Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Веће научних области
биотехничких наука

32/11-5.1.
(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев упућује)

26.10.2022.
(Датум)

З А Х Т Е В

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

Молимо да, сходно чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Мелиорације земљишта

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:
Ирена, Бранислав, Тодоровић

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

3. Година завршетка претходног нивоа студија: 2019.

4. Година уписа на докторске студије: 2019/2020.

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

6. Датум подношења пријаве
теме докторске дисертације 31.05.2022.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме првог ментора: др Јелена Јовичић-Петровић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Jovičić-Petrović, J., Karličić, V., Petrović, I., Ćirković, S., Ristić-Đurović, J., Raičević, V. (2021). Biomagnetic priming – possible strategy to revitalize old mustard seeds. Bioelectromagnetics, 42, 238-249.
2. Karličić, V., Zlatković, M., Jovičić-Petrović, J., Nikolić, M.P., Orlović, S., Raičević, V. (2021). Trichoderma spp. from Pine Bark and Pine Bark Extracts: Potent Biocontrol Agents against Botryosphaeriaceae. Forests, 12, 1731.
3. Milinkovic, M., Lalevic, B., Jovicic-Petrovic, J., Golubovic-Curguz, V., Kljujev, I., Raicevic, V. (2018). Biopotential of compost and compost products derived from horticultural waste – effect on plant growth and plant pathogens' suppression. Process Safety and Environmental Protection, 121, 299-306.
4. Kljujev, I., Raicevic, V., Jovicic-Petrovic, J., Vujović, B., Mirkovic, M., Rothballer, M. (2018). Listeria monocytogenes – Danger for health safety vegetable production. Microbial pathogenesis, 120, 23-31.
5. Jovicic-Petrovic, J., Jeremic, S., Vuckovic, I., Vojnovic, S., Bulajic, A., Raicevic, V., Nikodinovic-Runic, J. (2016). Aspergillus piperis A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen Pythium aphanidermatum. Archives of Biological Sciences, 68, 279-289.

Име и презиме другог ментора: dr Daniel Muller

Звање: доцент

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Keshavarz-Tohid, V., Vacheron, J., Dubost, A., Prigent-Combaret, C., Taheri, P., Tarighi, S., Taghavi, S.M., Moënne-Loccoz, Y., Muller D. (2019). Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the Pseudomonas putida clade supports the delineation of Pseudomonas alloputida sp. nov., Pseudomonas inefficax sp. nov., Pseudomonas persica sp. nov., and Pseudomonas shirazica sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 42, 468–480.
2. Bouffaud, M-L., Renoud, S., Dubost, A., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D. (2018). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producers associated to maize and other Poaceae species. Microbiome, 6, 114.

3. Keshavarz-Tohid, V., Taheri, P., Muller, D., Prigent-Combaret, C., Vacheron, J., Taghavi, S.M., Tarighi, S., Moënne-Loccoz, Y. (2017). Phylogenetic diversity and antagonistic traits of root and rhizosphere pseudomonads of bean from Iran for controlling Rhizoctonia solani. Research in Microbiology, 168, 760-772.

4. Almario, J., Bruto, M., Vacheron, J., Prigent-Combaret, C., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D. (2017). Distribution of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the Pseudomonas spp. reveals unexpected polyphyletism. Frontiers in Microbiology, 8, 1218.

5. Vacheron, J., Moënne-Loccoz, Y., Dubost, A., Gonçalves-Martins, M., Muller, D., PrigentCombaret, C. (2016). Fluorescent Pseudomonas strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. Frontiers in Plant Science, 7, 1212.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 26.10.2022 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: 32/11-5.1.
Датум: 26.10.2022. 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 26.10.2022. године, донело је

О Д Л У К У

I **ПРИХВАТА СЕ** тема докторске дисертације коју је поднела **ИРЕНА ТОДОРОВИЋ, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«АУТОХТОНЕ БАКТЕРИЈСКЕ ПОПУЛАЦИЈЕ У СУПРЕСИВНОСТИ ЗЕМЉИШТА ПРЕМА *Fusarium graminearum*».**

II За првог ментора се именује др Јелена Јовичић - Петровић, ванредни професор Универзитета у Београду - Пољопривредног факултета.

За другог ментора се именује др Daniel Muller, доцент Универзитета Claude Bernard 1, Лион, Француска.

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 Ирена Тодоровић, 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 земљиште и мелиорације, Студентској служби и архиви.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: _____
Дана: 31.08.2022. год.
Београд - Земун

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидаткиње Ирене Тодоровић, мастер инж.

На основу члана 44. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог већа Катедре за еколошку микробиологију и мишљења Наставно-научног већа Института за земљиште и мелиорације, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 29.06.2022. године, донело је одлуку бр. 32/9-4.3. да се образује Комисија у саставу: др Јелена Јовичић-Петровић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет (ужа научна област: еколошка микробиологија), др Вера Раичевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет (ужа научна област: еколошка микробиологија) и др Daniel Muller, доцент, Универзитет Claude Bernard1, Лион, Француска (ужа научна област: еколошка микробиологија), за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кадндидаткиње Ирене Тодоровић, мастер инж. под називом: "Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*".

Кандидаткиња је дана 05.07.2022. године одбранила пријављену тему докторске дисертације, а потписан записник предат је у Студентску службу 12.07.2022. У име Комисије, председник, др Јелена Јовичић-Петровић, ванредни професор, подноси следећи

И З В Е Ш Т А Ј

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

1.1. Биографија кандидата

Ирена Тодоровић је рођена 27. априла 1995. године у Београду. Завршила је Земунску гимназију 2014. године и исте године уписала Основне академске студије на Биолошком факултету, Универзитета у Београду, на студијском програму Биологија (модул Екологија). Дипломирала је 17. септембра 2018. године са просечном оценом 9,09 (девет и 09/100), и тиме стекла звање Дипломирани биолог. Током основних студија била је координатор Конгреса студената биологије „Симпласт", генерални секретар Организације за заштиту природе „Грин линк" и заменик председника Студентског парламента. Такође је била ангажована на стручним студентским праксама, као и на разним обукама из области неформалног образовања. Школске 2018/19. године уписала је Мастер академске студије на Пољопривредном факултету, Универзитета у Београду, на студијском програму Прехрамбена технологија (модул Микробиологија хране и животне средине). Мастер рад под називом „Могућности примене инокулума *Bacillus megaterium* и метаболита *Aspergillus piperis* у биопрајмингу семена" одбранила је 4. јула 2019. године са

оценом 10 (десет) и тиме стекла звање Мастер инжењер прехрамбене технологије. Током 2019/2020. године додељена јој је стипендија Владе Француске за удружене Докторске академске студије на Универзитету Claude Bernard Lyon 1 (Докторска школа Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation) и Универзитету у Београду (Пољопривредни факултет, студијски програм Мелиорације земљишта). Ирена Тодоровић говори енглески (Ц2 ниво) и француски (ниво Б2).

1.2. Предлог теме докторске дисертације

Комисија сматра да предложена тема докторске дисертације "Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*" у потпуности одговара предложеним циљевима, програму и предмету истраживања.

2. Предмет и циљ дисертације

2.1. Предмет и програм истраживања

Пољопривредни усеви су изложени великом броју земљишних фитопатогена, посебно оомицетама и гљивама, које је тешко контролисати. Врсте из рода *Fusarium* су типични земљишни микроорганизми који спадају међу фитопатогене који наносе највише штете усевима и који производе широк спектар микотоксина који могу бити присутни у храни за животиње, као и у прехрамбеним производима (Babadoost, 2018). *Fusarium graminearum*, узрочник фузариозне плесниви класа стрних жита (*Fusarium head blight*, FHB) и произвођач микотоксина, изазива огромне економске губитке усева пшенице широм света. Агроеколошки услови у Србији и Француској су повољни за развој фитопатогене и токсикогене врсте *F. graminearum* (Obradović et al., 2017; Boutigny et al., 2014).

Међутим, одређени земљишни микроорганизми могу се успешно такмичити са фитопатогенима, ометајући њихов развој и последично смањујући инфекцију биљке, што све упућује на дефинисање супресивних земљишта (Weller et al., 2002). Иако абиотички фактори, као што су физичко-хемијска својства земљишта, могу допринети супресији одређеног патогена, супресивност је у суштини феномен посредован земљишним микроорганизмима, пошто процеси стерилизације мењају статус супресивних земљишта у несупресивна (Ossowicki et al., 2020). Поред тога, агрономске праксе које повољно утичу на микробну активност, као што је нпр. додавање органске материје, могу подстаћи супресивност земљишта (Schlatter et al. 2017), док хемијска контрола пестицидима у пољопривредној производњи смањује способност земљишта да сузбије болести (Zhang et al., 2022). Концепт супресивних земљишта познат је скоро 60 година (Schlatter et al. 2017) и првобитно је дефинисан од стране Baker and Cook (1974) као „земљишта у којима патоген не опстаје; опстаје, али узрокује малу или никакву штету; или опстаје и узрокује болест неко време, али након тога болест је мање важна, иако патоген може опстати у земљишту." У овим земљиштима долази до супресије болести упркос присуству биљке домаћина, фитопатогена и услова средине погодних за развој болести (Schlatter et al. 2017). Описана су два типа супресивности земљишта: општа (заснована на целокупној микробној заједници) и специфична (заснована на одређеној микробној популацији), за

разлику од несупресивних земљишта код којих се болест редовно развија (Weller et al., 2002).

Супресивна земљишта представљају резервоар потенцијалних биоконтролних агенаса који би могли да обезбеде ефикасну заштиту биљака од различитих земљишних фитопатогена (Gómez Expósito et al., 2017). Овај потенцијал је од велике важности када су у питању фитопатогени попут *Fusarium* spp., који узрокују све већу штету усевима у контексту растућих климатских промена. Ефикасни биоконтролни агенси могу: (1) да индукују системску отпорност биљака тако што их стимулишу, (2) да ступају у компетицију са патогенима за простор и хранљиве материје, (3) да производе различите метаболите који делују антагонистички према биљним патогенима, или (4) да се директно боре против биљних патогена (Chenthamara and Druzhinina, 2016). Познато је да у региону Chateaurenard, у Француској, постоје супресивна земљишта, и сматра се да је ова супресивност резултат компетиције за хранљиве материје између целе микробиоте земљишта и *Fusarium* популације, као и резултат компетиције између патогених и непатогених *Fusarium* врста (Alabouvette, 1986). Осим тога, представници читавог низа бактеријских родова могу да обављају функције које резултирају супресијом болести изазваних гљивом *Fusarium*. На пример, познато је да врсте из родова *Bacillus*, *Paenibacillus* (Delgado-Ramirez et al., 2021) и *Streptomyces* (Cha et al., 2016) играју улогу у сузбијању болести изазваних овом гљивом путем различитих индиректних *Plant Growth Promoting* (PGP) механизама. Поред тога, ове бактерије такође показују низ директних PGP својстава, као што је солубилизација фосфата, производња индол сирћетне киселине или 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (ACC) деаминазе, чиме се поспешује раст биљака (Ahemad and Kibret, 2014). Поред наведених врста, познато је да врсте из рода *Pseudomonas* обављају широк спектар функција корисних по биљку, као и да имају важну улогу у ризосфери. На пример, познато је да различите врсте рода *Pseudomonas* имају способност да индукују системску отпорност код биљака, као и да производе велики број антифунгалних материја које би могле да инактивирају или инхибирају раст *Fusarium* (Vacheron et al., 2016). Ова разноврсност механизама деловања учинила је врсте рода *Pseudomonas* једним од најбољих кандидата за биолошку контролу још од 1970. године (Weller, 2007). Како би се открили различити механизми деловања PGP бактерија, анализа генома је веома корисна јер не само да омогућава карактеризацију функционалних особина, већ и идентификацију ових бактерија (Van Elsas et al., 2008).

Ефикасна контрола фитопатогене гљиве *Fusarium* је неопходна у покушају да се избегну губици усева и да се смањи производња микотоксина у прехрамбеним производима (Babadoost, 2018). Истраживања о супресивним земљиштима, заједно са подацима о примењеним агрономским праксама, дају корисне информације о томе како одржати или постићи већи ниво супресивности у већ супресивним земљиштима, или како формирати супресивна земљишта на другим локацијама. Учесталост патогена који се преносе земљиштем у усеву житарица је тешко контролисати због њихове постојаности у земљишту и неефикасности хемијских третмана (De Coninck et al., 2015), стога биолошка контрола постаје врло обећавајућа алтернатива за превенцију болести. Увид у динамику земљишта супресивних према *Fusarium*, заједно са разумевањем микробних механизама деловања, су неопходни како би се развили безбедни, ефикасни и стабилни алати за контролу фитопатогена (Gomez Expósito et al., 2017).

Ова докторска дисертација има за циљ да стекне увид у супресивност различитих земљишта у Србији, где супресивна земљишта још увек нису идентификована, и да

изолује и окарактерише потенцијалне биоконтролне сојеве који доприносе овој супресивности.

Предлаже се да план и програм истраживања обухвати следеће фазе:

Прва фаза: Испитивање супресивности земљишта у Србији према *F. graminearum* под усевом пшенице (*Triticum aestivum L.*)

Имајући у виду чињеницу да супресивна земљишта још увек нису идентификована у Србији, циљ ове фазе је идентификација земљишта супресивних према *F. graminearum* на локацијама у Србији, која су подвргнута различитим агрономским праксама. Добијени резултати о фунгистази, физичко-хемијским и микробиолошким карактеристикама могу послужити за друга истраживања али могу имати и практичан значај за пољопривредне произвођаче.

Друга фаза: Анализа бактеријских популација које доприносе супресивности земљишта

Имајући у виду да супресивна земљишта представљају ресурс за откривање корисних микроорганизама са разноврсним механизмима биолошке контроле и стимулације раста биљака, циљ ове фазе је изолација, карактеризација и идентификација микроорганизама из ризосфере пшенице. Као важан резултат ове фазе формираће се колекција бактеријских сојева са биоконтролном активношћу. Геноми одабраних сојева, биће у потпуности секвенционирани и анализирани.

Трећа фаза: Анализа популација *Pseudomonas* у супресивним и несупресивним земљиштима

Род *Pseudomonas* је познат по бројним механизмимима важним за супресију патогена, као и директним ефектима на биљку нпр. индукована системска резистенција, продукција фитохормона итд. због чега ће у току ове фазе посебан акценат бити на представницима рода *Pseudomonas*. Циљ ове фазе је формирање колекције сојева рода *Pseudomonas*. Различити *Pseudomonas* spp. биће изоловани из супресивних и несупресивних земљишта. Њихови геноми биће у потпуности секвенционирани и анализирани.

2.2. Научни циљ истраживања

У данашње време је већину земљишних фитопатогена тешко контролисати конвенционалним методама јер су оне често неефикасне и/или имају штетне ефекте на животну средину. Зато, одржива пољопривреда захтева методе које ће бити безбедне и ефикасне, померајући тако фокус на алтернативне методе за контролу болести, као што је биолошка контрола. Супресивна земљишта представљају најбољи пример природне заштите биљака засноване на микроорганизмима, али упркос чињеници да су супресивна земљишта позната већ скоро 60 година, она нису откривена на многим локалитетима, а микробна основа ове супресивности је и даље слабо испитана. У овом контексту, општи циљ ове докторске дисертације је да се идентификују земљишта супресивна према *F. graminearum* и да се изолују бактеријски сојеви потенцијално укључени у супресивност.

Поред изоловања бактеријских сојева, ово истраживање има за циљ да открије механизме који су потенцијално основа супресивности земљишта. Добијени резултати би требало да доведу до бољег разумевања интеракција између биљних патогена и корисних микроорганизама, омогућавајући потенцијалну употребу ових знања у одрживој заштити пољопривредних усева.

Очекивани резултати су да се идентификују земљишта супресивна према *F. graminearum* у Србији и да се формира колекција окарактерисаних бактеријских сојева који би могли да послуже као алтернативни начини сузбијања овог фитопатогена, али и за даља научна истраживања.

3. Основне хипотезе од којих се полази у истраживању

Докторска дисертација се темељи на следећим радним хипотезама:

Прва хипотеза: Земљишта која су супресивна према *Fusarium* врстама су описана (Kyselková and Moënne-Loccoz 2012; Cha et al. 2016) и могу се идентификовати посматрањем земљишта која немају пуно проблема са болестима изазваних овом гљивом (на основу запажања пољопривредника) или која су била подвргнута додавању органске материје у циљу повећања микробне разноврсности.

Друга хипотеза: Супресивна земљишта настају као последица деловања биотичких фактора, и као таква представљају резервоар обећавајућих биоконтролних агенаса против земљишних фитопатогена.

Трећа хипотеза: Геномска анализа изолата из супресивних земљишта може бити корисна за проучавање механизама супресивности.

Ове хипотезе су основа за постављање програма истраживања.

4. Материјал и методе које ће се користити у истраживању

<u>Узорковање земљишта</u>

Укупно ће бити узорковано 26 пољопривредних поља у Србији (на локацијама у околини Ваљева, Мионице, Чачка, Сомбора и Нових Карловаца), према њиховим пољопривредним параметрима (пшеница у ротацији, са/без стајњака). Површински оранични слој земљишта ће бити узоркован, просушен на ваздуху и просејан. На свакој локацији, пољопривредници ће попунити упитник о историјату поља, примени ђубрива и пестицида, управљању послежетвеним остацима и уоченом присуству фузариозе пшенице.

<u>Анализа фунгистазе</u>

За анализу фингистазе, инокулум *F. graminearum* ће бити припремљен према модификованом протоколу од Legrand et al. (2019). Како би се испитао утицај биотичке компоненте, фунгистаза ће се испитати у аутоклавираном и неаутоклавирном земљишту. Из сваког аутоклавираног и неаутоклавираног земљишта, на почетку огледа ће се узети четири узорка од по 1 g земљишта, како би се проверило претходно присуство *F. graminearum* у земљишту. Поред тога, узорковаће се и стартни инокулум *F. graminearum* како би се квантификовала количина која ће бити додата. Земљишта ће затим бити инокулисана припремљеним инокулумом *F. graminearum*, док ће неаутоклавирано, неинокулисано земљиште служити као контрола. Овако припремљена земљишта ће бити инкубирана на 20 °C, при влажности ваздуха од 60%, у условима мрака, током 15 дана, а затим ће бити извршено узорковање као и на почетку огледа. Укупна ДНК из узорака са почетка и краја огледа биће изолована коришћењем FastDNA Spin Kit for Soil® (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France), према упутству произвођача, а ДНК *F. graminearum* ће бити квантификована уз помоћ qPCR коришћењем прајмера Fg16N-F и

Fg16N-R (Nicholson et al. 1998). Добијене вредности количине ДНК у сваком узорку ће се користити за израчунавање фунгистазе према модификованом протоколу од Legrand et al. (2019).

In planta тест супресивности *F. graminearum*

На основу резултата теста фунгистазе и следећих критеријума: присуство несупресивног и супресивног земљишта, са/без додатог стајњака на истој локацији, изабрана земљишта ће се користити за извођење *in planta* огледа са *F. graminearum*. За овај оглед ће бити припремљена суспензија спора *F. graminearum* узгајањем гљиве у течној подлози Mung Bean Broth (MBB). Сто семена озиме пшенице (*Triticum aestivum L.*) сорте Recital биће распоређено у саксије напуњене са 250 g мешавине земље и песка (у односу 50:50), семена ће бити инокулисана са 100 µL припремљене суспензије спора, док ће неинокулисана семена служити као контрола. Биљке ће се редовно заливати током 2 недеље, а након тог периода за сваки третман ће се бележити појава полегања.

Изолација, формирање колекције и селекција биоконтролних сојева

На основу резултата претходних фаза истраживања, ризосфере пшенице из изабраних земљишта биће коришћене за изолацију бактерија. Екстракт ризосферног земљишта биће припремљен коришћењем модификованог протокола од Schlaeppi et al. (2015). Изолација бактеријских сојева ће се вршити методом децималног разблаживања и засејавања на стандардне подлоге (као што су хранљиви агар (ХА) и триптон соја агар (TCA)), као и на селективне подлоге за изоловање *Pseudomonas* spp. (као што су цитримид агар и King's B) и актиномицета (на скробно-амонијачном агару (СКА)). *Bacillus* spp. ће бити изолован пастеризацијом узорака ризосферног земљишта на 80°C током 10 минута и засејавањем на ХА. Селекција потенцијалних биоконтролних сојева за даљу карактеризацију биће обављена на основу конфронтацијског теста са *F. graminearum* на кромпир декстрозном агару (PDA). Свака конфронтација ће бити рађена у трипликату. Након 7 дана биће забележене примећене промене у расту и морфологији патогена, као што су: инхибиција раста (смањен пречник) или промене у спорулацији. Бактерије са најбољом антагонистичком активношћу биће одабране и даље окарактерисане.

Изолација и формирање колекције *Pseudomonas* spp. из супресивних и несупресивних земљишта

Изолација *Pseudomonas* spp. биће обављена коришћењем ризосфера пшенице из одабраних супресивних и несупресивних земљишта, у микротитарским плочама са 96 бунарића, према протоколу од Vacheron et al., 2016. Укратко, 20 µL екстракта сваког ризосферног земљишта (Schlaeppi et al., 2015) ће бити помешано са 180 µL King's B +++ [тј. King's B са додатком ампицилина (40 µg/mL), хлорамфеникола (13 µg/mL) и циклохексимида (100 µg/mL)], у микротитарској плочи и затим децимално разблажено. Након инкубације на 28 °C током 24 сата, 1 µL из сваког последњег позитивног бунарића биће засејан на King's B агар. Израсли сојеви ће бити насумично одабрани, три пута пречишћени и коришћени у даљим фазама истраживања.

Селекција *Pseudomonas* spp.

Геномска ДНК свих *Pseudomonas* spp. изолата ће бити изолована коришћењем *NucleoSpin 96 Tissue* кита (Macherey Nagel, France), а идентификација ће бити извршена

секвенционирањем *housekeeping* гена *rpoD* коришћењем прајмера rpoDf/rpoDr (Frapolli et al., 2007). Добијене *rpoD* секвенце ће бити поравнате коришћењем програма SeaView, биће ручно филтриране да би се одбациле празнине и региони ниског квалитета, а филогенетска стабла ће бити конструисана методом дистанце са 500 *bootstraps*. На основу резултата добијених током ове фазе, одабрани *Pseudomonas* spp. ће бити укључени у наредне фазе истраживања.

Карактеризација биоконтролних сојева и *Pseudomonas* spp.

Карактеризација одабраних биоконтролних и *Pseudomonas* spp. сојева ће подразумевати испитивање њихових PGP карактеристика. Карактеризација ће укључити процену солубилизације фосфата на NBRIP подлози (*National Botanical Research Institute's Phosphate*), процену производње HCN, производње екстрацелуларних протеаза на млечном агару и производње хитиназе, као што је описано у Vacheron et al., 2016. Затим, биће испитана и способност производње сидерофора према протоколу од Lakshmanan et al. (2015), производње целулазе (Guesmi et al., 2022) и производње ACC деаминазе према протоколу који су описали Penrose and Glick (2003). Супернатанти одабраних бактерија ће се користити за процену њиховог антагонизма према клијавости спора *F. graminearum*, у тесту са микротитар плочама, према протоколу Besset-Manzoni et al. (2019). Даље, инхибиторни ефекат испарљивих органских једињења (*Volatile Organic Compounds* (VOC)) произведених од стране бактеријских сојева према *F. graminearum* биће процењен у систему од две Петријеве посуде повезане и затворене парафилмом.

In planta биоконтролни тест са одабраним сојевима

На основу претходних фаза истраживања, одабрани биоконтролни и *Pseudomonas* spp. сојеви ће бити коришћени у *in planta* биоконтролном тесту против *F. graminearum*. За сваки третман, 30 семена пшенице сорте Sumai 3 биће распоређено у саксије напуњене са 150 g стерилног земљишта са локације у Француској, La Côte-Saint-André. За сваки *in vivo* оглед, бактеријске суспензије ће бити припремљене гајењем у триптон соја бујону (ТСБ) током 24 сата, након чега ће се у 10 mM раствору $MgSO_4$ припремити суспензија оптичке густине 1 при 600 nm, што одговара 10^8 ћелија/mL. Семе ће бити инокулисано директно наношењем по 100 µL одговарајућих бактеријских суспензија на свако семе (10^7 ћелија/семену). Истог дана ће бити додате споре *F. graminearum* узгајане у MBB (10^5 спора/семену). Као негативна контрола користиће се неинокулисано семе, док ће као позитивна контрола служити семе инокулисано само спорама *F. graminearum*. Биљке ће се редовно заливати током 2 недеље, а након тог периода за сваки третман ће се бележити појава полегања.

Секвенционирање генома одабраних сојева

Геномска ДНК из одабраних сојева биће изолована из преконоћне културе коришћењем *Nucleospin tissue* кита (Macherey-Nagel, France). Геномска ДНК ће бити секвенционирана коришћењем *Illumina NovaSeq* технологије, генеришући библиотеку парних крајева 2X150-bp. Софтвер Fastp верзија 0.23.1 ће се користити за скраћивање секвенци (подразумевана подешавања), а софтвер Unicycler верзија 0.5.0 за *de novo* асемблинг. Анотација генома ће бити урађена са MicroScope платформом верзија 3.15.4. Кодирање кластера гена за секундарне метаболите биће урађено коришћењем antiSMASH и MIBiG. Дистрибуција гена/кластера и анотација ће бити процењени за све сојеве

коришћене у овом истраживању упоређивањем (тј. путем blastP) протеинских секвенци (покривеност >80%; идентитет >50% у већини случајева) са протеинским секвенцама најближих референтних сојева на MicroScope платформи верзија 3.15.4.

Статистичка анализа

Добијени резултати ће се анализирати стандардним статистичким методама, применом анализе варијансе, поређењем средњих вредности, итд.

5. Очекивани резултати и научни допринос

Полазећи од постављених хипотеза и циљева, као и предложене савремене методологије, очекује се да ће резултати у значајној мери допринети сагледавању улоге аутохтоних бактеријских популација у супресивности земљишта према *F. graminearum*. Супресивна земљишта, која ће бити по први пут идентификована у Србији, послужиће као основа за даља истраживања и развој ове области у нашој земљи. Испитивање утицаја примене агрономске праксе уноса стајњака на супресивност, допринеће сагледавању могућности подстицања супресивности, што представља основу за смањење зависности пољопривредне производње од агрохемикалија. Значајан очекивани резултат са потенцијалом практичне примене као и научним значајем је и формирање колекције ризосферних бактеријских сојева са својствима стимулације биљног раста, као и колекције потенцијалних биоконтролних агенаса. Ово истраживање ће стога представљати и добру основу за примену великог потенцијала земљишних бактерија у сузбијању биљних патогена на еколошки прихватљив начин.

Испитивање механизама биолошке контроле и стимулације раста биљака, уз анализу генома, пружиће увид у недовољно разјашњене механизме којима ризосферне аутохтоне бактеријске популације потенцијално доприносе супресивности. Поред научног доприноса који се односи на испитивање поменутих механизама, у оквиру ове дисертације сагледаће се и могућности употребе одабраних сојева у биолошкој контроли *F. graminearum.*

6. Закључак

На основу анализе поднете пријаве, као и дискусије приликом одбране пријављене теме, Комисија сматра да је предложена тема докторске дисертације кандидаткиње Ирене Тодоровић, мастер инж., под називом „Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*“, оригинална и да је проблематика предложених истрживања значајна са научног и практичног значаја, отварајући ново поље за истраживање у Србији.

Циљеви и хипотезе од којих кандидаткиња полази правилно су постављени и усклађени са предложеним програмом рада. Предложене методе су савремене и одговарајуће за постизање задатих циљева. Предмет истраживања дистертације припада ужој научној области Еколошка микробиологија, а предложени програм истраживања чини заокружену целину која ће пружити научни допринос овој области.

Полазећи од наведених констатација, комисија позитивно оцењује поднету пријаву и предлаже Наставно-научном већу да Ирени Тодоровић, мастер инж., одобри израду

докторске дисертације, под насловом „Аутохтоне бактеријске популације у супресивности земљишта према *Fusarium graminearum*“.

Комисија за ментора 1 докторске дисертације предлаже др Јелену Јовичић-Петровић, ванредног професора Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и за ментора 2 др Daniel Muller, доцента Универзитета Claude Bernard 1, Лион, Француска.

7. Име и референце предложених ментора

Име и презиме ментора 1: **Јелена Јовичић-Петровић**
Звање: ванредни професор
Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Jovičić-Petrović, J.**, Karličić, V., Petrović, I., Ćirković, S., Ristić-Đurović, J., Raičević, V. (2021). Biomagnetic priming – possible strategy to revitalize old mustard seeds. *Bioelectromagnetics, 42,* 238-249.
2. Karličić, V., Zlatković, M., **Jovičić-Petrović, J.**, Nikolić, M.P., Orlović, S., Raičević, V. (2021). *Trichoderma* spp. from Pine Bark and Pine Bark Extracts: Potent Biocontrol Agents against Botryosphaeriaceae. *Forests, 12,* 1731.
3. Milinkovic, M., Lalevic, B., **Jovicic-Petrovic, J.,** Golubovic-Curguz, V., Kljujev, I., Raicevic, V. (2018). Biopotential of compost and compost products derived from horticultural waste – effect on plant growth and plant pathogens' suppression. *Process Safety and Environmental Protection, 121,* 299-306.
4. Kljujev, I., Raicevic, V., **Jovicic-Petrovic, J.**, Vujović, B., Mirkovic, M., Rothballer, M. (2018). Listeria monocytogenes – Danger for health safety vegetable production. *Microbial pathogenesis, 120,* 23-31.
5. **Jovicic-Petrovic, J.**, Jeremic, S., Vuckovic, I., Vojnovic, S., Bulajic, A., Raicevic, V., Nikodinovic-Runic, J. (2016). Aspergillus piperis A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen Pythium aphanidermatum. *Archives of Biological Sciences, 68,* 279-289.

Име и презиме ментора 2: **Daniel Muller**
Звање**:** доцент
Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Keshavarz-Tohid, V., Vacheron, J., Dubost, A., Prigent-Combaret, C., Taheri, P., Tarighi, S., Taghavi, S.M., Moënne-Loccoz, Y., **Muller D.** (2019). Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas alloputida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology, 42,* 468–480.
2. Bouffaud, M-L., Renoud, S., Dubost, A., Moënne-Loccoz, Y., **Muller, D.** (2018). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producers associated to maize and other *Poaceae* species. *Microbiome, 6,* 114.
3. Keshavarz-Tohid, V., Taheri, P., **Muller, D.**, Prigent-Combaret, C., Vacheron, J., Taghavi, S.M., Tarighi, S., Moënne-Loccoz, Y. (2017). Phylogenetic diversity and antagonistic traits of root and rhizosphere pseudomonads of bean from Iran for controlling *Rhizoctonia solani*. *Research in Microbiology, 168,* 760-772.

4. Almario, J., Bruto, M., Vacheron, J., Prigent-Combaret, C., Moënne-Loccoz, Y., **Muller, D.** (2017). Distribution of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the *Pseudomonas* spp. reveals unexpected polyphyletism. *Frontiers in Microbiology, 8,* 1218.
5. Vacheron, J., Moënne-Loccoz, Y., Dubost, A., Gonçalves-Martins, M., **Muller, D.**, Prigent-Combaret, C. (2016). Fluorescent Pseudomonas strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Frontiers in Plant Science, 7,* 1212.

Београд - Земун
Дана 31.08.2022. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

_____
др Јелена Јовичић-Петровић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(Ужа научна област: Еколошка микробиологија)

_____
др Вера Раичевић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(Ужа научна област: Еколошка микробиологија)

_____
др Daniel Muller, доцент
Универзитет Claude Bernard 1, Лион, Француска
(Ужа научна област: Еколошка микробиологија)

Прилози:
Прилог 1. Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидаткиње
Прилог 2. Списак литературе која ће се користити у истраживањима

Прилог 1
Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидаткиње

Kljujev. I., Jovičić-Petrović. J., Lalević. B., Karličić. V., **Todorović. I.**, Prijepoljac. M., Raičević, V. (2021). Microbiological Quality, Ecological Status, and Potential Sources of Contamination of the River Water. 12th Eastern European Young Water Professionals Conference, Riga, Latvia, 31 March-2 April 2021. Proceedings, pp. 22-29, ISBN: 978-9934-22-618-2.

Прилог 2
Списак литературе која ће се користити у истраживањима

Alabouvette, C. (1986). *Fusarium*-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: review of a 10-year study. Agronomie, EDP Sciences. 6(3), 273-284.

Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University - Science, 26(1), 1–20.

Babadoost, M. (2018). *Fusarium*: Historical and Continued Importance. *Fusarium* - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers. 10.5772/intechopen.74147.

Baker, K. & Cook, R. J. (1974). Biological Control of Plant Pathogens. New York, NY: WH Freeman and Company, 433.

Besset-Manzoni, Y., Joly, P., Brutel, A., Gerin, F., Soudière, O., Langin, T., et al. (2019). Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat protection against *Fusarium* seedling blight by soil bacteria. PLoS ONE 14(12), e0225655.

Boutigny, A.L., Ward, T.J., Ballos, N., Iancu, G. & Ioos, R. (2014). Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. Eur. J. Plant Pathol, 138, 133–148.

Cha, J.Y., Han, S., Hong, H. J. et al. (2016). Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil. ISME J,10**,** 119–129.

Chenthamara, K., & Druzhinina, I. S. (2016). 12 Ecological Genomics of Mycotrophic Fungi. Environmental and Microbial Relationships, 215–246.

De Coninck, B., Timmermans, P., Vos, C., Cammue, B. P. A., and Kazan, K. (2015). What lies beneath: belowground defense strategies in plants. Trends Plant Sci. 20, 91–101.

Delgado-Ramírez, C.S., Hernández-Martínez, R., Sepúlveda, E. (2021). Rhizobacteria Associated with a Native Solanaceae Promote Plant Growth and Decrease the Effects of *Fusarium oxysporum* in Tomato. *Agronomy***,** *11*, 579.

Frapolli, M., Défago, G., and Moënne-Loccoz, Y. (2007). Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. Environ. Microbiol. 9, 1939–1955.

Gómez Expósito, R., de Bruijn, I., Postma, J., & Raaijmakers, J. M. (2017). Current Insights into the Role of Rhizosphere Bacteria in Disease Suppressive Soils. Frontiers in Microbiology, 8, 2529.

Guesmi, S., Mahjoubi, M., Pujić, P., Cherif, A., Normand, P., Sghaier, H., & Boubakri, H. (2022). Biotechnological potential of *Kocuria rhizophila* PT10 isolated from roots of *Panicum turgidum*. International Journal of Environmental Science and Technology, 1-14.

Kyselková, M. & Moënne-Loccoz, Y. (2012) *Pseudomonas* and other microbes in disease-suppressive soils. In Sustainable Agriculture Reviews, Vol. 9, Organic Fertilisation, Soil Quality and Human Health. Lichtfouse, E. (ed.). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 93–140.

Lakshmanan, V., Shantharaj, D., Li, G., Seyfferth L.A., Sherrieri A. L., Bais, H.P. (2015): A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). Planta 242, 1037–1050.

Legrand, F., Chen, W., Cobo-Díaz, J.F., Picot, A., & Floch, G.L. (2019). Co-occurrence analysis reveal that biotic and abiotic factors influence soil fungistasis against *Fusarium graminearum*. FEMS Microbiology Ecology, 95 (5).

Nicholson, P., Simpson, D., Weston, G., Rezanoor, H., Lees, A., Parry, D., & Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiological and Molecular Plant Pathology, 53(1), 17–37.

Obradović A., S. Stanković, V. Krnjaja, A. Nikolić, D. Ignjatović-Micić, J. Stepanović and B. Duduk. (2017). Trichothecene chemotype diversity of *Fusarium graminearum* isolated from wheat, maize and barley in Serbia.- Genetika, Vol 49, No.1., 355-364.

Ossowicki, A., Tracanna, V., Petrus, M.L.C., van Wezel, G., Raaijmakers, J.M., Medema, M.H., Garbeva, P. (2020). Microbial and volatile profiling of soils suppressive to *Fusarium culmorum* of wheat. Proc. R. Soc. B 287: 20192527.

Penrose, M. D. & Glick, R. B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase- containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum 118, 10-15.

Schlatter. D., Kinkel. L., Thomashow. L., Weller. D. & Paulitz. T. (2017). Disease Suppressive Soils: New Insights from the Soil Microbiome. Phytopathology.107(11), 1284-1297.

Schlaeppi, K. & Bulgarelli, D. (2015): The plant microbiome at work. Molecular Plant-Microbe Interactions (28):3, 212–217.

Vacheron. J., Moënne-Loccoz. Y., Dubost. A., Gonçalves-Martins. M., Muller. D. and Prigent-Combaret C. (2016). Fluorescent *Pseudomonas* Strains with only Few Plant-Beneficial Properties Are Favored in the Maize Rhizosphere. Front. Plant Sci. 7, 1212.

Van Elsas, J. D., Jansson, J., Sjöling, S., Bailey, M., Nalin, R., Vogel, T., Costa, R., & Van Overbeek, L. S. (2008). The metagenomics of disease-suppressive soils - Experiences from the Metacontrol project. *Trends in Biotechnology*, *26*(11), 591-601.

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 40(1), 309–348.

Weller, D.M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. Phytopathology 97, 250–256.

Zhang, Z., Zhang, Q., Cui, H., Li, Y., Xu, N., Lu, T., Chen, J., Penuelas, J., Hu, B., & Qian, H. (2022). Composition identification and functional verification of bacterial community in disease-suppressive soils by machine learning. *Environmental microbiology.*

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE
Number: _____
Date: August 31, 2022
Belgrade-Zemun

TO THE TEACHING-SCIENTIFIC COUNCIL OF THE FACULTY

Subject: A report by the Committee evaluating the scientific basis of the subject of the doctoral dissertation of candidate Irena Todorović, M.Eng.

In accordance with the Article 44. Paragraph 1. of the Regulations on the Rules of Doctoral Studies of the Faculty of Agriculture, and on the proposal of the Department of Environmental Microbiology and the opinion of the Teaching-Scientific Council of the Institute for Soil and Melioration, the Teaching-Scientific Council of the Faculty at the meeting held on June 29, 2022, made decision no. 32/9-4.3. to form a Committee composed of: Dr. Jelena Jovičić-Petrović, associate professor, University of Belgrade - Faculty of Agriculture (scientific field: environmental microbiology), Dr. Vera Raičević, full professor, University of Belgrade - Faculty of Agriculture (scientific field: environmental microbiology) and Dr. Daniel Muller, assistant professor, Université Claude Bernard1, Lyon, France (scientific field: environmental microbiology), for the evaluation of the scientific basis of the subject of the doctoral dissertation of candidate Irena Todorović, M.Eng., entitled: "Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum*".

On July 5, 2022, the candidate defended the submitted subject of the doctoral dissertation, and the signed minutes were submitted to the Student Services Department on July 12, 2022. On behalf of the Committee, the president, Dr. Jelena Jovičić-Petrović, associate professor, submits the following

REPORT

1. General information on the candidate and doctoral dissertation

1.1. Candidate's biography

Irena Todorović was born on April 27th, 1995 in Belgrade, Republic of Serbia. She graduated from Zemun High School in 2014 and that same year she was enrolled in Bachelor studies at the Faculty of Biology, University of Belgrade, study program Biology, module Ecology. She graduated on September 17, 2018, with an average score of 9.09 (nine and 09/100), earning the title Graduated biologist. During her undergraduate studies, she was the Coordinator of the Congress of Biology Students "Simplast", General secretary of the Nature Conservation Organization "Green Link" and Deputy president of the Student's Parliament. She was also engaged in vocational student practices, as well as in various trainings in the field of informal education. During the 2018/19 school year, she was enrolled in the Master's Program at the Faculty of Agriculture, University of Belgrade, at study program Food Technology, module Food and Environmental Microbiology. She defended her master thesis entitled "Possibilities for application of *Bacillus megaterium* inoculum and *Aspergillus piperis* metabolites in seed

biopriming" on July 4, 2019 with a score of 10 (ten), gaining the title Master engineer of technology. During the year 2019/2020 she was granted a French Government Scholarship for a joint PhD program at University Claude Bernard Lyon 1 (Doctoral school Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation) and University of Belgrade (Faculty of Agriculture, study program of Soil management). Irena Todorović speaks English (C2 level) and French (B2 level).

1.2. Proposal of the doctoral dissertation subject

The Committee finds that the proposed subject of the doctoral dissertation titled "Indigenous bacterial populations in soil supressiveness to *Fusarium graminearum*" fully corresponds to the proposed objectives, program and subject of the research.

2. Subject and objectives of the doctoral dissertation

2.1. Program and subject of the research

Crop plants are exposed to a wide range of soil-borne phytopathogens, particularly oomycetes and fungi, which are difficult to control. Species from the fungal genus *Fusarium* are typical soil microorganisms which are among the most destructive phytopathogens, and they produce a wide variety of mycotoxins, which may be present in feed and food products (Babadoost, 2018). *Fusarium graminearum*, causal agent of *Fusarium* Head Blight and mycotoxin producer is causing huge economic losses of wheat crops throughout the world. In Serbia and France, agroecological conditions are favorable for development of phytopathogenic and toxicogenic *F. graminearum* (Obradović et al., 2017; Boutigny et al., 2014).

However, certain soil microorganisms may successfully inhibit phytopathogens, thus disturbing their development and consequently reducing the following plant infection, all of which leads to defining soils that are suppressive to disease (Weller et al., 2002). Although abiotic factors, such as soil physicochemical properties, may contribute to the suppression of a given pathogen, suppressiveness is essentially a phenomenon mediated by soil microorganisms, since sterilization processes turn suppressive into non-suppressive soils (Ossowicki et al., 2020). Additionally, agronomic practices which are increasing microbial activity, e.g. the use of organic amendments, may enhance suppressiveness (Schlatter et al. 2017), while the use of pesticides in agricultural production reduces the soil's ability to control diseases (Zhang et al., 2022). The concept of soils that are suppressive to soil-borne diseases has been known for almost 60 years (Schlatter et al., 2017) and they were originally defined by Baker and Cook (1974) as “soils in which the pathogen does not establish or persist, establishes but causes little or no damage, or establishes and causes disease for a while but thereafter the disease is less important, although the pathogen may persist in the soil.” In these soils, disease suppression occurs despite the presence of the host plant, phytopathogen and environmental conditions convenient for disease development (Schlatter et al., 2017). Two types of soil suppressiveness have been described: general (*microbial-community-based*) and specific (*microbial-population-based*), contrary to non-suppressive soils where disease regularly develops (Weller et al., 2002).

Suppressive soils represent a reservoir of promising biocontrol agents which could provide an effective plant protection against various soil-borne phytopathogens (Gómez Expósito et al., 2017). This potential is of great importance when considering phytopathogens like

Fusarium spp., which are causing increasing damage to crops in the on-going climate change context. Thus, efficient biocontrol agents may (1) induce plants' resistance by stimulating it, (2) compete with pathogens for space and nutrients, (3) produce various metabolites antagonistic to plant pathogens, or (4) directly combat plant pathogens (Chenthamara and Druzhinina, 2016). It is known that soils suppressive to *Fusarium* disease of various crops exist in Chateaurenard region of France and this suppressiveness is mostly considered to be driven by competition for nutrients between the whole soil microbiota and *Fusarium* population and intrageneric competition between pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* species (Alabouvette, 1986). Besides, representatives of a range of bacterial groups can carry out functions that result in the suppression of *Fusarium*-caused diseases. For example, species from the genus *Bacillus*, *Paenibacillus* (Delgado-Ramirez et al., 2021) and *Streptomyces* (Cha et al., 2016) are well known to play role in the suppression of *Fusarium* – caused diseases through various indirect Plant Growth Promoting (PGP) mechanisms. On top of that, these bacteria also exhibit a number of direct PGP properties, such as phosphorus solubilization, Indole Acetic Acid (AIA) or 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase production, therefore facilitating the plant growth (Ahemad and Kibret, 2014). Besides before mentioned species, it is known that species from the genus *Pseudomonas* have a wide range of phytobeneficial functions and an important role in the rhizosphere. For example, it is known that various *Pseudomonas* species have the ability to induce systemic resistance in plants and can produce a large panel of antifungal substances that could inactivate or inhibit *Fusarium* growth (Vacheron et al., 2016). This diversity of modes of action has made *Pseudomonas* species one of the best candidates for biological control since the 1970s (Weller, 2007). To reveal different modes of action of bacteria, genome analysis is useful because not only does it allow characterization of PGP functional traits, but also their identification (Van Elsas et al., 2008).

Efficient management of plant diseases caused by *Fusarium* species is substantial in an attempt to avoid crop losses and to reduce mycotoxin production in alimentary products (Babadoost, 2018). Research on suppressive soils, altogether with the data about the agronomic practices applied, provide useful information on how to maintain or achieve greater level of suppressiveness in already suppressive soils, or how to establish suppressive character of soils at other sites. The prevalence of soil-borne pathogens in cereal crops is difficult to control due to their persistence in soil and the inefficiency of chemical treatments (De Coninck et al., 2015), therefore biological control becomes a very promising alternative for disease prevention. Insight into dynamics of soils suppressive to *Fusarium* diseases, together with the understanding of microbial modes of action is needed in order to develop safe, effective, and stable tools for disease management (Gomez Expósito et al., 2017).

This PhD project aims to gain insight into the suppressiveness across a range of soils in Serbia, where suppressive soils have not yet been identified, and to obtain and characterize biocontrol strains contributing to soil suppressiveness.

Suggested parts of the Ph.D. project are described below:

Part 1. Analysis of soil suppressiveness to *F. graminearum* under the wheat crops (*Triticum aestivum L.*). in Serbia

Given the fact that suppressive soils have not yet been identified in Serbia, the aim of this part is to identify soils suppressive to *F. graminearum* at locations in Serbia, which are subjected to various agronomic practices. The obtained data on fungistasis, physicochemical and microbiological characteristics can be used as a basis for further research, but can also have practical significance for farmers.

Part 2. Analysis of bacterial populations contributing to soil suppressiveness

Having in mind that suppressive soils represent a source of beneficial microorganisms with various mechanisms of biological control and stimulation of plant growth, the goal of this phase is isolation, characterization and identification of microorganisms from wheat rhizosphere. As an important result of this phase, a collection of bacterial strains with biocontrol activity will be formed. The genomes of the selected strains will be fully sequenced and analyzed.

Part 3. Analysis of *Pseudomonas* populations in suppressive and non-suppressive soils

The genus *Pseudomonas* is known for its numerous mechanisms of the pathogen suppression, as well as for its direct effects on the plant, e.g. induced systemic resistance, phytohormone production, etc. which is why during this part, special emphasis will be placed on the representatives of the genus *Pseudomonas*. The goal of this part is to form a collection of strains from the genus *Pseudomonas*. Various *Pseudomonas* spp. will be isolated from suppressive and non-suppressive soils. Their genomes will be fully sequenced and analyzed.

2.2. Scientific objectives of the research

Nowadays, most soil-borne phytopathogens are hard to control by conventional strategies as these methods are often inefficient and/or have adverse effects on the environment. For those reasons, sustainable agriculture urges for control methods that will be safe and efficient, thus shifting focus on alternative methods for disease control, such as the biological control. Suppressive soils represent the best example of natural microbe-based plant defense, but despite the fact that suppressive soils have been known for almost 60 years, they have not been discovered at many sites, and the microbial basis of suppressiveness remains poorly understood. In this context, the general objective of this Ph.D. project is to identify soils suppressive to *F. graminearum* and to obtain strains potentially involved in soil suppressiveness.

Besides obtaining biocontrol agents, this research aims to reveal potential soil suppressiveness mechanisms. The results obtained should lead to a better understanding of the interactions between plant pathogens and phytoprotective organisms, enabling the potential use of this knowledge for sustainable protection of agricultural crops.

Expected results are to identify *F. graminearum* - suppressive soils in Serbia and to form a collection of characterized strains which could serve as alternative ways of controlling this phytopathogen, and as a basis for further scientific research.

3. Hypotheses

This PhD project is based on the following working hypothesis:

First hypothesis: *Fusarium*-suppressive soils are documented (Kyselková and Moënne-Loccoz 2012; Cha et al. 2016) and can be identified by screening of soils with limited disease problems (based on farmers' observations) or that have undergone organic matter-based management aiming at enhancing microbial diversity.

Second hypothesis: Soil suppressiveness is driven by biotic factors and suppressive soils represent a reservoir of promising antagonists against soil-borne phytopathogens.

Third hypothesis: Genomic analysis of microbial isolates from suppressive soils can be useful to explore soil suppressiveness mechanisms.

These hypotheses serve as a basis for establishing the research program.

4. Material and methods that will be used during the research

Soil sampling

A total of 26 agricultural fields in Serbia (at locations near Valjevo, Mionica, Čačak, Sombor and Novi Karlovci) will be sampled, according to their agronomic parameters (wheat in a crop rotation, with/without manure). Surface organic layer of soil will be sampled, air-dried, and sieved. At each location, the farmers will fill in the questionnaire about the recent cropping history, fertilizers and pesticides application, management of postharvest residues and the observed presence of wheat fusariosis.

Fungistasis assay

For the fungistasis assay, the *F. graminearum* inoculum will be prepared according to a modified protocol by Legrand et al. (2019). In order to test the impact of the biotic component, fungistasis will be examined in autoclaved as well as in non-autoclaved soil. At the beginning of the experiment, from each autoclaved and non-autoclaved soil, four samples of 1 g of soil will be taken, in order to check the previous presence of *F. graminearum* in the soil. Additionally, an initial *F. graminearum* inoculum will be sampled to quantify the amount that will be added. Then, the soils will be inoculated with the prepared *F. graminearum* inoculum, while the non-autoclaved, uninoculated soils will serve as a control. All soils will be incubated at 20°C, humidity of 60%, in dark conditions, for 15 days, and then the sampling will be performed as at the beginning of the experiment. Total DNA from the beginning and end of the experiment will be isolated using FastDNA Spin Kit for Soil® (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France), according to the manufacturer's instructions, and *F. graminearum* DNA will be quantified by qPCR using primers Fg16N-F and Fg16N-R (Nicholson et al. 1998). The obtained values of the amount of DNA in each sample will be used to calculate the fungistasis according to a modified protocol by Legrand et al. (2019).

In planta suppressiveness assay with *F. graminearum*

Based on the results of the fungistasis assay and on the following criteria: presence of conducive vs. suppressive soils, with/without manure at the same location, chosen soils will be used to perform *in planta* assay with *F. graminearum*. For this, *F. graminearum* spore suspension will be prepared by growing the fungus in Mung Bean Broth (MBB). Hundred seeds of winter wheat (*Triticum aestivum L.*) cultivar Récital will be distributed in pots filled with 250 g of soil-sand mixture (in ratio 50:50), seeds will be inoculated with 100 µL of the prepared spore suspension, while uninoculated seeds will serve as a control. Wheat plants will be watered regularly for 2 weeks, and after that period, the dumping off will be noted for each treatment.

Isolation, formation of bacterial collection and selection of biocontrol strains

Based on the results of the previous phases of research, wheat plants from chosen soils will be used for bacterial isolation. These plants will be harvested, and their rhizospheres will be used for further manipulations and bacterial isolation. Rhizosphere soil extract will be prepared using an adapted protocol from Schlaeppi et al. (2015). Isolation of bacterial strains will be done by serial dilution methods on general purpose media (such as Nutrient Agar and Tryptone Soya Agar), as well as on selective media for isolating *Pseudomonas* spp. (on Citrimide Agar and King's B) and actinomycetes (on Starch Ammonia Agar). *Bacillus* spp. will be isolated by pasteurizing the rhizosphere soil samples on 80°C for 10 minutes and plating it on Nutrient Agar.

Selection of potential biocontrol strains for further characterization will be done based on dual culture confrontation test with pathogen *F. graminearum* on Potato Dextrose Agar (PDA) plate. Each confrontation will be performed in triplicates. After 7 days, observed changes in pathogen growth and morphology, such as: inhibited growth (reduced diameter) or changes in sporulation, will be noted. Bacteria with the best antagonistic activity will be selected and further characterized.

Isolation and formation of bacterial collection of *Pseudomonas* spp. from suppressive and non-suppressive soils

Isolation of *Pseudomonas* spp. will be done using wheat plants from chosen suppressive and conducive soils, in 96-well microtiter plates, according to a protocol by Vacheron et al., 2016. In brief, 20 µL of each rhizosphere soil extract (Schlaeppi et al., 2015) will be mixed with 180 µL of King's B+++ [i.e., King's B supplemented with ampicillin (40 µg/mL), chloramphenicol (13 µg/mL) and cycloheximide (100 µg/mL)], in a microtiter plate and then serially diluted. After incubation at 28 °C for 24h, 1 µL from each last positive well will be plated on King's B agar. Grown strains will be randomly picked, they will be purified three times consecutively and used in further phases of the research.

Selection of *Pseudomonas* spp.

Genomic DNA of all *Pseudomonas* spp. isolates will be extracted using NucleoSpin 96 Tissue kit (Macherey Nagel, France) and identification will be performed by sequencing the housekeeping gene *rpoD* using primers rpoDf/rpoDr (Frapolli et al., 2007). *rpoD* sequences will be aligned with SeaView, they will be manually filtered to discard gaps and aligned regions of low quality and the phylogenetic trees will be constructed with Distance method and 500 bootstraps. Based on the results obtained during this phase, chosen *Pseudomonas* will be included in the next phases of the research.

Characterization of biocontrol strains and *Pseudomonas* spp.

Chosen biocontrol and *Pseudomonas* spp. strains will be further tested for their PGP properties. Characterization will include assessment of phosphate solubilization on NBRIP media (National Botanical Research Institute's Phosphate), assessment of production of HCN, production of extracellular protease on Milk agar and production of chitinase, as described in Vacheron et al., 2016. Besides, characterization will include assessment of siderophores production according to a protocol by Lakshmanan et al. (2015), production of cellulase (Guesmi et al., 2022) and production of ACC deaminase according to a protocol described by Penrose and Glick (2003). Supernatants of chosen bacteria will be used to assess their antagonism potential on *F. graminearum* spore germination, in a microplate test, according to a protocol by Besset-Manzoni et al. (2019). Furthermore, inhibitory effect of Volatile Organic Compounds (VOC) produced by bacterial strains towards *F. graminearum* will be assessed in a system of two Petri dishes sealed together with parafilm.

In planta biocontrol assay with chosen strains

Based on the previous phases of research, chosen biocontrol and *Pseudomonas* strains will be used for *in planta* protection assay against *F. graminearum*. For each treatment, 30 seeds of wheat cultivar Sumai 3 will be distributed in pots filled with 150 g of a sterile soil from location in France, La Côte-Saint-André. For each *in vivo* assay, bacterial suspension will be

prepared by growing in Trypton Soya Broth (TSB) for 24 hours and adjusting optical density to 1 at 600 nm in 10 mM $MgSO_4$, which corresponds to 10^8 cells/mL. Bacteria will be inoculated directly onto each seed (10^7 cells/seed) with 100 µL of prepared suspensions. The same day, *F. graminearum* spores grown in MBB (10^5 spores/seed) will be added. As a negative control, uninoculated seeds will be used, while seeds inoculated only with *F. graminearum* spores will serve as a positive control. Plants will be watered regularly for 2 weeks, and after that period, the dumping off will be noted for each treatment.

Genome sequencing of selected strains

Genomic DNA extraction from chosen strains will be done from an overnight culture using a Nucleospin tissue kit (Macherey-Nagel, France). Genomic DNA will be sequenced using Illumina NovaSeq technology, generating a 2X150-bp paired-end library. Fastp version 0.23.1 software will be used for trimming sequences (default settings) and Unicycler software version 0.5.0 for *de novo* assembly. Genome annotation will be done with the MicroScope platform version 3.15.4. Gene cluster coding for secondary metabolites will be identified using antiSMASH and MIBiG. Genes/clusters distribution and annotation will be assessed for all of the strains used in this study by comparing (*i.e. via* blastP) protein sequences (coverage >80%; identity >50% in most cases) with protein sequences of closest reference strains on the MicroScope platform version 3.15.4.

Statistical analysis

Obtained results will be analyzed with standard statistical methods, using the analysis of variance, mean comparison tests, etc.

5. Expected results and scientific contribution

Based on the set hypotheses and objectives, as well as the proposed modern methodology, it is expected that the results will significantly contribute to the understanding of the role of indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *F. graminearum*. Suppressive soils, which will be identified for the first time in Serbia, will serve as a basis for further research and development of this field in our country. Examining the impact of manure amendments on suppressiveness will contribute to the understanding of possibillities to enhance suppressiveness, which is the basis for reducing the dependence of agricultural production on agrochemicals. A significant expected result with the potential for practical application as well as scientific importance is the formation of a collection of rhizosphere bacterial strains with plant growth stimulation properties, as well as a collection of potential biocontrol agents. Therefore, this research will pave the way for the application of promising soil bacteria in suppressing plant pathogens in an environmentally friendly way.

Research on the mechanisms of biological control and plant growth stimulation, along with genome analysis, will provide insight into insufficiently elucidated mechanisms by which rhizosphere indigenous bacterial populations potentially contribute to suppressiveness. In addition to the scientific contribution abovementioned, the possibilities of application of selected strains in the biological control against *F. graminearum* will also be examined.

6. Conclusion

Based on the analysis of the submitted application, as well as the discussion during the defense of the submitted subject, the Committee considers that the proposed subject of the doctoral dissertation of candidate Irena Todorović, M.Eng., entitled "Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum*", is original and that the subject of the proposed research is significant from a scientific and practical point of view, opening a new field of research in Serbia.

The initial objectives and hypotheses are correctly set and aligned with the proposed work program. The proposed methods are modern and suitable for achieving the set objectives. The subject of the research belongs to the scientific field of Environmental Microbiology, and the proposed research program represents a unity that will provide a scientific contribution to this field.

Based on the beforementioned observations, the Committee positively evaluates the submitted application and suggests to the Teaching-Scientific Board to approve the preparation of doctoral dissertation, entitled "Indigenous bacterial populations in soil suppressiveness to *Fusarium graminearum*" to candidate Irena Todorović, M.Eng.

The Committee proposes Jelena Jovičić-Petrović, Ph.D., associate professor at the Faculty of Agriculture, University of Belgrade, as supervisor 1 of the doctoral dissertation, and Daniel Muller, Ph.D., assistant professor at Claude Bernard University 1, Lyon, France, as supervisor 2.

7. Name and bibliography of proposed supervisors

Name and surname of the supervisor 1: **Jelena Jovičić-Petrović**
Title: associate professor
The list of publications that qualify the supervisor for managing the doctoral dissertation:

1. **Jovičić-Petrović, J.**, Karličić, V., Petrović, I., Ćirković, S., Ristić-Đurović, J., Raičević, V. (2021). Biomagnetic priming – possible strategy to revitalize old mustard seeds. *Bioelectromagnetics, 42*, 238-249.
2. Karličić, V., Zlatković, M., **Jovičić-Petrović, J.**, Nikolić, M.P., Orlović, S., Raičević, V. (2021). *Trichoderma* spp. from Pine Bark and Pine Bark Extracts: Potent Biocontrol Agents against Botryosphaeriaceae. *Forests, 12*, 1731.
3. Milinkovic, M., Lalevic, B., **Jovicic-Petrovic, J.,** Golubovic-Curguz, V., Kljujev, I., Raicevic, V. (2018). Biopotential of compost and compost products derived from horticultural waste – effect on plant growth and plant pathogens' suppression. *Process Safety and Environmental Protection, 121*, 299-306.
4. Kljujev, I., Raicevic, V., **Jovicic-Petrovic, J.**, Vujović, B., Mirkovic, M., Rothballer, M. (2018). Listeria monocytogenes – Danger for health safety vegetable production. *Microbial pathogenesis, 120*, 23-31.
5. **Jovicic-Petrovic, J.**, Jeremic, S., Vuckovic, I., Vojnovic, S., Bulajic, A., Raicevic, V., Nikodinovic-Runic, J. (2016). Aspergillus piperis A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen Pythium aphanidermatum. *Archives of Biological Sciences, 68*, 279-289.

Name and surname of the supervisor 2: **Daniel Muller**
Title: assistant professor
The list of publications that qualify the supervisor for managing the doctoral dissertation:

1. Keshavarz-Tohid, V., Vacheron, J., Dubost, A., Prigent-Combaret, C., Taheri, P., Tarighi, S., Taghavi, S.M., Moënne-Loccoz, Y., **Muller, D.** (2019). Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas alloputida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology, 42,* 468–480.
2. Bouffaud, M-L., Renoud, S., Dubost, A., Moënne-Loccoz, Y., **Muller D.** (2018). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producers associated to maize and other *Poaceae* species. *Microbiome, 6,* 114.
3. Keshavarz-Tohid, V., Taheri, P., **Muller, D.**, Prigent-Combaret, C., Vacheron, J., Taghavi, S.M., Tarighi, S., Moënne-Loccoz, Y. (2017). Phylogenetic diversity and antagonistic traits of root and rhizosphere pseudomonads of bean from Iran for controlling *Rhizoctonia solani*. *Research in Microbiology, 168,* 760-772.
4. Almario, J., Bruto, M., Vacheron, J., Prigent-Combaret, C., Moënne-Loccoz, Y., **Muller, D.** (2017). Distribution of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the *Pseudomonas* spp. reveals unexpected polyphyletism. *Frontiers in Microbiology, 8,* 1218.
5. Vacheron, J., Moënne-Loccoz, Y., Dubost, A., Gonçalves-Martins, M., **Muller, D.**, Prigent-Combaret, C. (2016). Fluorescent Pseudomonas strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Frontiers in Plant Science, 7,* 1212.

Belgrade-Zemun
Date: August 31, 2022

COMMITTEE MEMBERS

_____
Dr. Jelena Jovičić-Petrović, associate professor
University of Belgrade - Faculty of Agriculture
(Scientific field: Environmental microbiology)

_____
Dr. Vera Raičević, full professor
University of Belgrade - Faculty of Agriculture
(Scientific field: Environmental microbiology)

_____
Dr. Daniel Muller, assistant professor
Université Claude Bernard 1, Lyon, France
(Scientific field: Environmental microbiology)

Supplementary data:
Supplement 1. List of announced and published scientific and professional papers of the candidate
Supplement 2. List of literature that will be used during the research

Supplement 1.
List of announced and published scientific and professional papers of the candidate

Kljujev. I., Jovičić-Petrović. J., Lalević. B., Karličić. V., **Todorović. I.**, Prijepoljac. M., Raičević, V. (2021). Microbiological Quality, Ecological Status, and Potential Sources of Contamination of the River Water. 12th Eastern European Young Water Professionals Conference, Riga, Latvia, 31 March-2 April 2021. Proceedings, pp. 22-29, ISBN: 978-9934-22-618-2.

Supplement 2.
List of literature that will be used during the research

Alabouvette, C. (1986). *Fusarium*-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: review of a 10-year study. Agronomie, EDP Sciences. 6(3), 273-284.

Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University - Science, 26(1), 1–20.

Babadoost, M. (2018). *Fusarium*: Historical and Continued Importance. *Fusarium* - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers. 10.5772/intechopen.74147.

Baker, K. & Cook, R. J. (1974). Biological Control of Plant Pathogens. New York, NY: WH Freeman and Company, 433.

Besset-Manzoni, Y., Joly, P., Brutel, A., Gerin, F., Soudière, O., Langin, T., et al. (2019). Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat protection against *Fusarium* seedling blight by soil bacteria. PLoS ONE 14(12), e0225655.

Boutigny, A.L., Ward, T.J., Ballos, N., Iancu, G. & Ioos, R. (2014). Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. Eur. J. Plant Pathol, 138, 133–148.

Cha, J.Y., Han, S., Hong, H. J. et al. (2016). Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil. ISME J,10**,** 119–129.

Chenthamara, K., & Druzhinina, I. S. (2016). 12 Ecological Genomics of Mycotrophic Fungi. Environmental and Microbial Relationships, 215–246.

De Coninck, B., Timmermans, P., Vos, C., Cammue, B. P. A., and Kazan, K. (2015). What lies beneath: belowground defense strategies in plants. Trends Plant Sci. 20, 91–101.

Delgado-Ramírez, C.S., Hernández-Martínez, R., Sepúlveda, E. (2021). Rhizobacteria Associated with a Native Solanaceae Promote Plant Growth and Decrease the Effects of *Fusarium oxysporum* in Tomato. *Agronomy***,** *11*, 579.

Frapolli, M., Défago, G., and Moënne-Loccoz, Y. (2007). Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. Environ. Microbiol. 9, 1939–1955.

Gómez Expósito, R., de Bruijn, I., Postma, J., & Raaijmakers, J. M. (2017). Current Insights into the Role of Rhizosphere Bacteria in Disease Suppressive Soils. Frontiers in Microbiology, 8, 2529.

Guesmi, S., Mahjoubi, M., Pujić, P., Cherif, A., Normand, P., Sghaier, H., & Boubakri, H. (2022). Biotechnological potential of *Kocuria rhizophila* PT10 isolated from roots of *Panicum turgidum*. International Journal of Environmental Science and Technology, 1-14.

Kyselková, M. & Moënne-Loccoz, Y. (2012) *Pseudomonas* and other microbes in disease-suppressive soils. In Sustainable Agriculture Reviews, Vol. 9, Organic Fertilisation, Soil Quality and Human Health. Lichtfouse, E. (ed.). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 93–140.

Lakshmanan, V., Shantharaj, D., Li, G., Seyfferth L.A., Sherrieri A. L., Bais, H.P. (2015): A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). Planta 242, 1037–1050.

Legrand, F., Chen, W., Cobo-Díaz, J.F., Picot, A., & Floch, G.L. (2019). Co-occurrence analysis reveal that biotic and abiotic factors influence soil fungistasis against *Fusarium graminearum*. FEMS Microbiology Ecology, 95 (5).

Nicholson, P., Simpson, D., Weston, G., Rezanoor, H., Lees, A., Parry, D., & Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiological and Molecular Plant Pathology, 53(1), 17–37.

Obradović A., S. Stanković, V. Krnjaja, A. Nikolić, D. Ignjatović-Micić, J. Stepanović and B. Duduk. (2017). Trichothecene chemotype diversity of *Fusarium graminearum* isolated from wheat, maize and barley in Serbia.- Genetika, Vol 49, No.1., 355-364.

Ossowicki, A., Tracanna, V., Petrus, M.L.C., van Wezel, G., Raaijmakers, J.M., Medema, M.H., Garbeva, P. (2020). Microbial and volatile profiling of soils suppressive to *Fusarium culmorum* of wheat. Proc. R. Soc. B 287: 20192527.

Penrose, M. D. & Glick, R. B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase- containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum 118, 10-15.

Schlatter. D., Kinkel. L., Thomashow. L., Weller. D. & Paulitz. T. (2017). Disease Suppressive Soils: New Insights from the Soil Microbiome. Phytopathology.107(11), 1284-1297.

Schlaeppi, K. & Bulgarelli, D. (2015): The plant microbiome at work. Molecular Plant-Microbe Interactions (28):3, 212–217.

Vacheron. J., Moënne-Loccoz. Y., Dubost. A., Gonçalves-Martins. M., Muller. D. and Prigent-Combaret C. (2016). Fluorescent *Pseudomonas* Strains with only Few Plant-Beneficial Properties Are Favored in the Maize Rhizosphere. Front. Plant Sci. 7, 1212.

Van Elsas, J. D., Jansson, J., Sjöling, S., Bailey, M., Nalin, R., Vogel, T., Costa, R., & Van Overbeek, L. S. (2008). The metagenomics of disease-suppressive soils - Experiences from the Metacontrol project. *Trends in Biotechnology, 26*(11), 591-601.

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 40(1), 309–348.

Weller, D.M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. Phytopathology 97, 250–256.

Zhang, Z., Zhang, Q., Cui, H., Li, Y., Xu, N., Lu, T., Chen, J., Penuelas, J., Hu, B., & Qian, H. (2022). Composition identification and functional verification of bacterial community in disease-suppressive soils by machine learning. *Environmental microbiology.*