролу *B. cinerea* на парадајзу. Очекује се са добијени резултати буду основа за стварање нових биолошких препарата који ће имати двојаку улогу: као стимулатори раста биљака и као биолошки агенси у сузбијању одређених болести, што поред научног значаја има и велику практичну перспективу. Добијени резултати могу унапредити програм заштите парадајза и пронаћи примену како у конвенционалној тако и у органској производњи. Значај истраживања дисертације огледа се и у стварању колекције сојева *Bacillus* spp. који би се у будућности могли испитивати и применити на другим биљним врстама за сузбијање проузроковача сиве трулежи, као веома распрострањеног и штетног патогена са великим кругом биљака домаћина.

6. Закључак

На основу анализе поднете пријаве теме докторске дисертације, одржане јавне одбране научне заснованости теме, предложеног програма и очекиваних резултата докторске дисертације кандидата Васиљке Драгић, мастер инжењера пољопривреде, под насловом: **„Изолација и карактеризација *Bacillus* spp. са стимулативним деловањем на раст биљака и њихов потенцијал за биолошку контролу болести листа и плода парадајза“**, Комисија сматра да предложена тема не одражава јасно предвиђене циљеве, програм и предмет истраживања због чега Комисија предлаже да се наслов предложене теме промени у следећи наслов: **„Врсте рода *Bacillus* са стимулативним деловањем на раст биљака и њихов потенцијал за биолошку контролу *Botrytis cinerea* на парадајзу“**. Комисија сматра да измењени наслов пружа јасну слику шта ће бити спроведено и шта треба очекивати од истраживања која ће бити обављена.

Хипотезе од којих кандидат полази, као и циљ рада, правилно су постављени, а предложене методе су одговарајуће, савремене и у потпуности омогућавају реализацију постављених задатака. Предложени програм представља комплетну и заокружену целину која ће пружити значајан научни допринос у области фитопатологије.

Вишегодишњим истраживањима ће бити обухваћена изолација представника рода *Bacillus* из ризосфере већег броја пољопривредних култура и њихова карактеризација као потенцијалних стимулатора биљног раста, као и проучавање њихове антифунгалне активности и могућности коришћења у биолошкој контроли проузроковача сиве трулежи парадајза.

Полазећи од свега наведеног, Комисија позитивно оцењује поднету пријаву и научну заснованост ове дисертације и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати и одобри израду докторске дисертације кандидата Васиљке Драгић, под измењеним насловом **„Врсте рода *Bacillus* са стимулативним деловањем на раст биљака и њихов потенцијал за биолошку контролу *Botrytis cinerea* на парадајзу“**.

Тема докторске дисертације је из уже научне области Фитопатологија.

Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже др Милана Ивановића, ванредног професора Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

7. Име и референце предложеног ментора

Име и презиме ментора: **др Милан Ивановић**

Звање: **ванредни професор**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Prokić, A., Zlatković, N., Kuzmanović, N., **Ivanović, M.**, Gašić, K., Pavlović, Ž, Obradović, A. (2020): Identification and characterization of *Dickeya zeae* strains associated with maize stalk soft-rot in northern Serbia. Eur. J. Plant Pathol. 157, 685-691.
2. **Ivanović, M.**, Kuzmanović, N., Gašić, K., Prokić, A., Zlatković, N., Obradović, A. (2019): Specificity and sensitivity of three PCR-based methods for detection of *Erwinia amylovora* in pure culture and plant material. Genetika 51 (3), 1039-1052.
3. Gašić, K., Kuzmanović N., **Ivanović M.**, Prokić A., Šević, M., Obradović, A. (2018): Complete genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* specific bacteriophage KΦ1, its survival and potential in control of pepper bacterial spot. Front. Microbiol. 9:2021.
4. Kuzmanović, N., Biondi, E., **Ivanović, M.**, Prokić, A., Zlatković, N., Bertaccini, A., Obradović, A. (2016): Evaluation of different PCR primers for identification of tumorigenic bacteria associated with grapevine crown gall. Journal of Plant Pathology 98 (2), 311-319.
5. **Ivanović, M.**, Obradović, A., Gašić, K., Minsavage, G. V. Dickstein, E. R. Jones, J. B. (2012): Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population in Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. Eur. J. Plant Pathol. 133 (3), 545-557.

Београд-Земун
Дана 07.08.2020. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. др Милан Ивановић, ванредни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Фитопатологија)

2. др Александра Булајић, редовни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Фитопатологија)

3. др Јелена Маринковић, виши научни сарадник
Институт за ратарство и повртарство Нови Сад
(ужа научна дисциплина: Микробиологија)

Прилози:

Прилог 1 - Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидата;

Прилог 2 - Списак литературе која ће се користити;

Прилог 1 - Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидата Васиљке Драгић

Рад у часопису од националног значаја (М 52 = 1,5)

Драгић, В., Маширевић, С., Коцић-Танацков, С., Шкрињар, М., Фелдежди, М., Влајић, С. (2016): Прва појава *Paecilomyces niveus* (Stolk & Samson 1971) на грашку у нашој Земљи, Билни лекар 44 (2): 175-179.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (М 34 = 0,5)

Dragić, V., Maširević, S., Ilić, R., Vlajić, S., Stošić, N. (2017): Possibility of application *Bacillus subtilis* C13 and D26 in control of some fungal disease. International Conference Organic Agriculture for Agrobiodiversity Preservation, June, 1-3, Novi Sad, Serbia, Book of Abstract, 97.

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (М 33 = 1)

Dabić, B., **Dragić, V.,** Grabić, J., Gvozdenac, S., Vasiljević, S., Đurakovac, A., Mladenović, E. (2018): The impact of water quality on the physiological and morphological parameters of red clover (*Trifolium pratense* L.). 22 th International Eco-Conference and 10 th Eco-Conference on Safe Food. September, 26-28. Novi Sad, Serbia, Proceedings, 90-92.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (М 64 = 0,2)

Васиљевић, С., Катански, С., Милошевић, Б., Долапчев, А., Живанов, Д., **Драгић, В.,** Ухларик, А. (2018): Детелине - биљке које су промениле свет. Други научни скуп, Теорија и пракса аграра у историјској перспективи". 15-16 новембар, Нови Сад, Србија. Књига апстраката, 26-27.

Прилог 2 - Списак литературе која ће се користити

- Agrios., G. (2004): Plant pathology 5 ed. Elsevier, London.
- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., Herrera-Estrella, L. (2008): The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. Proceedings of the National Academy of Sciences, 5803-5808.
- Alexander, M. (1977): Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Antoun, H., Prévost, D. (2006): Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In Biocontrol and biofertilization, Springer, Netherlands, 1-38.
- Barak, E., Edgington, L.V. (1984): Cross-resistance of *Botrytis cinerea* to captan, thiram, chlorothalonil, and related fungicides. Canadian Journal of Plant Pathology, 6: 318-320.
- Barillot, C., Sarde, C.O., Bert, V., Tarnaud, E., Cochet., N. (2012): A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplane soil bacteria associated to a herbaceous root system. Annals of Microbiology.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011): *Bacillus*-based biological control of plant diseases. Pesticides in the modern world - pesticides use and management. In Tech, Rijeka, 273-302.
- Chandrasekaran, M., Chun, S.C., Oh, J.W., Paramasivan, M., Saini, R.K., Sahayarayan. (2019): *Bacillus subtilis* CBR05 for Tomato (*Solanum lycopersicum*) Fruits in South Korea as a Novel Plant Probiotic Bacterium (PPB): Implications from Total Phenolics, Flavonoids, and Carotenoids Content for Fruit Quality. Agronomy, 1-11.
- Chardonnet, C.O., Sams, C.E., Trigiano, R.N., Conway, W.S. (2000): Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. Phytopathology, 769-774.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N. (2009): Interactions of *Bacillus* spp. and Plants with Special Reference to Induced Systemic Resistance (ISR). Microbiological Research, 493-513.
- Chun, W., Vidaver, A.K. (2001): Gram-positive bacteria, *Bacillus*. In: Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Eds. Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. APS Press, St. Paul, USA, 250-259.
- Collins, C.N., Lyne, P.M. (1984): Microbiological Methods (6th edition), Butterworths, London.
- Fernández-Ortuño, C.D., Chen, F., Schnabel, G. (2013): Resistance to Cyprodinil and lack of Fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in North and South Carolina. Plant Disease, 97 (1): 81-85.
- Gardes, M., Bruns, T.D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology, 2(2), 113-118.
- Ge, B., Liu, B., Nwet, T.T., Zhao, W., Shi, L., Zhang, K. (2016): *Bacillus methylotrophicus* Strain NKG-1, Isolated from Changbai Mountain, China, Has Potential Applications as a Biofertilizer or Biocontrol Agent. Plos One, 1-13.

- Glickman, E., Dessaux, Y. (1995): A Critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 793-796.
- Grabke, A., Fernández-Ortuño, D., Amiri, A., Li, X., Peres, N. Smith, P.A., Schnabel, G. (2014): Characterization of Iprodione Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry and Blackberry. *Phytopathology*, 104 (4): 396-402.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- ISTA (2016): International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association. Switzerland.
- Jarvis, W.R. (1997): *Botryotinia* and *Botrytis* species – taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph. Canada Department of Agriculture, Research Branch, Ottawa, Canada.
- Kefi, A., Slimene, I.B., Karkouch, I., Rihouey, C., Azaeiz, S., Bejaoui, M., Belaid, R., Cosette, P., Jouenne, T. (2015): Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers, *World Journal Microbiol Biotechnology*, 1967-1976.
- Kokalis-Burelle, N., Vavrina, C.S., Rosskopf, E.N., Shelby, R.A. (2002): Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant Soil*, 257-266.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G. O., Azevedo, V., Haga, K. (1997): The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 249-256.
- Lazarovits, G., Turnbull, A., Johnston-Monje, D. (2014): Plant health management: biological control of plant pathogens. *Encyclopedia of agriculture and food systems*. Academic Press, 388-399.
- Lee, J. P., Lee, S.W., Kim, C.S., Son, J. H., Song, J.H., Lee, K.Y., Kim, H.J., Jung, S. J., Moon, B. J. (2006): Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 329-337.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009): Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 541-556.
- Ma, Z., Hu, J. (2018): Plipastatin A1 produced by a marine sediment derived *Bacillus amyloliquefaciens* SHB74 contributes to the control of gray mold disease in tomato. *Biotech*, 1-10.
- Milagres, AFM., Machuca, A., Napoleao, D. (1999): Detection of siderophore production from several fungi and bacterial by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal Microbiol Methods*, 1-6.
- Mora Pons, I.M. (2013): Antimicrobial activity in *Bacillus* spp. from plant environments against plant pathogens. Relationships with cyclic lipopeptide genes and products. PhD Thesis. Universitat de Girona.
- Nakano, M. M., Hulett, F. M. (1997): Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiology Letters*, 1-7.
- Obagwu, J., Korsten, L. (2003): Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*, 187-194.

- Pessi, G., Haas, D. (2000): Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator *anr* and the quorum-sensing regulators *LasR* and *RhlR* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Bacteriology*, 6940–6949.
- Петровић, М., Секулић, Ј. (приређивачи) (2017): Средства за заштиту биља у промету у Србији. *Биљни лекар* 45 (1-2).
- Piggot, P., Hilbert, D. (2004): Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 579-586.
- Pikovskaya, R.I. (1948): Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 362-370.
- Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Sorokulova, I.B., Verneuil, B. and Urdaci, M.C. (2002): *Amicoumacin Antibiotic Production and Genetic Diversity of Bacillus subtilis Strains Isolated from Different Habitats*. *Research in Microbiology*, 269-276.
- Sarven S., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., Xiao, X. (2020): Biological Control of Tomato Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* with the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae*. *Pathogens*, 1-17.
- Siefert, J. L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L. K., Slepecky, R. A., Paul, J. H., Moore, E. R., Jurtshuk, P. (2000): Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Current Microbiology*, 84-88.
- Slepecky, R. A., Hemphill, H. E. (2006): The genus *Bacillus*—nonmedical. In *The prokaryotes*, Springer US, 530-562.
- Staats, M., Van Barlen, P., Kan, V., Kan, J.A.L. (2005): Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 333-336.
- Stanković, S., Soldo, B., Berić-Bjedov, T., Knežević-Vukčević, J., Simić, D., Lazarević, V. (2007): Subspecies-specific distribution of intervening sequences in the *Bacillus subtilis* prophage ribonucleotide reductase genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 8-15.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12), 2725-2729.
- Tanović, B., Ivanović, M. (2010): Characterisation of *Botrytis cinerea* in Raspberry in Serbia. *Book of Abstracts of XV International Botrytis Symposium*, Cadiz, Spain, 47.
- Thakore, Y. (2006): The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 194-208.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tomlin, C. (Ed.): *The Pesticide Manual* British Crop Protection Council. Farnham, UK, 2006.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (2016). Regulating Biopesticides. <http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/>.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. & Whitman, W.B. (2009): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume 3, Springer-Verlag, New York, 21-128.

- Wang, H., Shi, Y., Wang, D., Yao, Z., Wang, Y., Liu, J., Zhang, S., Wang, A. (2018): A Biocontrol Strain of *Bacillus subtilis* WXCDD105 Used to Control Tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* Cooke and Promote the Growth of Seedlings. International Journal Molecular Sciences, 2-17.
- Wang, S., Wu, H., Qiao, J., Ma, L., Liu, J., Xia, Y., Gao, X. (2009): Molecular Mechanism of Plant Growth Promotion and Induced Systemic Resistance to Tobacco Mosaic Virus by *Bacillus* spp. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1250-1258.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 697-7.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., & Taylor, J.W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., & White, T.J. (eds.), PCR protocols: A guide to methods and applications (pp 315-322). San Diego, CA: Academic Press.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van, I., Kan, I. (2007): *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology, 561-580.
- Хаџић, В.Б., Секулић, П., Нешић, Л. (2004): Земљиште и његова заштита у савременој пољопривреди. Научни Семинар агронома (XXXVIII).
- Xu, S.J., Park, D.H., Kim, J.Y., Kim, B.S. (2016): Biological control of gray mold and growth promotion of tomato using *Bacillus* spp. isolated from soil. Tropical plant pathology, 169-176.
- Yunis, H., Elad, Y. (1989): Survival of *Botrytis cinerea* in plants during summer in Israel. Phytoparasitica, 13-21.
- Zeigler, D. R., Perkins, J. B. (2009): The Genus *Bacillus*. Practical handbook of Microbiology, 310-319.