**Факултет** Пољопривредни

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**

Веће научних области
биотехничких наука

32/2-5.3.
(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев упућује)

24.11.2021
(Датум)

# З А Х Т Е В

## 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:

„ПРОУЧАВАЊЕ ЕПИДЕМИОЛОГИЈЕ СОЈЕВА БАКТЕРИЈЕ Xanthomonas euvesicatoria ПРИМЕНОМ МЕТОДА МОЛЕКУЛАРНЕ ГЕНОТИПИЗАЦИЈЕ“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Фитомедицина

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:
Јелена, Негован, Менковић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм): Универзитет у Београду
Пољопривредни факултет, Фитомедицина

3. Година завршетка претходног нивоа студија: 2018

4. Година уписа на докторске студије: 2018/2019.

5. Назив студијског програма докторских студија: Пољопривредне науке, модул Фитомедицина

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: др Алекса Обрадовић

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Kałużna M., Fischer-Le Saux, M., Pothier, J., F., Jacques, M., Obradović, A., Tavares, F., Stefani, E. (2021): Xanthomonas arboricola pv. juglandis and pv. corylina: Brothers or distant relatives? Genetic clues, epidemiology, and insights for disease management. Molecular Plant Pathology, 00, 1-19.
2. Popović, T., Menković, J., Prokić, A., Zlatković, N., Obradović, A. (2020): Isolation and characterization of Pseudomonas syringae isolates affecting stone fruits and almond in Montenegro. Journal of plant disease and protection, vol. 128, pp. 391–405.
3. Šević, M., Gašić, K., Ignjatov, M., Mijatović, M., Prokić, A., Obradović, A. (2019): Integration of biological and conventional treatments in control of pepper bacterial spot. Crop protection, vol. 119, pp. 46 – 51.
4. 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. 9
5. Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J., D., Arsenijević, M., Jones, J., B., Minsavage, G., V., Wang, J., W. (2004): Characterization and PCR-based typing of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria from peppers and tomatoes in Serbia. European Journal of Plant Pathology, vol. 110, pp. 285–292.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 24.11.2021. 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: 32/2-5.3.
Датум: 24.11.2021. 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 24.11.2021. године, донело је

# О Д Л У К У

**I** **ПРИХВАТА СЕ** тема докторске дисертације коју је поднела **ЈЕЛЕНА МЕНКОВИЋ, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«ПРОУЧАВАЊЕ ЕПИДЕМИОЛОГИЈЕ СОЈЕВА БАКТЕРИЈЕ *Xanthomonas euvesicatoria* ПРИМЕНОМ МЕТОДА МОЛЕКУЛАРНЕ ГЕНОТИПИЗАЦИЈЕ».**

**II** За ментора се именује др Алекса Обрадовић, редовни професор Универзитета у Београду - Пољопривредног факултета.

**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 Јелена Менковић, 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.

**П Р Е Д С Е Д Н И К**
**НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА**
**Д Е К А Н**

_____
***(Проф. др Душан Живковић)***

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

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број:
Дана 28.10.2021. године
Београд - Земун

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА**

**Предмет:** ***Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата*** **Јелене Менковић, 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 29.09.2021. године донело је одлуку бр. 32/29-3.3. да се образује Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Јелене Менковић, мастер инж. пољопривреде под насловом:

**„Проучавање епидемиологије сојева бактерије *Xanthomonas euvesicatoria* применом метода молекуларне генотипизације“**

Кандидат је дана 13.10.2021. године јавно бранила пријављену тему докторске дисертације пред Комисијом у саставу: др Анђелка Прокић, научни сарадник - председник Комисије (Одлука број: 22/633 од 13.10.2021. године), др Алекса Обрадовић, редовни професор и др Катарина Гашић, виши научни сарадник. Након увида у пријаву теме, саслушане одбране и дискусије са кандидатом, Комисија подноси следећи:

**И З В Е Ш Т А Ј**

**1. Основни подаци о кандидату и дисертацији**

1.1 Биографија кандидата

Јелена Менковић, мастер инжењер пољопривреде, рођена је 28. јула 1994. године у Јагодини, Република Србија. Основне академске студије на Пољопривредном факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Биљна производња, модул Фитомедицина, уписала је школске 2013/2014. године, а дипломирала 27.09.2017. године са просечном оценом 9,20. Дипломски рад под насловом „Биљне ваши на ружи у Београду” одбранила је оценом 10 (десет). Мастер академске студије на Пољопривредном факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Фитомедицина, уписала је школске 2017/2018. године, а завршила је 28.09.2018. године са просечном оценом 9,88, одбранивши мастер рад под насловом „Утицај мириса биљака фамилије *Apiaceae* на понашање мрквине буве *Bactericera trigonica* (Hodkinson, 1981) (Hemiptera, Triozidae)” оценом 10 (десет). Школске 2018/2019. године кандидат

уписује докторске академске студије на Пољопривредном факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Пољопривредне науке, модул Фитомедицина. До сада је на основу положених испита на докторским академским студијама остварила 150 ЕСПБ, са просечном оценом 9,75. Одлуком Изборног већа Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, 25.10.2018. изабрана је у звање и на радно место сарадника у настави за ужу научну област Фитопатологија (Одлука број: 420/1-2/6), а 31.10.2019. изабрана је у звање и на радно место асистента за исту ужу научну област (Одлука број: 300/1-2/4). Била је ангажована на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја „Развој интегрисаних система управљања штетним организмима у биљној производњи са циљем превазилажења резистентности и унапређења квалитета и безбедности хране" (III46008), као и на међународном пројекту Pest Organisms Threating Europe – POnTE (H2020 - 635646). У организацији POnTE пројекта, јуна 2019. године на Пољопривредном факултету у Београду, похађала је практичну обуку под називом „The theoretical and practical training on the detection of *Xylella fastidiosa* and *Candidatus* Liberibacter solanacearum". Јула 2019. боравила је на Zürich University of Applied Sciences (ZHAW), School of Life Sciences and Facility Management у Веденсвилу у Швајцарској, где је била полазник обуке COST CA1607 Training School on Molecular typing of *Xanthomonadaceae* – from epidemiological surveillance to outbreak investigation. У априлу 2020. године, била је ангажована у детекцији вируса SARS – Cov2 на Институту за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак". До сада је као коаутор објавила 17 радова (Прилог 1). Говори енглески, а служи се италијанским језиком.

1.2 Предлог теме докторске дисертације

Предложени наслов теме докторске дисертације „Проучавање епидемиологије сојева бактерије *Xanthomonas euvesicatoria* применом метода молекуларне генотипизације" усклађен је са програмом и предметом истраживања. Наслов је адекватно формулисан, јасно одражава циљ и предмет истраживања и дефинише проблематику која ће се проучавати током израде докторске дисертације.

## 2. Предмет и циљ дисертације

2.1 Предмет и програм истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације биће сојеви фитопатогене бактерије *Xanthomonas euvesicatoria,* проузроковача економски најзначајније бактериозе паприке. Планирано је проучавање популације патогена применом метода молекуларне генотипизације, са циљем расветљавања епидемиолошког статуса ове фитопатогене бактерије у Србији. Истраживањима ће бити обухваћени сојеви пореклом из различитих локалитета и различитих година изолације. Осим сојева *X. euvesicatoria* који се чувају у Колекцији фитопатогених бактерија Лабораторије за фитобактериологију, Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, истраживања ће обухватити и нове сојеве изоловане и идентификоване применом класичних бактериолошких и молекуларних метода током израде докторске дисертације. Генотипизација ће се вршити анализом варијабилности у броју кратких понављајућих генских секвенци на различитим локусима у геному бактерија (multiple loci variable number of tandem repeat analisys - MLVA). Предвиђено је и поређење генетичке сличности сојева изолованих у Србији са сојевима из суседних држава ради утврђивања порекла и нивоа сличности међу њима.

Паприка (*Capsicum annuum*) је најзаступљенији повртарски усев у Србији. Према статистичким подацима Организације за храну и пољопривреду (FAO) из 2019. године,

производња паприке у нашој земљи се простире на око 10.000 ha, што чини 1/6 укупне производње свежег поврћа у Србији (око 65.000 ha), а просечан принос овог усева износи око 12 тона по хектару (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

Производњу паприке угрожавају бројни проузроковачи болести. Међу њима се могу наћи фитопатогене гљиве и псеудогљиве (*Phytophthora capsici, Rhizoctonia solani, Verticillium albo-atrum, V. dahliae, Colletotrichum scovillei, Leveillula taurica, Fusarium* spp.), фитопатоге бактерије (*Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum, Pseudomonas* spp.), фитоплазме (*Candidatus* Phytoplasma solani), и фитопатогени вируси (*Tospoviruses, Potyviruses, Tobamoviruses, Cucumoviruses*) (Parisi et al., 2020).

Бактериозна некротична пегавост представља један од главних проблема у производњи паприке. Због широког опсега генетских и физиолошких варијација у оквиру врста рода *Xanthomonas,* проузроковача бактериозне пегавости паприке и парадајза, класификација ових врста је често подложна изменама. У складу са најновијим изменама у таксономији, бактерије које се наводе као проузроковачи болести паприке су *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (Constantin et al., 2016), *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* (Mornière et al., 2020) и *X. vesicatoria* (Vauterin et al., 1995). Проузроковач бактериозне пегавости листова и краставости плодова паприке, *Xanthomonas euvesicatoria*, сврстава се у најзначајније паразите ове биљне врсте у свету. У Србији, услед повољних агроеколошких услова за развој болести, као и гајења осетљивог сортимента, *X. euvesicatoria* се редовно појављује, а интензитет заразе и настале економске штете могу бити веома значајне (Игњатов и сар., 2017).

*X. euvesicatoria* припада домену Bacteria, разделу Proteobacteria, класи Gammaproteobacteria, реду Xanthomonadales, фамилији *Xanthomonadaceae*, роду *Xanthomonas* (NCBI Taxonomy browser). *X. euvesicatoria* је Грам–негативна бактерија, проузрокује хиперсензитивну реакцију дувана, развија се при температури 37°C, глукозу метаболише оксидативним путем и не одликује се амилолитичком и пектолитичком активношћу. На чврстој хранљивој подлози од квашчевог екстракта, декстрозе и калцијум-карбоната (yeast-extract-decstrose-$CaCO_3$ – YDC medium) ова бактерија формира округле, жуте и слузасте колоније (Игњатов и сар., 2010). Инфекцију остварује колонизацијом апопласта након продирања кроз природне отворе. Сви надземни делови биљака паприке могу бити веома осетљиви према овом патогену. Први симптоми болести се уочавају у виду ситних пега воденастог изгледа 3 до 4 дана након остваривања инфекције. Пеге се могу ограничено ширити, спајати и захватати веће површине биљног ткива. Ткиво у оквиру пега некротира, а заражени листови почињу да жуте и превремено опадају. На плодовима паприке услед неравномерног развоја оболелог и здравог ткива, долази до пуцања перикарпа услед чега се у оквиру пега стварају красте. Овакви плодови остају недовољно развијени и деформисани, што самим тим доводи до губитка приноса (McAvoy et al., 2021).

Контрола проузроковача бактериозне пегавости паприке обухвата превентивне и куративне стратегије. За превенцију болести је важна дезинфекција земљишта и супстрата у производњи расада, сетва и садња здравог и сертификованог семена и расада, одржавање оптималне температуре и водног режима у заштићенм простору, уклањање биљних остатака, спровођење одговарајућих агротехничких мера и узгој мање осетљивог сортимента. Међутим, наведене мере често не могу пружити задовољавајући ниво заштите, посебно када временски услови погодују ширењу патогена што доводи до озбиљних епидемија. Нове расе *X. euvesicatoria* као и развој отпорности према једињењима бакра и антибиотицима, додатно отежавају контролу овог патогена (Šević et al., 2019). Одрживост мера заштите, примена хемијских средстава за заштиту биља, примена микроорганизама антагониста или селекција

отпотног сортимента значајно зависи од познавања популационе структуре патогена (Vancheva et al., 2021). Проучавање распрострањености и путева ширења важно је због расветљавња епидемиологије патогена. Разумевање њихове биологије, популационе структуре и динамике важно је због успостављања мера заштите у агроекосистемима. Једном када се популација фитопатогене бактерије прилагоди новом усеву или новим условима у којима се усев гаји, појава болести и њен интензитет је одређен способностима ширења патогена у односу на структуру популације, просторну дистрибуцију пољопривредне праксе, осетљивост сортимента и временске услове. Разумевање начина на који се бактерије прилагођавају новим условима животне средине, а затим и умножавају, кључно је за предвиђање епидемија већих размера у агроекосистемима (Pruvost et al., 2019).

Генотипизација представља скуп техника у молекуларној биологији којима се откривају мале генетске разлике међу сојевима, а које могу резултирати променама у фенотипу, укључујући измене у метаболизму бактерија као и у патогености и вируленцији. Ове методе имају широк спектар примене у биолошким истраживањима, медицини и пољопривреди.

Методе генотипизације, у новије време, стичу све већу популарност у проучавању епидемиологије патогена. Проучавање генетске структуре бактеријске популације ограничене на мањем простору такође представља изазов. Метода генотипизације на основу високо конзервативних гена (генотипизација мултилокусних секвенци – Multi Locus Sequence Typing - MLST) често налази примену у идентификацији фитопатогених бактерија. Недостатак ове методе је недовољна резолуција, посебно у проучавању мономорфних патогена који се на генетском нивоу међусобно веома мало разликују, а међу којима су и врсте рода *Xanthomonas* (Pruvost et al., 2019).

Један од водећих проблема у контроли овог патогена представљају сојеви који су развили толерантност према бакарним једињењима. Стога је детекција толерантних сојева од значаја за спровођење ефикасних стратегија у контроли овог патогена. Обзиром да класичне лабораторијске методе нису довољно прецизне у детекцији толерантних сојева, познавање места у геному бактерија који детерминишу отпорност сојева према једињењима бакра, може значајно допринети благовременом откривању оваквих сојева. До сада је познато да се код врста рода *Xanthomonas* гени отпорности према једињењима бакра налазе у плазмидној ДНК (Richard et al., 2017). Такође, трајност отпорности биљака може бити доведена у питање уколико постоји значајан диверзитет у популацији патогена. Размена гена међу популацијама патогена омогућава брже сламање отпорности биљака. Стога је примена метода молекуларне типизације важна у реконструкцији еволуције патогена и представља важан аспект у интегрисаној заштити биља (Poulin et al., 2015).

Генотипизација базирана на анализи места у геному где су кратке нуклеотидне секвенце организоване у виду тандемских понављања (variable number of tandem repeats - VNTR markers), представља брзу и једноставну методу у проучавању епидемиологије бактерија. VNTR локуси су региони кодирајућих или некодирајућих нуклеотида. Према броју нуклеотида који улазе у понављајућу секвенцу могу се поделити на микросателитне (мање од 5 нуклеотида) и минисателитне (више од 5 нуклеотида) секвенце. Сматра се да су ове секвенце укључене у неке веома важне биолошке процесе, а генетске варијације настају брже него код других генских региона. Ове варијације су случајне и последица су високе подложности мутацијама VNTR секвенци. Постоје примери адаптивних еволутивних промена патогена услед варијација у оквиру VNTR секвенци, што нам показује да се у погледу генетских и епидемиолошких односа ови делови наследног молекула морају додатно анализирати (Keim, 2013). Без обзира на променљивост у оквиру ових секвенци, прајмери за њихову детекцију се синтетишу на

основу бочних региона који представљају сегменте непонављајућих секвенци и који нису значајно подложни еволутивним изменама. Сличност или разлика међу сојевима може се процењивати на основу варијација у броју понављања у оквиру ових локуса (Chang et al., 2007).

VNTR је основа за анализу варијабилности понављајућих генских секвенци на различитим локусима у геному бактерије (multiple loci variable number of tandem repeat analysis - MLVA). MLVA је веома популарна анализа у генотипизацији бактерија због високог нивоа специфичности, поновљивости, ефикасности и ниских трошкова извођења (Vancheva et al., 2021). Овом методом се може утврдити да ли постоје сличности међу сојевима из различитих региона и земаља, што омогућава праћење ширења патогена у нова подручја.

Програмом истраживања ове дисертације биће обухваћено:

- Прикупљање узорака паприке са симптомима бактериозне пегавости листова и краставости плодова из различитих региона Србије, и изолација бактеријских сојева;
- Идентификација сојева применом класичних бактериолошких тестова и молекуларних метода детекције и идентификације;
- Проучавање толерантности изолованих сојева *X. euvesicatoria* према бакарним једињењима гајењем на специјалној хранљивој подлози, као и применом прајмера за молекуларну детекцију специфичних региона у геному ових бактерија, одговорних за отпорност према једињењима бакра;
- Проучавање генетске сличности сојева *X. euvesicatoria* пореклом из различитих региона Србије и из различитих година изолације;
- Проучавање генетске сличности сојева *X. euvesicatoria* изолованих у Србији са сојевима *X. euvesicatoria* пореклом из суседних држава.

### 2.2. Научни циљ истраживања

Обзиром на значај који *X. euvesicatoria* има у производњи паприке у Србији, а који се огледа у смањењу приноса и тржишне вредности плодова, веома је важно имати увид у популациону структуру овог деструктивног патогена. Стога, циљ истраживања ове докторске дисертације је да се поређењем сојева изолованих у Србији и региону применом адекватних и најновијих молекуларних метода, проучи структура и динамика популације овог патогена, правци ширења, као и отпорност сојева према једињењима бакра. Израда ове дисертације даће прецизнији одговор о саставу популације ове бактерије у Србији, а што може имати значаја у унапређењу ефикасности стратегија заштите.

## 3. Основне хипотезе од којих ће се полазити у истраживању

Предложена истраживања полазе од следећих претпоставки:

- Постоји генетичка разноврсност у популацији *X. euvesicatoria* присутној у Србији и земљама у окружењу.

- Састав популације *X. euvesicatoria* у Србији је повезан са динамиком кретања овог патогена у окружењу.
- Постоје разлике у отпорности сојева патогена према једињењима бакра.

## 4. Методе које ће се у истраживању применити

4.1. Прикупљање узорака биљног материјала

Ради утврђивања састава и распрострањености популације *X. euvesicatoria* прикупљаће се узорци биљака паприке са симптомима некротичних пега неправилног облика оивичених хлоротичним ореолом на листовима, као и са симптомима краставости плодова (EPPO bulletin PM7/110, 2013). Узорци ће бити прикупљени са различитих локалитета у Србији и анализирани у Лабораторији за фитобактериологију, Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду.

4.2. Изолација и идентификација сојева бактерија класичним бактериолошким методама

Након детаљног прегледа биљног материјала, изолација ће се вршити из зоне прелаза зараженог ткива у здраво, јер се у том делу налазе највиталније ћелије бактерија са тенденцијом ширења и колонизације здравог ткива. Изолација, пречишћавање и посматрање одгајивачких одлика сојева вршиће се на подлози од квашчевог екстракта, декстрозе, калцијум-карбоната и агара (YDC подлога). Од бактериолошких карактеристика биће проучено разликовање по Граму, оксидативно-ферментативни метаболизам глукозе, пектолитичка активност, амилолитичка активност, развој при 37°C, хидролиза желатина и ескулина, толерантност на трифенил-тетразолијум-хлорид (Lelliot and Stead, 1987; Schaad et al., 2001; Klement et al., 1990).

4.3. Молекуларна идентификација сојева бактерија

Изолација ДНК сојева биће извршена помоћу DNeasy *mericon* Food Kit (Qiagen, Germany) према протоколу произвођача. Молекуларна идентификација биће извршена применом BS-XeF/BS-XeR (Araújo et al., 2012) и ZnDoF/ZnDoR (Pečenka et al., 2020) прајмера који су специфични за врсту *X. euvesicatoria*.

4.4. Проучавање толерантности сојева према бакарним једињењима

Толеранција сојева према бакру биће проучена на чврстој подлози од казитона, квашчевог екстракта и глицерола (CYEG), којој ће се додавати бакар-сулфат у различитим концентрацијама. На подлогу ће се наносити по кап суспензије бактерија у стерилној дестилованој води концентрације 1 x $10^8$ cfu/ml. Након 48h инкубације у термостату при 26°C вршиће се визуелна процена развоја бактерија на овој подлози (Griffin et al., 2017).

4.5. Молекуларна детекција гена толерантности према бакру

Сви сојеви ће бити додатно проучени методом ланчане реакције полимеразе, којом ће се вршити умножавање специфичног региона у молекулу ДНК одговорног за толерантност сојева према бакру, применом copL, copA и copB прајмера (Behlau et al., 2013).

4.6. Анализа варијабилности у броју кратких понављајућих генских секвенци на различитим локусима (Multilocus variable number of tandem repeat analysis - MLVA)

MLVA анализа ће обухватити део колекције *X. euvesicatoria* сојева који се чувају у Колекцији фитопатогених бактерија Лабораторије за фитобактериологију, Пољопривредног факултета у Београду, као и новоизоловане сојеве. Помоћу специфичних прајмера покушаће се умножавање 16 локуса према условима ланчане реакције полимеразе наведеним у раду Vancheva и сарадника из 2021. године. Како би се утврдила специфичност умножених локуса, вршиће се њихово електрофоретско раздвајање на 1% агарозном гелу, након чега ће се умножени локуси секвенцирати. Добијене секвенце биће обрађене у програмима BioNumerics (Applied Maths, Sint – Martens – Latem, Belgium) и MUSCLE. Еволутивна повезаност сојева биће приказана преко стабла минималног распона (minimum spanning tree - MST) коришћењем софтвера PHYLOViZ. За поређење сличности сојева из Србије са сојевима из земаља у окружењу користиће се ARLEQUIN софтверски пакет (Vancheva et al., 2021).

## 5. Очекивани резултати и научни допринос

Очекује се да ће добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације показати колика је генетичка разноврсност међу сојевима *X. euvesicatoria* у Србији, као и да ће пружити одговор о распростирању ове врсте у Србији. Генетичка разноврсност може указати на постојање разлика у патогености и вирулентности проучаваних сојева, што је од великог како научног тако и практичног значаја. Током израде ове дисертације, први пут ће се применити MLVA у генотипизацији ових сојева као нов начин проучавања генетичке варијабилности и епидемиологије патогена. Поређењем сојева из Србије са сојевима земаља у окружењу, добиће се подаци о путевима кретања сојева присутних у нашој земљи, што ће употпунити епидемиолошка знања о *X. euvesicatoria*. Ништа мање важно за науку и практичну заштиту биља је и добијање резултата о резистентности сојева присутних у Србији према бакарним једињењима. Значај ових истраживања се огледа у примени добијених резултата у унапређивању програма заштите паприке од овог патогена.

## 6. Закључак

Кандидат Јелена Менковић, маст. инж. пољопривреде, поднела је пријаву за израду докторске дисертације под насловом: **„Проучавање епидемиологије сојева бактерије *Xanthomonas euvesicatoria* применом метода молекуларне генотипизације“.** Сагледавањем значаја проблематике која је обухваћена предложеним истраживањима, Комисија позитивно оцењује предложену тему и програм истраживања, како са научног тако и са практичног становишта.

На основу анализе предложеног програма докторске дисертације, научног циља, актуелности теме, полазних хипотеза, очекиваних резултата, као и одржане јавне одбране научне заснованости предложене теме, комисија сматра да је предложена тема иновативна и савремена са научног и практичног становишта. Хипотезе од којих кандидат полази и циљ рада су правилно постављени, а предложене методе су одговарајуће, тако да омогућавају реализацију предвиђених задатака. Предложени програм представља комплетну и заокружену целину. Паприка је најзаступљенији повртарски усев у Србији. Производњу овог поврћа угрожавају бројни проузроковачи болести, међу којима су фитопатогене бактерије. Бактериозна некротична пегавост лишћа и краставост плодова представља један од главних проблема у производњи

паприке у свету. У Србији, услед повољних агроеколошких услова за развој болести, као и гајења осетљивог сортимента, недостатка ефикасних метода заштите, *X. euvesicatoria* се редовно појављује, а интензитет заразе и настале економске штете могу бити веома значајне. Стога је од изузетног научног значаја добро познавање популације овог веома распрострањеног патогена, како у Србији тако и као дела шире популације у региону. Примена најновијих метода анализе генетичке варијабилности сојева овог патогена треба да укаже на повезаност са широм популацијом, правце његовог ширења и постојање варијација у геному које могу имати за последицу промене у вирулентности или отпорности патогена на препарате који се користе у заштити паприке.

Вишегодишњим истраживањима сојева *X. euvesicatoria* применом метода молекуларне генотипизације вршиће се њихово међусобно упоређивање и упоређивање са сојевима у окружењу, ради добијања података о њиховој епидемиологији. Резултати који се односе на правце кретања популације и евентуалну резистентност према јонима бакра значајно ће допринети избору и унапређењу ефикасности мера заштите.

Полазећи од свега наведеног, Комисија у саставу др Анђелка Прокић, др Алекса Обрадовић и др Катарина Гашић, позитивно оцењује поднету пријаву теме и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду да прихвати и одобри израду докторске дисертације кандидата Јелене Менковић, под насловом „Проучавање епидемиологије сојева бактерије *Xanthomonas euvesicatoria* применом метода молекуларне генотипизације“.

Тема докторске дисертације је из уже научне области Фитопатологија. Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже др Алексу Обрадовића, редовног професора Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду.

## 7. <u>Име и референце предложеног ментора</u>

Име и презиме ментора: **др Алекса Обрадовић**

Звање: **редовни професор**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:


1. Kałużna M., Fischer-Le Saux, M., Pothier, J., F., Jacques, M., **Obradović, A.**, Tavares, F., Stefani, E. (2021): *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and pv. *corylina*: Brothers or distant relatives? Genetic clues, epidemiology, and insights for disease management. Molecular Plant Pathology, 00, 1-19.
2. Popović, T., Menković, J., Prokić, A., Zlatković, N., **Obradović, A.** (2020): Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* isolates affecting stone fruits and almond in Montenegro. Journal of plant disease and protection, vol. 128, pp. 391–405.
3. Šević, M., Gašić, K., Ignjatov, M., Mijatović, M., Prokić, A., **Obradović, A.** (2019): Integration of biological and conventional treatments in control of pepper bacterial spot. Crop protection, vol. 119, pp. 46 – 51.
4. 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.

5. **Obradović, A.**, Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J., D., Arsenijević, M., Jones, J., B., Minsavage, G., V., Wang, J., W. (2004): Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. European Journal of Plant Pathology, vol. 110, pp. 285–292.

Београд - Земун
Дана 28.10.2021. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. др Анђелка Прокић, научни сарадник
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна дисциплина: Фитопатологија)

2. др Алекса Обрадовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Фитопатологија)

3. др Катарина Гашић, виши научни сарадник
Институт за заштиту биља и животну средину у Београду
(ужа научна дисциплина: Фитопатологија)

**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 Јелене Менковић**

**<u>Рад у врхунском међунардоном часопису – News Item (M21/4 = 2,0)</u>**

Popović, T., **Menković, J.**, Prokić, A., Obradović, A. (2020): First report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* causing leaf spot and twig necrosis on peach (*Prunus persica*) in Montenegro. Plant disease, vol. 104, no.2, p. 560 – 561.

Popović, T., **Menković, J.**, Prokić, A., Obradović, A. (2021): First report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* causing leaf and fruit spot on apricot (*Prunus armeniaca* L.) in Montenegro. Plant disease, DOI: doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0161-PDN.

Popović T., **Menković, J.**, Pantelić, M., Obradović, A. (2021): First report of *Xanthomonas euvesicatoria* causing bacterial leaf spot of pepper (*Capsicum annuum*) in Montenegro. Plant disease, DOI: doi.org/10.1094/PDIS-08-21-1655-PDN

Prokić, A., Marković, T., **Menković, J.**, Ivanovic, M., Obradović, A. (2021): First Report of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing marginal leaf necrosis of arugula (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) in Serbia. Plant disease, DOI: 10.1094/PDIS-04-21-0740-PDN

**<u>Рад у истакнутом међународном часопису (M22 = 5,0)</u>**

Popović, T., **Menković, J.**, Prokić, A., Zlatković, N., Obradović, A. (2021): Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* isolates affecting stone fruits and almond in Montenegro. Journal of Plant Diseases and Protection, 128:391 – 405.

**<u>Рад у часопису од националног значаја (M 52 = 1,5)</u>**

**Менковић, J.**, Обрадовић, А. (2021): Молекуларна детекција и идентификација врсте „*Candidatus* Liberibacter solanacearum”. Биљни лекар, вол. 49, бр. 1, стр. 17 – 37.

**<u>Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M 34 = 0,5)</u>**

Ivanović, M., Prokić, A., Gašić, K., **Menković, J.**, Obradović, A. (2019): Genomic and phenotypic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from raspberry and blackberry in Serbia. VIII Congress on plant protection, Zlatibor. Book of abstracts, pp.182.

Popović, T., **Menković, J.**, Prokić, A., Obradović, A. (2019): Leaf and fruit spot and twig cancer of peach in Montenegro. VIII Congress on plant protection, Zlatibor. Book of abstracts, pp.180 – 181.

Popović, T., **Menković, J.**, Prokić, A., Obradović, A. (2019): Etiology of peach leaf and fruit spot and twig cancer in Montenegro. Third annual conference of the EuroXanth COST action, Lednice, Czech Republic. Book of abstracts, p. 125.

Popović, T., **Menković, J.**, Prokić, A., Obradović, A. (2021): *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* associated with leaf and fruit spot and twig necrosis of peach, apricot and sweet cherry in Montenegro. Fourth annual conference of the EuroXanth COST action – Integrating Science on Xanthomonadaceae for integrated plant disease management in Europe, virtual conference. Book of abstacts, p. 68.

Prokić, A., Ivanović, M., Gašić, K., **Menković, J.**, Kuzmanović, N., Zlatković, N., Obradović, A. (2020): Identification, characterization and MLSA analysis of *Pseudomonas* strains associated with raspberry and blackberry bacterial blight in Serbia. *Pseudomonas* 2020 online meeting. Book of abstracts, pp. 7.

Prokić, A., **Menković, J.**, Marković, T., Ivanović, M., Obradović, A. (2021): Etiology of bacterial leaf spot of arugula in Serbia. Fourth annual conference of the EuroXanth COST action – Integrating Science on Xanthomonadaceae for integrated plant disease management in Europe, virtual conference. Book of abstacts, p. 65.

**<u>Саопштење са међународног скупа штампано у целини (М 33 = 1,0)</u>**

Popović, T., **Menković, J.**, Prokić, A., Obradović, A. (2021): Aetiology of peach and sweet cherry leaf spot and twig canker in Montenegro. XII International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology, Acta Horticulturae 1322.

**<u>Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (М 64 = 0,2)</u>**

Ивановић, М., Шевић, М., Прокић, А., Гашић, К., Златковић, Н., **Менковић, J.**, Обрадовић, А. (2021): Примена антибиотика у заштити биља – за и против. XVI Саветовање о заштити биља, Златибор. Зборник резимеа, стр. 29 – 30.

**Менковић, J.**, Јеринић – Продановић, Д., Ђукић, Н., Обрадовић, А. (2018): Утицај мириса биљака фамилије Апиацеае на понашање мрквине буве Бацтерицера тригоница (Hodkinson, 1981) (Hemiptera, Triozidae). XV Саветовање о заштити биља, Златибор. Зборник резимеа, стр. 46 – 47.

**Менковић, J.**, Ћалић, А., Ивановић, М., Златковић, Н., Обрадовић, А. (2021): Преглед молекуларних метода детекције и идентификације „*Candidatus* Liberibacter solanacearum”. XVI Саветовање о заштити биља, Златибор. Зборник резимеа, стр. 56.

Поповић, Т., **Менковић, J.**, Прокић, А., Златковић, Н., Обрадовић, А. (2021): Популација *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* – патогена коштичавих воћака и бадема у Црној Гори. XVI Саветовање о заштити биља, Златибор. Зборник резимеа, стр. 20 – 21.

Прокић, А., **Менковић, J.**, Марковић, Т., Ивановић, М., Обрадовић, А. (2021): Проучавање етиологије бактериозне некротичне пегавости руколе у Србији. XVI Саветовање о заштити биља, Златибор. Зборник резимеа, стр. 58 – 59.

**Прилог 2 – Оквирни списак литературе која ће се користити**


Araùjo, E., R., Costa, J., R., Ferreira, M., A., S., V., Quezado – Duval, A., M. (2012): Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using specific – specific primers and multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology, 113, 1479 – 1490.

Behlau, F., Hong, J., C., Jones, J., B., Graham, J., H. (2013): Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus – associated Xanthomonads. Phytopathology, 103 (5): 409 – 18.

Vancheva, T., Bogatzevska, N., Moncheva, P., Mitrev, S., Vernière, C., Koebnik, R. (2021): Molecular epidemiology of *Xanthomonas euvesicatoria* strains from the Balkan peninsula revealed by a new multiple – locus variable – number tandem – repeat analysis scheme. Microorganisms, 9, 536.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995): Reclassification of *Xanthomonas*. International journal of systematic bacteriology, vol. 45, no. 3, 472– 489.

Griffin, K., Gambley, C., Brown, P., Li, Y. (2017): Copper – tolerance in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. Crop protection, 96, 144 -150.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (2013): PM 7/110(1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 43 (1), 7 – 20.

Игњатов, М., Гашић, К., Ивановић, М., Шевић, М., Обрадовић, А., Милошевић, М. (2010): Карактеризација сојева *Xanthomonas euvesicatoria*, патогена паприке у Србији. Пестициди и фитомедицина (Београд), 25(2), 139 -149.

Игњатов, М., Гашић, К., Шевић, М., Обрадовић, А. (2017): Распрострањеност и значај проузроковача бактериозне пегавости листа и краставости плодова паприке и парадајза. Биљни лекар, вол. 45, бр. 6, стр. 587-596.

Keim, P., S. (2013): Bacterial variable number tandem repeats. Brener's encyclopedia of genetics (Second edition), Academic press, 274 – 276.

Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D., C. (1990): Methods in phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 45 – 48.

Lelliott, R.A. and Stead, D.E. (1987): Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants (volume 2). British Society for Plant Pathology Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

McAvoy, C., Roberts, P., Jones, J. (2021): Bacterial spot of pepper. UF/IFAS Extension, PP362.

Mornière, L., Burlet, A., Rosenthal, E., R., Nesme, X., Portier, P., Bull, C., T., Lavire, C., Fischer – Le Saux, M., Bertolla, F. (2020): Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 emend. Timilsina et al. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin et al. 1995. Systematic and Applied Microbiology, 43, 126087.

NCBI Taxonomy Browser (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser)

Parisi, M., Alioto, D., Tripodi, P. (2020): Overview of biotic stresses in pepper (*Capsicum* spp.): Sources of genetic resistance, molecular breeding and genomics. International journal of molecular sciences, 21, 2587.

Pečenka, J., Kocanová, M., Baránek, M., Gazdík, F., Ragasová, L., Peňázová, E., Čechová, J., Beran, P., Eichmeier, A. (2020): Specific – specific PCR primers for the detection of

poorly distinguishable *Xanthomonas euvesicatoria*. Crop protection, vol. 127, 104978.

Poulin, L., Grygiel, P., Magne, M., Gagnevin, L., Rodriguez-R, L., M., Forero Serna, N., Zhao, S., El Rafii, M., Dao, S., Tekete, C., Wonni, I., Koita, O., Pruvost, O., Verdier, V., Vernière, C., Koebnik, R. (2015): New multilocus variable-number tandem-repeat analysis toll for surveillance and local epidemiology of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak of rice caused by *Xanthomonas oryzae*. Applied and Environmental Microbiology, 81: 688-698.

Pruvost, O., Boyer, K., Ravigné, V., Richard, D., Vernière, C. (2019): Deciphering how plant pathogenic bacteria disperse and meet: Molecular epidemiology of *Xanthomonas citri* pv. *citri* at microgeographic scales in a tropical area of Asiatic citrus canker endemicity. Evolutionary applications, 12, 1523 – 1538.

Richard, D., Boyer, C., Lefeuvre, P., Canteros, B., I., Beni – Madhu, S., Portier, P., Pruvost, P. (2017): Complete genome sequences of six copper-resistant *Xanthomonas* strains causing bacterial spot of solaneous plants, belonging to *X. gardneri*, *X. euvesicatoria*, and *X. vesicatoria*, using long-read technology. American Society for Microbiology Journals, Genome Announcements, vol. 5, no. 8.

Schaad, N., Jones, J.B. and Chun, W. (2001): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, USA.

FAOSTAT statistical database. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (www.fao.org/faostat. Accessed 01 Apr 2020).

Chang, C., H., Chang, Y., C., Underwood, A., Chiou, C., S., Kao, C., Y. (2007): Nucleic Acids Research, vol. 35, D416 – D421.

Constantin, E., C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Malderghem, C., V., Vos, P., Cottyn, B. (2016): Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. Plant Pathology, vol. 65, 792 – 806.

Šević, M., Gašić, K., Ignjatov, M., Mijatović, M., Prokić, A., Obradović, A. (2019): Integration of biological and conventional treatments in control of pepper bacterial spot. Crop protection, vol. 119, 46 – 51.