

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Jovana G. Hrustić, dipl. inž.

**Karakterizacija vrsta roda *Monilinia*  
patogena koštičavih voćaka u Srbiji i  
osetljivost na fungicide**

Doktorska disertacija

BEOGRAD, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Jovana G. Hrustić, BSc.

**Characterization of *Monilinia* species  
pathogens of stone fruits in Serbia  
and sensitivity to fungicides**

Doctoral Dissertation

BELGRADE, 2013

Poljoprivredni fakultet – Beograd

Mentor: dr Aleksandra Bulajić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Drugi mentor: dr Brankica Tanović, naučni saradnik  
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

Članovi komisije: dr Goran Delibašić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Branka Krstić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Ivana Stanković, docent  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:

*Ova doktorska disertacija urađena je u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine u Zemunu.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Brankici Tanović koja me je uvela u naučnoistraživački rad, koja je kao mentor rukovodila izradom doktorske disertacije i pružila mi neizmernu stručnu pomoć, znanje i iskustvo.*

*Najlepše hvala mentoru prof. dr Aleksandri Bulajić na dragocenoj pomoći, podršci i korisnim savetima prilikom izrade ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem prof. dr Goranu Delibašiću na izuzetnom angažovanju i usmeravanju tokom izrade rada.*

*Veoma sam zahvalna članovima komisije, prof. dr Branki Krstić i dr Ivani Stanković, na stručnoj pomoći, korisnim savetima i primedbama.*

*Na nesebičnoj pomoći i uloženom trudu zahvaljujem prof. dr Mihailu Nikoliću (Poljoprivredni fakultet, Beograd), dr Slavici Gašić (Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd), dr Andrea Patocchi i dr Maya Jänsch (Agroscope Changins-Wädenswil Research Station, Wädenswil, Švajcarska).*

*Zahvaljujem svim kolegama iz Instituta na pomoći i razumevanju, posebno kolegama iz Laboratorije za primenjenu fitopatologiju. Naročitu zahvalnost želim da izrazim Milici Mihajlović i Mili Grahovac, vernim saradnicama čija su pomoć i podrška značajno doprinele stvaranju ove disertacije.*

*Hvala mojoj porodici i prijateljima na podršci, strpljenju i razumevanju.*

# KARAKTERIZACIJA VRSTA RODA *Monilinia* PATOGENA KOŠTIČAVIH VOĆAKA U SRBIJI I OSETLJIVOST NA FUNGICIDE

## REZIME

Prikupljanje obolelih delova koštičavih voćaka sa simptomima sušenja cvetova, grana i grančica i mrke truleži plodova, koje prouzrokuju vrste roda *Monilinia*, obavljeno je tokom trogodišnjeg perioda od 2010. do 2012. godine. Pregledom 119 lokaliteta iz 15 okruga u Srbiji, prikupljen je 321 uzorak obolelih biljnih delova kako iz komercijalnih zasada, tako i iz okućnica i sa zelenih pijaca. Dobijeno je ukupno 246 monosporijalnih izolata sa morfološkim odlikama vrsta roda *Monilinia*. Sa ciljem utvrđivanja rasprostranjenosti vrsta roda *Monilinia* i rasvetljavanja etiologije oboljenja u našoj zemlji, izvršena je identifikacija dobijenih izolata do nivoa vrste na osnovu patogenih, morfoloških, odgajivačkih i ekoloških karakteristika, sa jedne strane, i molekularnih karakteristika, sa druge strane. Na osnovu svih proučenih karakteristika utvrđeno je prisustvo tri različite vrste: *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*. Dominantan prouzrokovač mrke truleži plodova i sušenja cvetova, grana i grančica koštičavih voćaka u Srbiji je *M. laxa* (prisutna u 96,34% uzoraka), dok je zastupljenost ostalih vrsta ovog roda znatno manja – *M. fructigena* (2,44% uzoraka) i *M. fructicola* (1,22% uzoraka). Po prvi put u Srbiji, detektovano je prisustvo *M. fructicola*, patogena sa IA dela I Liste karantinskih štetnih organizama, na koštičavim voćkama u našoj zemlji. Analiza SSR markera pokazala je da izolati *M. fructicola* iz Srbije pripadaju haplotipu iz Italije, što ukazuje na mogući put introdukcije ovog karantinskog patogena u Srbiju.

Tri vrste roda *Monilinia* mogu se jasno razdvojiti na osnovu kompleksa morfoloških karaktera koji obuhvata: izgled, oblik i boju kolonije, prisustvo spora i koncentričnog prstena spora u kulturi, brzinu porasta micelije, kao i veličinu konidija, načina klijanja konidija i dužinu kličine cevčice pre prvog grananja. Međutim, za pouzdanu i brzu detekciju može se preporučiti Multiplex PCR metoda koja je prilagođena i uspešno primenjena za specifično dokazivanje prisustva *Monilinia* spp. na koštičavim voćkama u Srbiji.

Osetljivost izolata vrsta roda *Monilinia* na prochloraz, tebukonazol, iprodion, hlorotalonil, azoksistrobin, boskalid i fluopiram ispitana je metodom inhibicije porasta micelije. Ustanovljeno je da su izolati sve tri vrste najosetljiviji na prochloraz i tebukonazol, a visoka osetljivost utvrđena je i na iprodion, hlorotalonil i azoksistrobin. Sa druge strane, uočena je jasna razlika između vrsta roda *Monilinia* u osetljivosti na boskalid i fluopiram.

U *in vitro* ispitivanjima efekta gasovite faze 56 etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp. sedam etarskih ulja (pet ulja origana, ulje timijana i limunove trave) potpuno je inhibiralo porast micelije izolata sve tri testirane vrste. Sa druge strane, ispitivanja *in vitro* efekta formulisanih etarskih ulja origana i timijana pokazala su da formulisana ulja ispoljavaju bolji efekat u odnosu na komercijalno dostupan preparat ulja čajnog drveta i podjednako dobar efekat inhibicije porasta micelije u poređenju sa standardnim fungicidom iprodionom.

Rezultati ispitivanja uticaja različitih sojeva *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp. u *in vitro* i *in vivo* uslovima pokazuju da *B. subtilis* soj N146 ispoljava najjači antagonizam. Procesom formulacije poboljšane su osobine soja N146, a dobijene formulacije bile su efikasnije od sirove suspenzije *B. subtilis*. Ispitivanja efekata razvijenih formulacija na *Monilinia* spp. u *in vitro* i *in vivo* uslovima potvrdila su visok potencijal ovih biopreparata za suzbijanje vrsta roda *Monilinia*.

**Ključne reči:** *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia fructicola*, morfološke osobine, testovi patogenosti, filogenetske analize, SSR markeri, fungicidi, etarska ulja, *Bacillus subtilis*

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Fitopatologija

**UDK:** 632.952:634.57(497.11)(043.3)

## CHARACTERIZATION OF *Monilinia* SPECIES PATHOGENS OF STONE FRUITS IN SERBIA AND SENSITIVITY TO FUNGICIDES

### ABSTRACT

The diseased plant parts of stone fruits expressing symptoms of blossom, branch and twig blight and fruit brown rot, caused by the species from the genus *Monilinia*, were collected during a three-year period (from 2010 to 2012). Screening of 119 localities within 15 districts in Serbia was completed; 321 samples of diseased plant parts from commercial orchards, as well as from house yards and green markets, were collected. In total, 246 monosporial isolates with morphological characteristics resembling to those of *Monilinia* spp. were obtained. These isolates were identified at the species level based on their pathogenic, morphological, cultural and ecological characteristics; however, identification based on their molecular characteristics was also performed. This two-level identification was conducted in order to determine the distribution of the *Monilinia* species in Serbia and to clarify etiology of the disease they cause. According to their characteristics, the presence of three different species was determined: *M. laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*. The dominant causal agent of fruit brown rot and blossom, branch and twig blight of stone fruits in Serbia was *M. laxa* (it was present in 96.34% samples) while the presence of *M. fructigena* (2.44% samples) and *M. fructicola* (1.22% samples) was smaller. It was the first time in Serbia that *M. fructicola*, a pathogen from IA part of the List I of quarantine pest organisms on stone fruit species in our country, was registered. Moreover, the analysis of SSR markers showed that *M. fructicola* isolates originating from Serbia belonged to the same haplotype as the isolates originating from Italy, which indicated a possible path of introduction of this species to Serbia.

Three species of *Monilinia* genus could be clearly distinguished on the basis of the complexity of morphological characters (colony appearance, shape and colour, presence of spores and concentric ring of spores in a culture, mycelial growth rate, conidia size, mode of conidia germination and length of germ tube). However, Multiplex PCR method adjusted and successfully applied for specific attestation of

presence of *Monilinia* spp. on stone fruit species in Serbia, can be recommended for reliable and rapid detection.

Sensitivity of *Monilinia* species to prochloraz, tebuconazole, iprodione, chlorothalonil, azoxystrobin, boscalid and fluopyram was tested using mycelial growth inhibition method. It was found that isolates of all three tested species were the most sensitive to prochloraz and tebuconazole, but high sensitivity was also recorded for iprodione, chlorothalonil and azoxystrobin. On the other hand, clear differences among three *Monilinia* species in sensitivity to boscalid and fluopyram were observed.

In *in vitro* studies of effects of the volatile phase of essential oils on *Monilinia* spp. isolates, showed that 7 out of 56 tested essential oils (5 oregano oils, thyme and lemon grass oil) completely inhibited mycelial growth of isolates of all three tested species. On the other hand, *in vitro* assays of effects of formulated oregano and thyme essential oils showed that formulated oils were more efficient than the commercially available product based on tea tree oil, and that they were equally efficient as standard fungicide iprodione.

The results of studying the effects of different strains of *Bacillus subtilis* on *Monilinia* spp. isolates *in vitro* and *in vivo* showed that *B. subtilis* strain N146 exhibited the strongest antagonism. The formulation process of the raw suspension of *B. subtilis* strain N146 further improved its characteristics and the obtained formulated product proved to be more efficient than the raw suspension of *B. subtilis*. Investigations of the developed formulation on *Monilinia* spp. in both *in vitro* and *in vivo* assays confirmed high potential of this product in *Monilinia* spp. control.

**Keywords:** *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia fructicola*, morphological characteristics, pathogenicity tests, phylogenetic analyses, SSR markers, fungicides, essential oils, *Bacillus subtilis*

**Scientific field:** Biotechnical Science

**Scientific discipline:** Phytopathology

**UDC:** 632.952:634.57(497.11)(043.3)



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b>	3
2.1. Privredni značaj i botanička klasifikacija koštičavih voćaka	3
2.2. Privredni značaj koštičavih voćaka u Srbiji	3
2.3. <i>Monilinia</i> spp. prouzrokovač sušenja cvetova, grana i grančica i mrke truleži plodova koštičavih voćaka	4
2.4. Geografska distribucija i ekonomski značaj vrsta roda <i>Monilinia</i>	6
2.5. Simptomi oboljenja	8
2.6. Ciklus razvoja patogena	10
2.7. Identifikacija vrsta roda <i>Monilinia</i>	13
2.8. Mogućnosti suzbijanja vrsta roda <i>Monilinia</i>	17
2.8.1. Stvaranje otpornih sorti	18
2.8.2. Agrotehničke mere	18
2.8.3. Fizičke mere	20
2.8.4. Biološke mere	21
2.8.5. Hemijsko suzbijanje	24
2.9. Osobine najčešće korišćenih fungicida za suzbijanje <i>Monilinia</i> spp.	28
2.9.1. Benzimidazoli	28
2.9.2. Dikarboksimidi	29
2.9.3. Imidazoli i triazoli	30
2.9.4. Strobilurini	32
2.9.5. Pirimidil-etil-benzamidi	34
2.9.6. Karboksamidi	34
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	36
<b>4. MATERIJAL I METODE</b>	37
4.1. Sakupljanje uzoraka obolelih biljaka	37
4.2. Izolacija patogena	37
4.3. Dobijanje čistih kultura monosporijalnih izolata i njihovo čuvanje	38
4.4. Provera patogenosti izolata	38
4.5. Identifikacija patogena	39
4.6. Morfološke karakteristike izolata <i>Monilinia</i> spp.	41
4.7. Praćenje brzine rasta izolata <i>Monilinia</i> spp.	42
4.8. Odgajivačke karakteristike izolata <i>Monilinia</i> spp.	42
4.9. Ekološke karakteristike izolata <i>Monilinia</i> spp.	43
4.10. Testovi unakrsne patogenosti	44
4.11. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija	45
4.11.1. Molekularna detekcija i identifikacija	45
4.11.2. Priprema izolata	45
4.11.3. Izolacija DNK	46
4.11.4. Molekularna detekcija primenom Multiplex PCR reakcije	46
4.11.5. Molekularna detekcija na osnovu amplifikacije ITS regiona	47

4.11.6. Vizualizacija i analiza produkata PCR reakcije	47
4.11.7. Prečišćavanje PCR produkta i sekvencioniranje	48
4.11.8. Molekularna identifikacija i karakterizacija	49
4.11.9. SSR marker analiza izolata <i>Monilinia fructicola</i> poreklom iz Srbije	50
4.12. Utvrđivanje nivoa osetljivosti izolata <i>Monilinia</i> spp. na fungicide	52
4.12.1. Ispitivanje osetljivosti izolata na azoksistrobin u prisustvu salicilhidroksamične kiseline (SHAM)	53
4.13. Određivanje minimalne fungistatične i minimalne letalne koncentracije fungicida na izolate <i>Monilinia</i> spp.	54
4.14. Utvrđivanje antifungalnog uticaja etarskih ulja na izolate <i>Monilinia</i> spp.	55
4.14.1. <i>In vitro</i> efekat gasovite faze etarskih ulja na izolate <i>Monilinia</i> spp.	55
4.14.2. Određivanje minimalnog perioda ekspozicije	56
4.14.3. Proces formulacije etarskih ulja origana i timijana	56
4.14.4. <i>In vitro</i> efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate <i>Monilinia</i> spp.	56
4.14.5. <i>In vivo</i> efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate <i>Monilinia</i> spp.	57
4.15. Utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na izolate <i>Monilinia</i> spp.	57
4.15.1. Pripremanje sojeva <i>Bacillus subtilis</i>	57
4.15.2. Pripremanje izolata <i>Monilinia</i> spp.	58
4.15.3. <i>In vitro</i> utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na izolate <i>Monilinia</i> spp.	58
4.15.4. <i>In vivo</i> utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na izolate <i>Monilinia</i> spp.	58
4.15.5. Razvoj formulacije preparata na bazi <i>Bacillus subtilis</i>	59
4.15.6. Ispitivanje efekata formulacija <i>Bacillus subtilis</i> na <i>Monilinia</i> spp. <i>in vitro</i>	60
4.15.7. Ispitivanje efikasnosti formulisanih preparata na bazi <i>Bacillus subtilis</i> u suzbijanju <i>Monilinia</i> spp. <i>in vivo</i>	60
4.16. Statistička obrada podataka	61
<b>5. REZULTATI</b>	62
5.1. Simptomi oboljenja	62
5.2. Izolacija patogena i dobijanje monosporijalnih izolata	64
5.3. Provera patogenosti	66
5.4. Izolati <i>Monilinia</i> spp.	69
5.5. Morfološke karakteristike izolata <i>Monilinia</i> spp.	69
5.6. Praćenje brzine rasta izolata <i>Monilinia</i> spp.	74
5.7. Odgajivačke karakteristike izolata <i>Monilinia</i> spp.	75
5.8. Ekološke karakteristike izolata <i>Monilinia</i> spp.	82
5.9. Unakrsna patogenost izolata <i>Monilinia</i> spp.	90
5.10. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija	94
5.10.1. Molekularna detekcija primenom Multiplex PCR reakcije	94
5.10.2. Molekularna detekcija na osnovu amplifikacije ITS regiona	95
5.10.3. Molekularna identifikacija	96
5.10.4. Molekularna karakterizacija	98

5.10.5. SSR marker analiza izolata <i>Monilinia fructicola</i> poreklom iz Srbije	101
5.11. Utvrđivanje nivoa osetljivosti izolata <i>Monilinia</i> spp. na fungicide	101
5.12. Određivanje minimalne fungistatične i minimalne letalne koncentracije fungicida na izolate <i>Monilinia</i> spp.	108
5.13. Utvrđivanje antifungalnog uticaja etarskih ulja na izolate <i>Monilinia</i> spp.	109
5.13.1. <i>In vitro</i> efekat gasovite faze etarskih ulja na izolate <i>Monilinia</i> spp.	109
5.13.2. Određivanje minimalnog perioda ekspozicije	111
5.13.3. Proces formulacije etarskih ulja origana i timijana	111
5.13.4. <i>In vitro</i> efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate <i>Monilinia</i> spp.	112
5.13.5. <i>In vivo</i> efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate <i>Monilinia</i> spp.	113
5.14. Utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na izolate <i>Monilinia</i> spp.	115
5.14.1. <i>In vitro</i> utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na izolate <i>Monilinia</i> spp.	115
5.14.2. <i>In vivo</i> utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na izolate <i>Monilinia</i> spp.	116
5.14.3. Ispitivanje efekata formulacija <i>Bacillus subtilis</i> na <i>Monilinia</i> spp. <i>in vitro</i>	119
5.14.4. Ispitivanje efikasnosti formulisanih preparata na bazi <i>Bacillus subtilis</i> u suzbijanju <i>Monilinia</i> spp. <i>in vivo</i>	121
<b>6. DISKUSIJA</b>	124
6.1. <i>Monilinia</i> spp. – geografska distribucija i značaj patogena	124
6.2. Identifikacija patogena primenom konvencionalnih metoda	126
6.2.1. Morfološke karakteristike izolata <i>Monilinia</i> spp.	127
6.2.2. Odgajivačke i ekološke karakteristike izolata <i>Monilinia</i> spp.	129
6.2.3. Patogene karakteristike izolata <i>Monilinia</i> spp.	130
6.2.4. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija	131
6.3. Rasprostranjenost vrsta roda <i>Monilinia</i> u Srbiji	134
6.4. Osetljivost izolata <i>Monilinia</i> spp. na fungicide	134
6.5. Biološke mere borbe	137
6.5.1. Antifungalni efekat etarskih ulja na izolate <i>Monilinia</i> spp.	138
6.5.2. Uticaja različitih sojeva bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na izolate <i>Monilinia</i> spp.	139
<b>7. ZAKLJUČAK</b>	141
<b>8. LITERATURA</b>	145
BIOGRAFIJA	
IZJAVE	

## 1. UVOD

Koštičave voćke apsolutno dominiraju u ukupnoj voćarskoj proizvodnji u Srbiji, kako po broju stabala, tako i po količini proizvedenih plodova. Međutim, proizvodnju koštičavih voćaka ugrožava veliki broj patogena među kojima se posebno ističu vrste roda *Monilinia*, široko rasprostranjene u svim voćarskim regionima sveta. Tri vrste roda *Monilinia*, u godinama sa povoljnim uslovima za njihov razvoj, mogu u potpunosti da unište prinos (**Ogawa et al.**, 1995; **Hong et al.**, 1997; **Balaž**, 2000; **Larena et al.**, 2005). Mada su vrste ovog roda kao paraziti koštičavih voćaka intenzivno proučavane u mnogim delovima sveta, o njihovoj raširenosti, interspecijskoj i intraspecijskoj varijabilnosti u Srbiji nema dovoljno informacija. Oskudni su i podaci o njihovoj osetljivosti na najznačajnije grupe fungicida, kao i o mogućnostima biološke, odnosno ekološki prihvatljivije zaštite koštičavih voćaka.

Ekonomski najznačajnija i najrasprostranjenija vrsta roda *Monilinia* na koštičavim voćkama u Evropi je *M. laxa* (**Byrde and Willetts**, 1977). Međutim, od 2001. godine, kada je *M. fructicola* po prvi put dospela na evropski kontinent (**EPPO**, 2002), došlo je do značajnih promena u strukturi populacije i diverzitetu vrsta roda *Monilinia* na koštičavim voćkama u mnogim zemljama Evrope (**Muñoz et al.**, 2008; **Petróczy et al.**, 2012; **Villarino et al.**, 2012; **Poniatowska et al.**, 2013). U našoj zemlji na koštičavim voćkama prisutne su dve vrste roda *Monilinia* – *M. laxa* i *M. fructigena* (**Stojanović i Kostić**, 1957), dok je *M. fructicola*, patogen sa IA dela I Liste karantinskih štetnih organizama, tek nedavno detektovana kako na plodovima koštičavih (**Hrustić et al.**, 2013), tako i na plodovima jabučastih voćaka (**Vasić et al.**, 2012). Ipak, kakav je međuodnos ovih vrsta na pojedinim domaćinima u Srbiji za sada nije poznato.

Dobro poznavanje svih činilaca koji direktno ili indirektno utiču na razvoj oboljenja predstavlja neophodan preduslov za uspeh u sprečavanju šteta koje prouzrokuju *Monilinia* spp. Primena adekvatnih agrotehničkih mera trebalo bi da omogući izbegavanje napada i stvaranje nepovoljnih uslova za razvoj oboljenja. Međutim, uspeh zaštite u najvećoj meri zavisi od pravovremene primene fungicida koji treba da obezbede adekvatnu zaštitu, visok prinos i kvalitetan plod. U praksi se protiv *Monilinia* spp. koriste fungicidi visokog rizika za razvoj rezistentnosti, a vrste ovog

roda svrstane su u kategoriju patogena sa umerenim rizikom (**FRAC**, 2005). S obzirom da je primena fungicida najvažaniji deo programa zaštite koštičavih voćaka od vrsta roda *Monilinia*, poznavanje osetljivosti patogena na fungicide pruža neophodne informacije o očekivanoj efikasnosti fungicida.

Sa druge strane, pooštreni kriterijumi bezbednosti hrane nameću potrebu za racionalizacijom upotrebe pesticida kao i za primenom supstanci prirodnog porekla kao zamene ili dopune konvencionalnim pesticidima (**Russell**, 2005). U našoj zemlji ima malo podataka o upotrebi mikroorganizama i supstanci prirodnog porekla u zaštiti koštičavih voćaka od *Monilinia* spp.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Privredni značaj i botanička klasifikacija koštičavih voćaka

Koštičave vrste voćaka predstavljaju značajnu grupu voćarskih kultura koje se gaje više od 5000 godina. Najznačajnije vrste ove grupe pripadaju rodu *Prunus* i to su: šljiva (*P. domestica*), višnja (*P. cerasus*), trešnja (*P. avium*), breskva (*P. persica*), nektarina (*P. persica* var. *nectarina*) i kajsija (*P. armeniaca*). Postojbina ovih vrsta je Kina i centralna Azija, osim šljive koja vodi poreklo iz Evrope (Veličković, 2002).

Sve vrste koštičavih voćaka imaju veliki značaj pre svega u ishrani ljudi kao stono voće, ali se veliki deo plodova i prerađuje. Od ukupne količine proizvedenih plodova 30% utroši se u svežem stanju ili kao zamrznuto, dok se oko 70% preradi u slatko, marmeladu, džem, kompot, žele, sok, liker i rakiju (Veličković, 2002).

Tokom poslednjih desetak godina proizvodnja koštičavog voća ima tendenciju porasta sa 27,64 miliona tona proizvedenih 2000. godine na 40,21 milion tona proizvedenih 2011. godine (FAOSTAT, 2011).

Najveći udeo u proizvodnji koštičavog voća ima breskva koja u ukupnoj svetskoj proizvodnji zauzima osmo mesto. Prema podacima FAOSTAT (2011) u svetu je u 2011. godini proizvedeno 21,52 miliona tona. Najveći proizvođač je Kina, a za njom slede Italija, Španija, SAD, Grčka, Turska, Iran, Egipat, Čile, Francuska itd. Srbija se na ovoj listi nalazi na 26. mestu, sa ukupnom proizvodnjom od 75.233 t.

Šljiva je sledeća vrsta po ukupnom udelu u proizvodnji koštičavog voća sa proizvodnjom od 11,35 miliona tona tokom 2011. godine (FAOSTAT, 2011). Vodeći proizvođač šljive u svetu je Kina, zatim slede SAD i Srbija koja je vodeći proizvođač u Evropi sa ukupnom proizvodnjom od 581.874 t tokom 2011. godine.

Kajsija, trešnja i višnja imaju manji udeo u ukupnoj proizvodnji koštičavog voća – 3,83; 2,24 i 1,27 miliona tona tokom 2011. godine (FAOSTAT, 2011), dok su najveći proizvođači Turska, Iran i Italija.

### 2.2. Privredni značaj koštičavih voćaka u Srbiji

Voćarska proizvodnja predstavlja značajnu poljoprivrednu granu u našoj zemlji koja na relativno malom prostoru, na pet miliona ha poljoprivrednog zemljišta ima oko

250.000 ha voćnjaka sa približno 86 miliona rodni stabala (Lukač Bulatović, 2005). Zahvaljujući povoljnim agroekološkim uslovima za gajenje svih kontinentalnih vrsta voćaka u Srbiji postoji vekovima duga tradicija proizvodnje i prerade voća i interesovanje poljoprivrednika za bavljenje voćarstvom (Nikolić i sar., 2012).

U ukupnoj voćarskoj proizvodnji u Srbiji, koštičave vrste voćaka apsolutno dominiraju kako po broju stabala tako i količini proizvedenih plodova (Nikolić i sar., 2012). Šljiva je najvažnija voćka ove grupe koja prema ukupnom broju stabala i prosečnoj godišnjoj proizvodnji plodova već duži niz godina zauzima vodeće mesto i predstavlja jedan od najznačajnijih izvoznih artikala. Učešće šljive u strukturi voćarskih zasada u Srbiji iznosi 61,76% (Lukač Bulatović, 2005), a po ukupnoj godišnjoj proizvodnji koja u poslednjih pet godina premašuje 500.000 t, naša zemlja zauzima treće mesto u svetu i prvo mesto u Evropi (FAOSTAT, 2011).

Druga najvažnija voćka ove grupe je višnja sa značajnom zastupljenošću u ukupnoj proizvodnji od 7,64%, zatim sledi breskva (4,76%), dok je zastupljenost ostalih vrsta, kajsije i trešnje, ispod 3,36% (Lukač Bulatović, 2005).

### **2.3. *Monilinia* spp. prouzrokovatelj sušenja cvetova, grana i grančica i mrke truleži plodova koštičavih voćaka**

Parazitarne gljive iz roda *Monilinia* dobro su poznati biljni patogeni, rasprostranjeni širom sveta i predstavljaju jedan od ekonomski najvažnijih faktora koji ugrožavaju voćarsku proizvodnju širom sveta. Kao paraziti koštičavih voćaka, ekonomski značajne su tri vrste ovog roda: *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (Ogawa et al., 1995). U Evropi su predmet proučavanja više od 200 godina, od 1796. godine, kada su prvi put uočeni simptomi na plodovima kruške, šljive i breskve koje je prouzrokovala vrsta *M. fructigena* (Byrde and Willets, 1977). Nešto kasnije (1818. godine) u Evropi je zabeleženo prisustvo druge vrste roda *Monilinia* - *M. laxa*, dok je vrsta *M. fructicola* na evropskom prostoru prvi put pronađena 2001. godine u Francuskoj (EPPO, 2002). Pisani podaci o prisustvu *M. fructicola* u SAD potiču iz 1881. godine (Byrde and Willets, 1977).

Ove tri vrste roda *Monilinia* sposobne su da ostvare zarazu velikog broja gajenih biljaka. Međutim, štete i gubici nastaju pre svega na vrstama koje pripadaju familiji

*Rosaceae*, na jabuci, krušci, dunji, trešnji, višnji, šljivi, kajsiji, breskvi, nektarini i bademu, na kojima prouzrokuju različite simptome – sušenje cvetova, grančica i grana, kao i trulež plodova (**Byrde and Willets**, 1977). Ipak, određeni nivo specijalizacije prema domaćinu postoji: *M. fructigena* uglavnom je patogen plodova jabučastih voćaka, *M. fructicola* najčešće je patogen plodova koštičavih voćaka – breskve, nektarine, šljive i kajsije, a *M. laxa* je patogen cvetova i grančica uglavnom koštičavih voćaka (**Batra**, 1991).

*Monilinia laxa* (Aderhold and Ruhland) Honey jedan je od ekonomski najznačajnijih prouzrokovača sušenja cvetova, grana i grančica koštičavih voćaka (**Holb**, 2006). Sušenje cvetova predstavlja karakterističan simptom ove bolesti koja se javlja u zasadima trešnje, višnje, šljive, breskve, nektarine, kajsije i badema, ali može biti detektovana i na jabučastim voćkama (**Holb**, 2008; **Muñoz et al.**, 2008). Iako najznačajnije štete prouzrokuje na cvetovima i grančicama, velike štete mogu nastati i na plodovima, naročito tokom perioda skladištenja (**Holb**, 2006). Na sušenje cvetova najosetljivija je kajsija, a zatim slede trešnja, breskva, višnja i šljiva (**Holb**, 2008). Sa druge strane, značajnija oštećenja na plodovima nego na granama i cvetovima patogen prouzrokuje na trešnji (**Holb**, 2006).

*Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhland) Honey ex Whetzel najpoznatija je i ekonomski najznačajnija vrsta roda *Monilinia* na jabuci i krušci u Evropi (**Jones and Aldwinckle**, 1990) i primarno prouzrokuje trulež plodova, pre i tokom skladištenja, dok se infekcije cvetova, grančica i grana retko javljaju (**CABI**, 2004). Iako najznačajnija oštećenja prouzrokuje na jabučastim voćkama, *M. fructigena* može zaraziti i koštičave vrste voćaka, među kojima je šljiva najosetljivija (**Byrde and Willets**, 1977; **CABI**, 2004). Kod nas detektovana je i na bobicama nekih sorti vinove loze (**Stojanović i Kostić**, 1958).

*Monilinia fructicola* (Winter) Honey prouzrokuje veoma ozbiljne štete naročito na koštičavim vrstama voćaka, kako tokom vegetacije, tako i tokom perioda transporta, skladištenja i prodaje. Smatra se da je *M. fructicola* najdestruktivnija vrsta ovog roda (**Carstens et al.**, 2010). Češće napada biljne vrste podfamilije Prunoideae nego Pomoideae (**Holb**, 2008), a najčešće se sreće na breskvama i nektarinama (**Wilson and Ogawa**, 1979). Uglavnom se javlja na plodovima, ali može prouzrokovati štete i na drugim delovima biljke, čak i na listovima i granama (**EPPO**, 2009).



## 2.4. Geografska distribucija i ekonomski značaj vrsta roda *Monilinia*

Prisustvo sve tri vrste roda *Monilinia* detektovano je samo u centralnoj i istočnoj Aziji, odakle vode poreklo i glavni domaćini ovih patogena - vrste roda *Prunus*, *Malus* i *Pyrus* (EPPO, 2000), dok se areal rasprostranjenja *Monilinia* spp. u drugim delovima sveta veoma razlikuje.

*M. fructigena* rasprostranjena je u celoj Evropi, Aziji (Bliski i Daleki Istok, Indija), Severnoj Africi i nekim delovima Južne Amerike (Batra, 1991). U SAD i Australiji *M. fructigena* nalazi se na listi karantinskih štetnih organizama (EPPO, 2009). Sa druge strane, *M. laxa* detektovana je u svim voćarskim regionima širom sveta (De Cal and Melgarejo, 1999; EPPO, 2000).

*M. fructicola* široko je rasprostranjena i ekonomski značajna u mnogim zemljama Azije (Japan od 1976. godine; Kina od 2003. godine), severne, centralne i južne Amerike (Kalifornija od 1936. godine; Kanada od 1976. godine; Gvatemala od 1976. godine; Argentina, Bolivija, Brazil, Peru i Venecuela od 1976. godine; Meksiko od 1999 godine; Panama od 1999. godine; Ekvator, Paragvaj i Urugvaj od 1999. godine), kao i u Australiji i Novom Zelandu (od 1976. godine) i Južnoj Africi (Zimbabve od 1981. godine) (EPPO, 2006). Sa druge strane, ova vrsta nalazi se na A2 EPPO listi karantinskih štetnih organizama (<http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>), regulisano Aneksom IV, Deo A, Sekcija I Direktiva 2000/29/EC4, i na IA delu I Liste karantinskih štetnih organizama u Srbiji. Ipak, tokom poslednjih desetak godina *M. fructicola* detektovana je i u mnogim zemljama Evrope: prvo u Francuskoj (EPPO, 2002), a zatim u Mađarskoj (Petróczy and Palkovics, 2006), Češkoj Republici (Duchoslavová et al., 2007), Italiji (Pellegrino et al., 2009), Španiji (De Cal et al., 2009a), Švajcarskoj (Bosshard et al., 2006; Hilber-Bodmer, 2010), Sloveniji (Munda and Viršček Marn, 2010), Slovačkoj (Ondejková et al., 2010), Nemačkoj (Grabke et al., 2011), Poljskoj (Poniatowska et al., 2013) kao i nedavno u našoj zemlji na jabučastim (Vasić et al., 2012) i koštičavim voćkama (Hrustić et al., 2013).

Gljive iz roda *Monilinia* najčešći su i najštetniji prouzrokovajući bolesti koštičavih voćaka. Ipak, teško je naći precizan podatak o nivou šteta koju ove vrste prouzrokuju. U nekim godinama mogu znatno da smanje prinos, da ugroze plodove tokom porasta,

zrenja, transporta i skladištenja, ali nije zanemarljiva ni njihova uloga u propadanju grančica i grana čime umanjuju vitalnost biljaka posebno u godinama sa obilnim kišama tokom cvetanja (Stojanović, 2004). Značajni gubici zabeleženi su u mnogim državama: Kaliforniji (Ogawa and English, 1991; Ogawa et al., 1995; Hong et al., 1997; Michailides et al., 2007), Švajcarskoj (Vučinić, 1994) i Španiji (Larena et al., 2005).

*M. fructicola* prouzrokuje najozbiljnije štete, naročito nakon berbe, tokom skladištenja i transporta (Ogawa and English, 1991; Hong et al., 1997). Najveći gubici koje je izazvao ovaj patogen zabeleženi su u Severnoj Americi na breskvama, trešnjama i šljivama, kada su gubici nakon berbe dostizali 80-90% (Hong et al., 1997; Larena et al., 2005), dok je potpuno propadanje nektarina zabeleženo 50-tih godina XX veka (Ogawa et al., 1995).

Podjednako je teško pronaći podatke o štetama koje prouzrokuju druge vrste roda *Monilinia*. Obično, *M. fructigena* i *M. laxa* prouzrokuju štete sličnog nivoa značajnosti, koje se u zavisnosti od vremenskih uslova kreću u intervalu od 3-15%. Generalno, štete koje prouzrokuju ove dve vrste manje su od šteta koje prouzrokuje *M. fructicola* (van Leeuwen et al., 2001).

Neki istraživači smatraju da su gubici koji nastaju tokom skladištenja i transporta mnogo značajniji od gubitaka koji nastaju tokom vegetacije (Ogawa and English, 1991). Hong et al. (1998) i Larena et al. (2005) ističu da u nekim slučajevima tokom perioda skladištenja gubici mogu dostići 80-85% vrednosti proizvodnje.

U našoj zemlji dve vrste ovog roda - *M. laxa* i *M. fructigena*, široko su rasprostranjene i javljaju se svake godine. U periodu 1963-1966. godine, *M. laxa* prouzrokovala je sušenje preko 60% cvetova višnje i oko 40% cvetova kajsije, kao i značajne gubitke u prinosu šljive i breskve (Radman, 1967). Arsenijević i Rudinski (1969) navode da je tokom 1969. godine na mnogim lokalitetima u Vojvodini zabeleženo masovno sušenje i propadanje cvetova i grančica višnje i kajsije, što je, po navodima Kišpatića i sar. (1976) umanjilo prinos na pojedinim stablima i do 80%. Zbog pojave *M. laxa* sredinom sedamdesetih godina prošlog veka zabeležene su velike štete u rejonu Fruške Gore (Perišić i sar., 1976). Usled pojave paleži cvetova i truleži plodova u voćnjacima nastaju gubici i do 100% (Balaž, 2000), dok 5-25% zaraženih plodova dodatno propada pri transportu (Ivanović i Ivanović, 2001). U istraživanjima

**Hrustić et al.** (2012a) utvrđena je zastupljenost *M. fructigena* u skladištima jabuke 14,4% u odnosu na prisustvo patogena iz drugih rodova.

## 2.5. Simptomi oboljenja

Patološke promene koje izazivaju vrste roda *Monilinia* na različitim biljnim organima usloveli su brojne nazive oboljenja: mrka uvelost cvetova, uvelost grančica, mrka kancerозна trulež, mrka trulež plodova, evropska smeđa trulež (**Anonymous**, 1997). Najčešće korišćen naziv za oboljenje koje prouzrokuju u literaturi je mrka trulež plodova i sušenje grančica i cvetova koštičavih voćaka (**Ivanović i Ivanović**, 2001).

Karakteristični simptomi oboljenja koje prouzrokuju vrste roda *Monilinia* na koštičavim voćkama uočavaju se na cvetovima, granama, grančicama i plodovima u vidu sušenja, i truleži plodova. Osim toga, na šljivi utvrđena je i infekcija i sušenje listova koju prouzrokuje *M. fructicola* (**Michailides et al.**, 2007). Tri široko rasprostranjene vrste roda *Monilinia* prouzrokuju veoma slične simptome. Ipak, određen stepen specijalizacije postoji: *M. fructigena* i *M. fructicola* primarno i najčešće prouzrokuju simptome na plodovima (**Jones and Aldwinckle**, 1990; **Holb**, 2006), dok se simptomi na cvetovima i grančicama retko javljaju (**CABI**, 2004; **Anonymous**, 2008). Nasuprot tome, *M. laxa* češće se može naći na cvetovima i granama/grančicama (**Ogawa et al.**, 1975).

Prvi simptom oboljenja u vidu sušenja cvetova javlja se u rano proleće (**Holb**, 2008). Primarne infekcije ostvaruju makrokonidije ili askospore tokom perioda cvetanja, najčešće preko žiga i stubića tučka. Kritična fenofaza za ostvarivanje infekcije cvetova je od formiranja pupoljka pa do faze precvetavanja. Istraživanja pokazuju da su cvetovi najosetljiviji u fazi punog cvetanja (**Michailides et al.**, 2007; **Holb**, 2008). Mogu biti napadnuti svi delovi cveta, a simptomi bolesti ispoljavaju se u vidu uvenuća prašnika, nekroze tučka, kruničnih i čašičnih listića. Posle prodiranja u biljno tkivo gljiva brzo sporuliše i prekriva inficirano tkivo masom sivih konidija (**Balaž**, 2000). Zaraženo tkivo postaje svetlomrko i nekroza ubrzo zahvata cvet u celini. Ovaj tip simptoma (palež cveta-„blossom blight“) naročito je čest na višnji i kajsiji. Prema **Vučinić** (1993) prvi znaci bolesti na pojedinim delovima cveta ispoljavaju se već nakon

24 h po dospeću konidija, a potpuna nekroza i propadanje cvetova nastaje nakon 3-4 dana.

Mada zaraženi cvetovi mogu da opadnu, najčešće ostaju pričvršćeni na granama duži vremenski period tako da micelija patogena kroz cvetnu dršku prodire u grančice i grane, gde nastavlja razvoj, izazivajući pojavu ovalnih, eliptičnih, ulegnutih mrkih pega. U kasnijim fazama razvoja oboljenja dolazi do formiranja rak-rana i sušenja listova i grana (**Holb**, 2008). Osim posrednog prodora patogena preko sasušenih cvetova ili peteljke trulih plodova, infekcija može nastati i direktno, kroz ozlede na kori. U vlažnim uslovima iz pega formiranih na granama curi smolotočina, a na površini kore dolazi i do sporulacije (**Holb**, 2008). U našim agroekološkim uslovima, naročito na kajsiji, breskvi i višnji, grančice često bivaju prstenasto obuhvaćene, tako da se deo iznad mesta zaraze suši (**Ivanović i Ivanović**, 2001). Uvenuće i sušenje vrha grančica nastaje 7-12 dana posle sušenja cvetova. Iz tankih grančica parazit se može proširiti i u deblje grane, odnosno starije delove drveta.

Plodovi koštičavih vrsta voćaka mogu biti zaraženi u svim fazama razvoja, od zametanja do pune zrelosti, a i kasnije tokom transporta, u skladištima i na prodajnim mestima. Međutim, zeleni plodovi znatno su otporniji od plodova u fazi dozrevanja. Najveće štete nastaju kada dođe do zaraze već potpuno formiranih plodova neposredno pred berbu. U plodove parazit prodire kroz rane na pokožici, ali do zaraze može doći i na mestu dodira zdravog i bolesnog ploda. Prvi simptomi na plodovima ispoljavaju se pojavom manjih kružnih, mrkih pega, koje se poput oreola obrazuju oko mesta infekcije, obično na mestu neke rane ili povrede. Ove povrede najčešće nanose insekti, koji oštećuju plodove i omogućavaju lako prodiranje parazita u plod. Razvojem oboljenja pega se uglavnom pravilno koncentrično širi, a pri uslovima povećane temperature i vlažnosti, za nekoliko dana mrka trulež potpuno zahvata plodove. Mrka pega je u početku glatka, ali brzo u okviru pege dolazi do sporulacije parazita, nastaju sitne pukotine na pokožici iz kojih izbijaju najpre beličaste, a zatim i sivkaste, jastučaste sporodohije, često u vidu koncentričnih krugova (**Holb**, 2008). Ovaj tip truleži poznat je pod imenom mrka ili smeđa trulež. Kada mrka trulež potpuno zahvati plodove, oni podležu uvenuću, suše se i smežuravaju. Micelija gljive u potpunosti prožima tkivo ploda, pretvarajući ga u stromu, koja se dalje ne raspada nego očvrstne i tako pretvara plodove u „mumije“ koje ostaju da vise na grani ili opadaju na zemlju ispod krošnje i

služe za održavanje patogena tokom zime (Holb, 2008). *M. fructigena* prouzrokuje i crnu trulež koja nastaje na plodovima koji se čuvaju u tami. U odsustvu svetlosti zahvaćeni deo ploda poprima tamnu ili crnu boju i na njemu ne dolazi do sporulacije (Balaž, 2000; Ivanović i Ivanović, 2001). Mrka trulež plodova u uslovima povećane vlažnosti vazduha potpuno zahvata plodove trešnje i višnje posle 4-5 dana, a plodove kajsijske, šljive i breskve nakon 8-10 dana razvoja.

Micelija *M. fructicola* može izazvati latentne infekcije tako da simptomi oboljenja mogu ostati pritajeni tokom cele vegetacione sezone sve dok stepen zrelosti ploda i vremenski uslovi ne postanu optimalni za razvoj oboljenja (Luo et al., 2001; Luo and Michailides, 2003; Gell et al., 2008) kada prisustvo patogena postaje uočljivo (Batra, 1991; Emery et al., 2000; Gell et al., 2008). Latentne infekcije koje prouzrokuje *M. fructicola* mogu se ispoljiti u dva oblika: kao „vidljive“ latentne infekcije koje se uočavaju u vidu sitnih pega na mladim plodovima i kao „prave“ latentne infekcije koje nije moguće uočiti sve do perioda sazrevanja plodova (Michailides et al., 2007).

## 2.6. Ciklus razvoja patogena

Vrste roda *Monilinia* prezimljavaju u obliku micelije u rak ranama u kori obolelih grana i grančica, kao i u mumificiranim pladovima koji se nalaze u krošnji drveta ili na površini zemljišta (Villarino et al., 2010). U vlažnim uslovima, tokom zime i proleća, micelija u ovim biljnim delovima sporuliše, formira gomilice-sporodohije sa nizovima jednoćelijskih konidija koje ostvaruju primarne infekcije (Byrde and Willets, 1977; Holb, 2008). Za širenje infekcije veliki značaj imaju mumificirani plodovi na granama voćaka. Villarino et al. (2010) utvrdili su da na 70% mumija na granama i na samo 14% mumija koje se nalaze na površini zemlje dolazi do formiranja konidija koje ostvaruju infekciju. O infektivnom potencijalu mumija govori i podatak da samo po jedan mumificirani plod na svakom drvetu u jednom zasadu koštičavih voćaka omogućava pojavu mrke truleži svih plodova u zasadu (Villarino et al., 2010). Na mumificiranim plodovima najveći broj konidija nastaje neposredno pre cvetanja, dok se na cvetovima najveći broj konidija formira tokom prvih dva meseca nakon ostvarene infekcije cvetova. Utvrđeno je da se deset puta veća količina konidija

formira na prezimelim plodovima nego na cvetovima (**Holb**, 2008), kao i da je koncentracija spora *M. fructicola* u zasadima koštičavih voćaka najveća tokom perioda cvetanja i postepeno opada tokom sezone (**Luo et al.**, 2005). Prenošenje konidija formiranih u vlažnim uslovima tokom proleća do biljnih organa omogućavaju vetar, kišne kapi (**Byrde and Willets**, 1977; **Holb**, 2008) i insekti (**Ivanović i Ivanović**, 2001).

Parazit napada cvetove posle otvaranja, a infekcija se najčešće ostvaruje preko žiga i stubića tučka. Nakon ostvarene infekcije cveta, inicijalna hifa ostvaruje infekciju cvetnih delova koji bivaju potpuno kolonizovani masom sivkastih konidija (**Balaž**, 2000). Nakon zaražavanja cvetova micelija parazita dospeva u grančice i obično povlači za sobom sušenje iznad mesta infekcije sve do vrha grančice. Grančice mogu biti i neposredno zaražene preko ozleda na kori nastalih pod uticajem raznih faktora, kada parazit prstenasto obuhvata grančicu, prouzrokujući sušenje gornjih delova. U uslovima povećane vlažnosti, duž nekrotiranog tkiva grančica, obrazuju se gomilice konidija. Uvenueće i sušenje lišća nastaje kao direktna posledica zaraze grana i grančica. Reakcijom tkiva na zaraženim granama dolazi do formiranja rak rana.

Plodovi mogu biti zaraženi u svim fazama razvoja direktnim prodorom kličine cevi kroz kutikulu ploda, strome ili trihome, ali i kroz pukotine i povrede nastale od insekata ili nepovoljnih uslova sredine (**Ogawa et al.**, 1995). Najčešće infekcije su preko povreda, ali do zaraze može doći i na mestu dodira dva ploda, zaraženog i zdravog (**Anonymous**, 2008). Smatra se da najznačajniji put prodora patogena predstavljaju pukotine na kutikuli koje nastaju kada plod dostiže maksimalan porast nekoliko nedelja pred berbu, a koje čine 10% površine ploda (**Gibert et al.**, 2009). Postoje oprečna mišljenja o načinima prodora patogena u plodove voćaka. **Vico i Jurick** (2012) navode da *M. fructigena* prodire direktno savladavajući barijeru koju čini kutikula produkcijom enzima kutinaze, ali takođe prodire i kroz rane i povrede, dok **Xu and Robinson** (2000) smatraju da je prodor patogena moguć samo kroz povrede na plodovima. **Gibert et al.** (2009) ističu da direktno prodiranje konidija *M. laxa* kroz nepovređenu kutikulu ploda nikada nije zabeleženo.

**Luo and Michailides** (2001) utvrdili su da su mladi i zreli plodovi šljive podložniji infekciji od plodova u ostalim fazama razvoja. Slično, **Biggs and Northover** (1988) dokazali su da su mladi plodovi breskve veoma osetljivi na prodor patogena,

zatim postaju otporni sve do faze 2-3 nedelje pre punog zrenja kada osetljivost plodova na infekciju naglo raste. **Gell et al.** (2009) utvrdili su da broj konidija *Monilinia* spp. na površini ploda breskve značajno raste tokom perioda sazrevanja ploda i sedam dana pre berbe kada dostižu brojnost od  $10^3$  -  $10^5$  konidija po plodu.

Teleomorfni stadijum, koji retko formiraju evropske vrste *M. fructigena* i *M. laxa*, ima veliki značaj u životnom ciklusu *M. fructicola* (**Batra and Harada**, 1986). Koliko retko *M. fructigena* formira apotecije govori podatak da su mnogi autori godinama pokušavali da dokažu formiranje apotecija *M. fructigena* u prirodnim uslovima, a da je prvi nalaz apotecija zabeležen pre 100 godina (Aderhold i Ruhland, 1905, loc.cit. **Batra and Harada**, 1986) što je kasnije i potvrđeno pronalaženjem apotecija na prezimelim plodovima jabuke delimično prekrivenim zemljom (**Batra and Harada**, 1986). Objavljeno je i nekoliko uspešnih pokušaja dobijanja apotecija u laboratorijskim uslovima (**Batra and Harada**, 1986) čime je definitivno dokazana mogućnost njihovog nastajanja. Međutim, za vrstu *M. fructicola* teleomorfni stadijum ima veliki značaj s obzirom da izvor inokuluma mogu biti i pseudosklerocije koje se obrazuju na mumificiranim plodovima, a na kojima se formiraju apotecije sa askosporama koje u vlažnim uslovima ostvaruju infekciju cvetova (**Byrde and Willetts**, 1977). Teleomorfni stadijum *M. fructicola* Batra, prvi put je detektovan i opisan na prezimelim mumificiranim plodovima jabuke (**Batra and Harada**, 1986). U Evropi nije zabeleženo formiranje apotecija *M. fructicola* (**Villarino et al.**, 2010), ali je njihovo obrazovanje detektovano na drugim kontinentima (**Holtz et al.**, 1998). Istraživanja **Jansch et al.** (2012) primenom SSR markera potvrdila su odsustvo teleomorfno stadijuma *M. fructicola* u Evropi.

Pri povoljnim vremenskim uslovima za cvetanje i brzo precvetavanje, odnosno u uslovima toplog i suvog vremena, kritična fenofaza za infekciju prolazi brzo pa je mogućnost ostvarenja infekcije smanjena. Dugi period cvetanja usled nižih temperatura i čestih kiša, međutim, predstavlja idealne uslove za epidemijsku pojavu parazita (**Trkulja**, 1996). Tokom sezone patogeni ostvaruju nekoliko ciklusa sekundarnih infekcija (**Holb**, 2008).

Istraživanja pokazuju da *Monilinia* spp. ostvaruju infekciju samo kada se steknu svi neophodni uslovi: povoljni vremenski uslovi, domaćin u osetljivoj fenofazi i patogen dovoljnog infekcionog potencijala (**Luo et al.**, 2001). O značaju uslova

spoljašnje sredine govore podaci **Drén et al.** (2007) koji su tokom 2003. godine u uslovima suvog i toplog proleća i leta zabeležili intenzitet oboljenja niži od 10%, dok je tokom hladnog i vlažnog proleća 2004. godine intenzitet pojave sušenja cvetova bio 95%, a truleži plodova 33%. **Hong et al.** (1997) zabeležili su gubitke od 8-10% u fazi zrenja u toku 1995. godine i samo 0,5% gubitaka u toku 1996. godine. Temperatura i vlažnost osnovni su faktori spoljašnje sredine koji utiču na ostvarivanje infekcije, pri čemu je vlažnost istaknuta kao mnogo značajniji faktor (**Gell et al.**, 2008). Bez perioda sa povećanom relativnom vlažnošću, čak i pri veoma visokom infektivnom potencijalu patogena, neće doći do ostvarivanja infekcije, dok period vlažnosti od 15 h obezbeđuje ostvarivanje infekcije u preko 80% slučajeva (**Biggs and Northover**, 1988). Pri optimalnoj temperaturi, za ostvarivanje infekcije neophodna je vlažnost u trajanju od najmanje 3-4 h (**Luo and Michailides**, 2001).

U zavisnosti od uslova sredine nova generacija konidija nastaje sedam dana nakon ostvarene infekcije, a u toku vegetacione sezone može se formirati nekoliko generacija konidija (**Luo et al.**, 2001). Kada konidije dospeju na osetljivo tkivo, klijanje u roku od 2-4 h i ukoliko su povoljni uslovi vlažnosti i temperature, za tri do šest dana mogu se primetiti prvi znaci nekroze (**Holb**, 2008). Optimalna temperatura za razvoj oboljenja je 24°C, mada se infekcija i razvoj simptoma oboljenja javljaju u veoma širokom temperaturnom rasponu (0-35°C), slabije na temperaturama od 0°C do 5°C, a konidije ne klijanje na temperaturama višim od 38°C (**Holb**, 2008; **Casals et al.**, 2010a). Istraživanja **Xu et al.** (2007) pokazuju da je period od samo 2 h vlažnosti dovoljan za klijanje više od 80% konidija *M. laxa* na temperaturi od 20-25°C. Sa druge strane, prisustvo svetlosti deluje stimulatивно na formiranje konidija, ali delimično inhibira njihovo klijanje (**Anonymous**, 2008).

## 2.7. Identifikacija vrsta roda *Monilinia*

S obzirom da se vrste roda *Monilinia* teško morfološki razlikuju jedna od druge i razdvajanje vrsta može predstavljati problem (**Anonymous**, 2008). Simptomi koje prouzrokuju ove vrste lako su prepoznatljivi i karakteristični. Međutim, na osnovu simptoma nije preporučljivo vršiti identifikaciju i donositi zaključak o kojoj vrsti roda *Monilinia* je reč (**Michailides et al.**, 2007). *M. laxa* prouzrokuje intenzivnije simptome



na cvetovima i granama, dok *M. fructicola* mnogo veće gubitke prouzrokuje na plodovima (Ogawa et al., 1975). *M. laxa* se češće sreće na bademu i kajsiji, a *M. fructicola* na plodovima breskve, nektarine i šljive (Michailides et al., 2007). *M. fructigena* češće prouzrokuje simptome na jabučastim, a *M. laxa* i *M. fructicola* na koštičavim voćkama.

Najčešće metode koje se primenjuju za preciznu identifikaciju vrsta roda *Monilinia* su konvencionalne mikološke metode koje obuhvataju proučavanje morfoloških i odgajivačkih karakteristika (Byrde and Willetts, 1977; De Cal and Melgarejo, 1999) i/ili molekularne metode (Hughes et al., 2000; Hughes, 2003; Côté et al., 2004).

Identifikacija na osnovu morfoloških odlika izolata zahteva dosta vremena i veliko iskustvo, a sa druge strane, u nekim slučajevima, može da bude nepouzdana i dovede do pogrešnih zaključaka (van Leeuwen and van Kesteren, 1998; De Cal and Melgarejo, 1999). Lane (2002) navodi da ne postoji jedan specifičan morfološki karakter na osnovu kojeg se mogu pouzdano razdvojiti vrste *Monilinia* spp., ali da se tri vrste ovog roda ipak mogu razlikovati na osnovu istovremenog proučavanja više kvantitativnih morfoloških karakteristika. U sinoptičkom ključu za razlikovanje morfološki sličnih vrsta roda *Monilinia* Lane (2002) navodi sledeće karaktere: boja kolonije, brzina porasta, sporulacija, koncentrični prsten spora, ivice kolonije, rozetavost, crne zone – margine. Osim toga, značajane karakteristike za razdvajanje su i dužina kličine cevi i način klijanja konidija pre prvog grananja. Van Leeuwen and van Kesteren (1998) smatraju da se tri vrste roda *Monilinia* mogu pouzdano razlikovati upravo na osnovu ovih karakteristika. Međutim, zbog postojanja varijabilnosti između izolata iste vrste, kao i sličnosti koje ponekad mogu da ispolje izolati različitih vrsta *Monilinia* spp., ipak se preporučuje korišćenje i dodatnih dijagnostičkih metoda kao što su molekularne metode.

*M. fructicola* razlikuje se od *M. laxa* po celovitoj ivici kolonije, obilnoj produkciji konidija i dužoj kličinoj cevi pre grananja (EPPO, 2009; Zhu et al., 2011; Poniatowska et al., 2013). *M. fructigena* ima žutokrem koloniju, celovitu ivicu kolonije koja ne formira rozetu na PDA podlozi. *M. laxa* formira kolonije sivkasto braon boje, oblika rozete sa režnjevitom ivicom kolonije (EPPO, 2009). Konidije *M. laxa* na vodenom agaru formiraju kratke kličine cevi do prvog grananja (dužina kličine cevi od

konidije do prvog grananja manja od 60  $\mu\text{m}$ ). Sa druge strane, *M. fructigena* i *M. fructicola* formiraju kličine cevi dužine preko 220  $\mu\text{m}$  pre grananja (**De Cal and Melgarejo**, 1999). **Hu et al.** (2011a) utvrdili su da konidije vrsta *M. laxa* i *M. fructicola* klijaju u jednu kličinu cev, dok izolati *M. fructigena* formiraju više kličinih cevi na jednoj konidiji. Brzina porasta micelije na PDA podlozi može biti koristan karakter za razdvajanje vrsta roda *Monilinia*. Tako se *M. fructigena* i *M. fructicola* jasno mogu razdvojiti na osnovu brzine porasta kolonije u režimu svetlosti UV/mrak, s tim da su podaci o prosečnoj brzini porasta izolata iste vrste raznoliki. Sa jedne strane, **Batra** (1979) potvrđuje da se *M. laxa* može razlikovati od *M. fructigena* i *M. fructicola* po sporijoj brzini porasta: *M. fructigena* raste 11 mm/dan, dok *M. laxa* raste oko 7 mm/dan. Sa druge strane, **De Cal and Melgarejo** (1999) utvrdili su da *M. fructigena* dostiže maksimalnu brzinu porasta od 8 mm/dan, dok je maksimalna brzina porasta *M. fructicola* 20 mm/dan. Ovi oprečni podaci potvrđuju nepouzdanost konvencionalnih metoda identifikacije. **Poniatowska et al.** (2013) utvrdili su da izolati *M. fructicola* imaju prosečno najbrži porast na PDA podlozi. Mogućnost formiranja sklerocija u kulturi takođe može biti značajan kriterijum razlikovanja vrsta. **Batra and Harada** (1986) detektovali su obrazovanje crnih, nepravilnih sklerocija u kulturi *M. fructigena* i tu karakteristiku smatraju specifičnom za izolate *M. fructigena* što je potvrđeno i u prethodnim istraživanjima u našoj zemlji (**Hrustić et al.**, 2012b) - izolati *M. fructigena* poreklom sa plodova dunje formirali su sklerocije nakon 14 dana inkubacije.

Mada ove specifične karakteristike mogu poslužiti za uspešnu identifikaciju tipičnih kolonija vrsta roda *Monilinia*, atipične kulture *M. laxa* lako mogu biti pogrešno identifikovane kao *M. fructigena* ili *M. fructicola* (**De Cal and Melgarejo**, 1999). Istraživanja **Petróczy et al.** (2012) pokazuju da neki izolati *M. fructigena* mogu imati koloniju smeđe boje, režnjevitih ivica, tipičnu za izolate vrste *M. laxa* ili *M. fructicola* ili da izolati *M. laxa* mogu imati koloniju žute boje, karakterističnu za vrstu *M. fructigena*.

Za pouzdanu i brzu identifikaciju izolata neophodna je primena metoda molekularne biologije, pre svega lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR). Molekularna detekcija vrsta roda *Monilinia* uglavnom se zasniva na analizi relativno malog ITS genomnog regiona (Internal Transcribed Spacer, ITS) od približno 450 bp (**Fulton et al.**, 1999; **Snyder and Jones**, 1999; **Hughes et al.**, 2000;

**Ioos and Frey**, 2000; **Förster and Adaskaveg**, 2000; **Gell et al.**, 2007) koji je visoko konzervativan za vrste ovog roda (**Holst-Jensen et al.**, 1997). Prajmeri koje su dizajnirali **Hughes et al.** (2000) omogućavaju razdvajanje vrste *M. fructicola* od *M. laxa*, ali ne i od *M. fructigena*, dok prajmeri autora **Ioos and Frey** (2000), kao i **Hughes et al.** (2000) omogućavaju razlikovanje sve tri pomenute vrste. Međutim, posebno korisna, pouzdana i brza tehnika koja obezbeđuje preciznu detekciju tri već pomenute vrste roda *Monilinia* kao i vrstu *Monilia polystroma* u samo jednoj reakciji je Multiplex PCR reakcija po protokolu koje su opisali **Côté et al.** (2004). Upotrebom specifičnih prajmera MO368-5, MO368-8R, MO368-10R i Laxa-R2 dobijaju se amplikoni različite dužine u zavisnosti od vrste: 402 bp specifični za *M. fructigena*, 535 bp za *M. fructicola*, 351 bp za *M. laxa* i 425 bp za *M. polystroma*. Prema **EPPO** (2009) upravo prajmeri koje su dizajnirali **Hughes et al.** (2000), **Ioos and Frey** (2000) i **Côté et al.** (2004) smatraju se veoma pouzdanim za detekciju vrsta roda *Monilinia*.

Međutim, za pouzdanu identifikaciju i karakterizaciju izolata *Monilinia* spp. najčešće se koristi ITS genomni region koji se amplifikuje primenom univerzalnog para prajmera ITS1 i ITS4. **Zhu et al.** (2011) su korišćenjem ovog para prajmera amplifikovali sekvence 39 izolata iz Kine, uporedili dobijene sekvence sa drugim sekvencama iz različitih delova sveta i na taj način identifikovali vrste roda *Monilinia*, prouzrokovaoče mrke truleži plodova u Kini. Na osnovu dobijenih sekvenci i 57 sekvenci iz drugih delova sveta rekonstruisali su filogenetsko stablo i izvršili molekularnu karakterizaciju izolata vrsta roda *Monilinia*. **Hu et al.** (2011a) takođe su koristili ITS region za molekularnu identifikaciju i karakterizaciju i dokazali da se izolati ovog roda na osnovi ITS regiona jasno razdvajaju u odgovarajuće grupe, ali sa malim bootstrap vrednostima. Ovi autori su u svojim istraživanjima osim ITS genomnog regiona koristili i G3PDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TUB2 ( $\beta$ -tubulin) i Cyt b (cytochrome b) gene za detaljniju molekularnu karakterizaciju vrsta roda *Monilinia* i dobili razdvajanje u odgovarajuće grupe sa većom bootstrap podrškom. **Poniatowska et al.** (2013) filogenetskom analizom ITS regiona potvrdili su blisku vezu između izolata vrste *M. fructicola* i *M. laxa* sa jedne i *M. fructigena* i *M. polystroma* sa druge strane.

**Jansch et al.** (2012) su molekularnu metodu korišćenja SSR (simple sequence repeat) markera istakli kao značajnu jer omogućava precizan uvid u diverzitet koji se dalje može koristiti u proučavanje epidemiologije i načina širenja vrste *M. fructicola* u

svetu. Razvili su Multiplex PCR reakciju sa pet parova prajmera koja pruža uvid u genetičku strukturu populacije *M. fructicola* poreklom iz različitih zemalja Evrope i Amerike. Analizom dobijenih profila primenom ovih prajmera utvrđeno je postojanje osam različitih haplotipova poreklom sa američkog kontinenta i devet poreklom sa evropskog kontinenta. Njihovi rezultati pokazuju da je genetička varijabilnost evropskih populacija mnogo manja od genetičke varijabilnosti populacija iz SAD gde je ova vrsta široko rasprostranjena. Analiza strukture populacije ukazala je na dva nezavisna unosa *M. fructicola* na evropski kontinent, iz Kalifornije i istočnog dela SAD. Haplotipovi identični haplotipovima iz Kalifornije pronađeni su u Francuskoj, Španiji i Švajcarskoj, dok su haplotipovi identični onima iz Džordžije i Južne Karoline pronađeni samo u Italiji. Njihova istraživanja ukazala su na način dospevanja i širenja karantinskog patogena *M. fructicola* u Evropi, kao i na odsustvo ukrštanja populacije ove vrste na evropskom kontinentu.

## 2.8. Mogućnosti suzbijanja vrsta roda *Monilinia*

Adekvatne mere zaštite zasada koštičavih voćaka od fitopatogenih mikroorganizama predstavljaju neophodan preduslov stabilne i profitabilne poljoprivredne proizvodnje koja u velikoj meri zavisi od stepena poznavanja biologije patogena, epidemiologije bolesti i odnosa parazit-domaćin. Samo na osnovu dobrog poznavanja svih činilaca koji direktno ili indirektno utiču na razvoj oboljenja moguće je primeniti kompleks mera kojima se sprečavaju štete.

Suzbijanje patogenih gljiva roda *Monilinia*, prouzrokovača oboljenja velikog broja vrsta voćaka, veoma je složeno i usmereno u nekoliko pravaca. Mere suzbijanja mogu se podeliti u pet osnovnih grupa:

- stvaranje otpornih sorti;
- agrotehničke mere;
- fizičke mere;
- biološke mere;
- hemijske mere.

### 2.8.1. Stvaranje otpornih sorti

Pitanju gajenja otpornih sorti, kao jednom od najefikasnijih načina borbe protiv *Monilinia* spp., kod nas se ne posvećuje dovoljna pažnja, a dostupni eksperimentalni podaci su oskudni i nedovoljni. **Jordović** (1954) proučavao je osetljivost plodova deset vodećih sorti breskve na *Monilinia* spp. i utvrdio da ni jedna proučavana sorta nije ispoljila potpunu otpornost, dok su ispoljene razlike u osetljivosti između pojedinih sorti bile neznatne. Takođe, autor ističe da osetljivost plodova breskve na *Monilinia* spp. raste s njihovom zrelošću, kao i da otpornost, odnosno osetljivost plodova, umnogome zavisi od čvrstine i boje mesa ploda, debljine i čvrstine pokožice, gustine dlačica na pokožici i drugih pomoloških osobina ploda. Prema **Jevremoviću** (1976) sorte breskve veće bujnosti i manje rodnosti otpornije su, dok su sorte slabije bujnosti i veće rodnosti osetljivije na *Monilinia* spp.

Iskustva iz sveta pokazuju da su sorte trešnje sa tanjom pokožicom značajno osetljivije na prodor *Monilinia* spp. od sorti čiji plodovi imaju deblju pokožicu. Sorte Bigarreau Burlat, János cseresznye i Valerij Cskalov veoma su otporne na sušenje cvetova (**Holb**, 2006). U slučaju višnje, sorte Lativiszskaja Nizkaja, Nagy Angol, Mocanesti, Ljubzskaja, Sirpotreb, Oblacsinszkaja, Cigánymeggy 3, Maraska Savena, Mettar i Elegija slabo su osetljive na *M. laxa* (**Holb**, 2006; 2008), dok su Csengodi i Kantorsjanosi otporne (**Szódi et al.**, 2008). Kada su u pitanju kajsija i breskva smatra se da je nekoliko sorti kajsije (Neptun, Mamaia, Silvana, Sulina i Sirena) koje se gaje u Rumuniji tolerantno na prouzrokovaoče smeđe truleži (**Holb**, 2006). Sorte šljive Čačanska najbolja i President ističu se kao umereno, a Besztercei, Silvia i Tuleu gras kao slabo osetljive na trulež plodova koju prouzrokuje *M. laxa* (**Holb**, 2006). Sa druge strane, nema podataka o radu na stvaranju sorti otpornih na *M. fructicola* (**Holb**, 2008).

### 2.8.2. Agrotehničke mere

Istraživanja pokazuju da se agrotehničkim merama može smanjiti količina inokuluma i obezbediti mikroklimatski uslovi koji su povoljni za biljku, a nepovoljni za patogena. Pravilnim agrotehničkim odlukama pre zasnivanja zasada, odnosno izborom

terena, gustom sadnje, uzgojnim oblikom, izborom i gajenjem manje osetljivih sorata i drugo, smanjuje se opasnost od pojave ovog oboljenja (**Kišpatić i Maceljki**, 1989).

Pri podizanju zasada treba birati ocedne terene i redove postavljati u pravcu dominantnih vetrova, radi boljeg provetravanja zasada. U voćnjaku treba redovno sprovoditi sve higijenske mere (nega krošnje, suzbijanje korova i slično), povećavajući na taj način vitalnost voćki, a samim tim smanjujući do izvesne mere napad parazita. Ukoliko su voćke pravilno i ujednačeno prihranjene manje su podložne napadu vrsta roda *Monilinia* (**Trkulja**, 1996). **Elmer et al.** (2007) utvrdili su da su plodovi koji sadrže više kalcijuma u epidermisu značajno otporniji na infekciju. Takođe, ukoliko se izvrši prihrana kalcijumom pre berbe značajno se smanjuje učestalost pojave smeđe truleži plodova tokom skladištenja, dok su **Thomidis and Exadaktylou** (2010) utvrdili korelaciju između upotrebe bora i smanjenja infekcije plodova breskve koju prouzrokuje *M. laxa*.

Potrebno je nastojati da voćke u fazi zrenja budu što bolje i ujednačenije snabdevene vodom, jer nakon duže suše, ukoliko padnu obilne i dugotrajne kiše, plodovi pucaju i preko nastalih rana paraziti lako prodiru u plod (**Trkulja**, 1996). Sa druge strane, **Mercier et al.** (2008) ispitivali su uticaj različitih sistema navodnjavanja i metoda orezivanja na pojavu oboljenja prouzrokovanog vrstama roda *Monilinia*. Utvrdili su da smanjene količine vode i ručno orezivanje imaju najbolji efekat na smanjenje pojave oboljenja.

Redovna berba, uklanjanje biljnih ostataka posle berbe, sasecanje i spaljivanje obolelih i sasušenih grančica i sakupljanje i zakopavanje mumificiranih plodova, izbegavanje nepotrebnog povređivanja biljaka pri redovnim agrotehničkim operacijama, kao i smanjenje gustine zasada, mogu značajno da smanje intenzitet oboljenja.

Smatra se da uništavanje primarnog izvora inokuluma predstavlja najznačajniju meru borbe (**van Leeuwen et al.**, 2000; 2002a; **Holb**, 2006). Sakupljanje mumificiranih plodova treba izvesti još u jesen ili u rano proleće i to kako plodova koji se nalaze na zemlji, tako i onih koji su ostali u krošnjama voćki (**van Leeuwen et al.**, 2000; 2002a). Takođe, ukoliko je moguće, treba uklanjati obolele plodove još u toku leta, čim se na njima ukažu prvi znaci zaraze. Ove mere mogu biti veoma korisne na okućnicama i manjim površinama jer se njima značajno umanjuje infektivni potencijal parazita.

Međutim, u većim voćnjacima koji se obrađuju, a gde je navedene mere teže sprovesti, korisno je opale mumificirane plodove duboko zaorati.

Istraživanja **Borve and Stensvand** (2003) ukazuju na efikasnost mere pokrivanja trešnje kišnim štitovima od polietilena ili drugih vodootpornih i providnih materijala tokom kišnog perioda od cvetanja pa do branja plodova. Njihova istraživanja pokazuju da se kišni štitovi mogu koristiti kao dodatak ili čak zamena hemijskim merama borbe.

### 2.8.3. Fizičke mere

S obzirom da u zemljama Evrope primena hemijskih mera borbe nije dozvoljena tokom perioda skladištenja, mnogi autori proučavali su mogućnost upotrebe fizičkih mera za suzbijanje vrsta roda *Monilinia* (**Casals et al.**, 2010b; **Karabulut et al.**, 2010; **Zhang et al.**, 2010). Istraživanja su pokazala da potapanje plodova u vodu zagrejanu na 65-70°C oštećuje plodove i ne može biti efikasno, dok voda zagrejana na 55-60°C u koju su potopljeni plodovi u trajanju od 30-60 s može značajno smanjiti infektivni potencijal vrsta roda *Monilinia* (**Karabulut et al.**, 2010). **Zhang et al.** (2010) koristili su zagrejanu vodu na 50°C tokom 40 s i vodu temperature iznad 55°C tokom 10 s i ovim tretmanima potpuno zaustavili klijanje spora *M. laxa* u *in vitro* uslovima. Ipak, autori su potvrdili da upotreba tople vode može biti efikasna samo u kombinaciji sa drugim tretmanima kao što su konvencionalni fungicidi, biološke mere borbe ili izmenjen sastav atmosfere u skladištu (**Karabulut et al.**, 2010; **Zhang et al.**, 2010).

**Casals et al.** (2010b) ispitivali su uticaj tretmana suvim i vlažnim vazduhom na visokim temperaturama na razvoj mrke truleži uskladištenih plodova. Istraživanja su pokazala da visoka vlažnost vazduha (95-99% RH) na temperaturi od 50°C tokom 2 h značajno smanjuje vitalnost konidija *M. laxa* i *M. fructicola* (92 i 94%), a osim toga pozitivno deluje na kvalitet plodova. Sa druge strane, suv vazduh pri istim temperaturnim uslovima nije ispoljio zadovoljavajući efekat. Ipak, ovi tretmani zahtevaju mnogo vremena i relativno su skupi, što utiče na njihovu ekonomsku isplativost.

#### 2.8.4. Biološke mere

Biološko suzbijanje predstavlja poseban način zaštite zasada od patogena koji se zasniva na upotrebi mikroorganizama umesto konvencionalnih fungicida, ili kao njihova dopuna, radi smanjenja količine primene hemijskih supstanci u poljoprivredi. Većina podataka koji se odnose na mogućnosti upotrebe gljiva, bakterija i kvasaca kao bioloških agenasa potiče iz poslednjih dvadesetak godina. Uspešno je razvijeno nekoliko agenasa za biološku borbu, a neki od njih već su registrovani za primenu u voćarstvu.

Za zaštitu zasada od vrsta roda *Monilinia* kao agensi biološke borbe najčešće se koriste bakterije iz rodova *Bacillus*, *Burkholderia* i *Pseudomonas*, dok je poznat antagonistički efekat gljiva iz više rodova - *Aureobasidium*, *Epicoccum*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* i *Mucor* (Holb, 2006). Za suzbijanje vrsta roda *Monilinia* kao agense biološke borbe moguće je koristiti i kvasce - *Metschnikowia pulcherrima*, *Pseudozyma fusiformata*, *Cryptococcus laurentii* i *Aureobasidium pullulans* (Zhang et al., 2010; Mari et al., 2012).

Vrste roda *Bacillus* najpoznatiji su agensi biološke borbe. Bakterije ovog roda formiraju spore koje imaju izraženu sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine, a pritom ostaju metabolički aktivne (Rodgers, 1989). Najproučavanija vrsta bakterija koja se koristi za biološku zaštitu je *Bacillus subtilis* (Asaka and Shoda, 1996; Brannen and Kenney, 1997; Krebs et al., 1998; Pinchuk et al., 2002), poznata duži niz godina po svojoj antimikrobnoj aktivnosti. *B. subtilis* aktivna je supstanca nekoliko preparata koji su registrovani u svetu (Tomlin, 2009). Vrste roda *Bacillus* proizvode antibiotike i lipopeptide (bacilizin, fengimicin, dificidin, bacitracin, bacilin, balilomicin B i iturin) koji deluju na različite komponente ćelijskog zida, sprečavaju prijanjanje patogena na biljne organe i veoma su poznati po izraženoj antimikrobnoj aktivnosti (Klokočar-Šmit i sar., 2003).

Pusey et al. (1984) ukazali su na mogućnost suzbijanja vrsta roda *Monilinia* primenom *B. subtilis*. Istraživanja Yáñez-Mendizábal et al. (2012) pokazala su da je lipoprotein fengicin osnovni antifungalni metabolit soja CPA-8 *B. subtilis* protiv vrsta *M. laxa* i *M. fructicola* kao i da soj CPA-8 ima veliki potencijal za suzbijanje vrsta roda



*Monilinia*. U našoj zemlji na bazi *B. subtilis* registrovan je preparat F-stop koji u sebi sadrži soj ST 1/III *B. subtilis* (Anonymous, 2011).

**Altindag et al.** (2006) proučavali su primenu bakterija *Burkholdria* OSU-7, *Bacillus* OSU-142 i *Pseudomonas* BA-8 u suzbijanju vrste *M. laxa*. Sve tri bakterije bile su pogodni agensi za suzbijanje *M. laxa*, kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uslovima, pri čemu su veći potencijal pokazale vrste *Burkholdria* OSU-7 i *Bacillus* OSU-142.

Istraživanja **Hong et al.** (1998) pokazala su da tri izolata *Trichoderma* spp. imaju potencijal za suzbijanje *Monilinia* spp. tokom perioda skladištenja. U ovim testovima *Trichoderma* spp. omogućila je smanjenje mrke truleži od 63 do 98% na plodovima breskve i od 67 do 100% na plodovima šljive. Izolati *Trichoderma* spp. obezbedili su ne samo smanjenje infekcije nego i smanjenje sporulacije *M. fructicola*. Upotreba formulisanog preparata na bazi *T. harizanum* u kombinaciji sa fungicidima daje dobre rezultate (**Elad**, 1994). Zadovoljavajući rezultati postignuti su i primenom preparata na bazi oospora *Pythium oligandrum* (**Filajdić i sar.**, 2003; **Miletić i sar.**, 2003).

**Melgarejo et al.** (1985) ustanovili su da pet vrsta gljiva (*Aspergillus flavus*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium chrysogenum*, *P. frequentans* i *P. purpurogenum*) inhibira porast hifa i klijanje spora *M. laxa*. **De Cal et al.** (1988) utvrdili su da *P. frequentans* proizvodi supstance koji deluju antifungalno na *M. laxa*, dok su **Madrigal and Melgarejo** (1994) u svojim istraživanjima mehanizma delovanja bioloških agenasa otišli korak dalje i otkrili da *E. nigrum* proizvodi flavipin, supstancu koja inhibira respiratorni proces i na taj način inhibitorno utiče na klijanje konidija *M. laxa*. Dokazano je, takođe, da *P. purpurogenum* proizvodi litičke enzime koji utiču na degradaciju hifa i spora *M. laxa* (**Larena and Melgarejo**, 1996). **Chand-Goyal et al.** (1996) ukazuju na dobre efekte u prevenciji *Monilinia* spp. primenom *Cryptococcus laurentii* i *C. infirmo-miniatius* u kombinaciji sa manjim količinama iprodiona.

**Mari et al.** (2007) koristili su *E. nigrum* za sprečavanje razvoja mrke truleži na plodovima nektarine. Upotrebom suspenzije spora *E. nigrum* ostvarano je smanjenje truleži od 60 do 70% u odnosu na netretiranu kontrolu. **De Cal et al.** (2009b) takođe su ukazali na mogućnost upotrebe *E. nigrum* u inhibiciji klijanja konidija *Monilinia* spp. koje se nalaze na površini plodova. Autori su ispitivali efekat različitih tipova formulacija *E. nigrum* za suzbijanje *Monilinia* spp. i ustanovili da način formulacije

preparata može čak poboljšati osobine preparata u odnosu na neformulisanu suspenziju spora.

Kvasac *Aureobasidium pullulans* nalazi se na površini mnogih plodova, a njegova antifungalna aktivnost protiv mnogih patogena u skladištu dobro je poznata (**Mari et al.**, 2012). **Mari et al.** (2012) prvi su ispitali antifungalnu aktivnost *A. pullulans* protiv *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* i utvrdili veliki potencijal sojeva L1 i L8. Oba ispitivana soja obezbedila su potpunu inhibiciju infekcije vrstama *M. laxa* i *M. fructicola*, dok je za vrstu *M. fructigena* ostvareno smanjenje infekcije od 90%. U Hrvatskoj je za suzbijanje *M. fructigena* na jabuci, krušci i dunji registrovan kvasac *A. pullulans* DSM 14940 i 14941 (**Lučić**, 2009), dok su **Wittig et al.** (1997) primenom istog kvasca u vreme cvetanja trešnje značajno smanjili infektivni potencijal *M. laxa*. **Zhang et al.** (2010) ispitali su antifungalnu aktivnost kvasca *A. pullulans* PL5, *Metschnikowia fructicola* AP47 i *Pseudomyza fusiformata* AP6 na *M. laxa*.

Pored toga, poznato je da su lekovite i začinske biljke važan izvor jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću. Etarska ulja su specifični, najčešće tečni produkti biljnih tkiva. Predstavljaju složene smeše različitih isparljivih monoterpena, seskviterpena i fenilpropanskih jedinjenja (**Dorman and Deans**, 2000). Pojedina etarska ulja sadrže i preko 60 supstanci među kojima su terpeni, alkoholi, fenoli, kiseline, ugljovodonici, estri, ketoni i laktani. Najzastupljenije supstance su terpeni (90%) iz kojih se izdvaja čitav niz biološki aktivnih supstanci kao sto su timol, karvakol, eugenol, geraniol, linalol i drugi. Za antimikrobno delovanje etarskih ulja odgovorne su njihova lipofilnost, slobodna hidroksilna (OH) grupa i slobodne nezasićene strukture cikloheksanskog prstena. Zbog svoje lipofilnosti i rastvorljivosti u vodi deluju na funkcionalne strukture ćelijskih membrana i enzime, što dovodi do narušavanja metabolizma i funkcionisanja ćelije (**Bakkali et al.**, 2008 ).

Brojna istraživanja ukazuju da pare etarskih ulja origana, timijana, lavande, ruzmarina, žalfije, nane, lavande, bosiljka, kima, anisa, eukaliptusa i drugih inhibiraju porast fitopatogenih gljiva (**Isman**, 2000; **Daferera et al.**, 2003; **Tanović i sar.**, 2004). Utvrđeno je da inhibitorna aktivnost zavisi kako od vrste etarskog ulja tako i od vrste patogena (**Alvarez-Castellanos**, 2001; **Cimanga et al.**, 2002). Antifungalno dejstvo etarskog ulja timijana utvrđeno je na *Botrytis cinerea* (**Wilson et al.**, 1997; **Daferera et al.**, 2003; **Tanović et al.**, 2005), gljive koje se prenose zemljištem iz rodova

*Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* i *Verticillium* (Zambonelli et al., 1996; Tanović i sar., 2004; Duduk i sar., 2010) i *Colletotrichum* spp. (Grahovac et al., 2012).

Prethodna istraživanja (Tanović et al., 2009; 2010a; Hrustić i sar., 2011) pokazala su da je gasovita faza nekih etarskih ulja visoko toksična za patogene uskladištenih plodova jabuke. U istraživanjima koja su obuhvatila etarska ulja dobijena iz više od 30 vrsta biljaka, utvrđeno je da gasovita faza ulja timijana ispoljava najjači inhibitorni efekat. Ogladima *in vitro* i *in vivo* potvrđena je snažna antimikrobna aktivnost ulja timijana (Hrustić i sar., 2011). Sa druge strane, istraživanja Grahovac et al. (2012) pokazuju da od 56 testiranih ulja 47 ne deluju fungicidno na porast micelije *Colletotrichum* spp. ni pri koncentraciji etarskog ulja od 0,16 µl/ml vazduha, a da etarska ulja origana i timijana ispoljavaju najbolji efekat na prouzrokovače truleži ploda jabuke. Liu et al. (2002) ukazali su da etarsko ulje timijana u niskim koncentracijama (2-4 mg/l) može značajno smanjiti štete koje nastaju na plodovima tokom skladištenja. U istraživanjima Lazar-Baker et al. (2011) etarsko ulje *Backhousia citriodora* bilo je najsnažniji inhibitor porasta *M. fructicola*.

Proizvodnja i korišćenje biopreparata, iako predstavlja poželjno rešenje sa aspekta bezbednosti hrane, još uvek je suviše skupo da bi bilo ekonomski isplativo zbog znatno niže cene konvencionalnih fungicida (Elad, 1994). Nažalost, komercijalizacija sredstava za biološku zaštitu i njihova široka upotreba još uvek je daleko od pune realizacije (Wilson, 2011). Činjenica je da biofungicidi još uvek ne mogu u potpunosti zameniti hemijske preparate, ali sve su ozbiljniji naponi u istraživanjima i komercijalizaciji novih, ekološki prihvatljivih preparata. Osim toga, biološke mere moguće je sprovoditi i kao dopunu hemijskim.

### 2.8.5. Hemijsko suzbijanje

S obzirom da sve do sada navedene mere, iako korisne, najčešće pojedinačno nisu dovoljne za uspešnu zaštitu različitih vrsta voćaka od *Monilinia* spp., kao i da ekonomski efekti šteta mogu biti veliki, neophodno je redovno sprovođenje mera hemijskog suzbijanja, posebno u godinama povoljnim za razvoj patogena.

Za suzbijanje *Monilinia* spp., kod nas registrovano je oko 10 aktivnih materija i njihovih kombinacija (bakar oksihlorid, prochloraz, ciprodinil+fludioksonil, prosimidon,

tiofanat-metil, vinklozolin, karbendazim, iprodion, tebukonazol, boskalid+piraklostrobin, difenokonazol, propikonazol i hlorotalonil) (**Anonymous**, 2011). U svetu se za ovu namenu koristi preko 30 aktivnih materija iz različitih hemijskih grupa uključujući azoksistrobin, bitertalon, kaptan, dihlofluanid, dikoran, ditianon, fenheksamid, fludioksonil, fluopiram, fluoroimid, imibenkonazol, mepanipirim, oksokonazol fumarate, propineb, triadimefon, triflumizol, tiram, triforin i ciram koje u našoj zemlji nisu registrovane za ove namene (**Tomlin**, 2009).

Strategija suzbijanja vrsta roda *Monilinia*, u zavisnosti od biljke domaćina, sorte i uslova spoljašnje sredine, zasniva se na primeni fungicida 2-3 puta tokom perioda cvetanja, koje je kritično za infekciju (od fenofaze BBCH 59 do BBCH 67, **Meier**, 1997) i 1-2 tretmana u vreme sazrevanja plodova, pre berbe (**Rüegg et al.**, 1997; **Zehr et al.**, 1999). **Spiegel and Stammler** (2006) smatraju da je tokom razvoja i sazrevanja plodova potrebno do pet tretmana, dok **Yoshimuri et al.** (2004) preporučuju godišnje 1-2 tretmana fungicidima u zasadima šljive, trešnje i višnje, a 3-4 u zasadima breskve i nektarine.

Početak primene fungicida za suzbijanje *Monilinia* spp. vezuje se za otkriće bakarnih fungicida. Bordovska čorba i druga jedinjenja iz ove grupe primenjivana su za zimska prskanja, čime se značajno smanjivao infektivni potencijal prezimljujućih formi patogena (**Holb**, 2005). Danas hemijska zaštita voćaka od vrsta roda *Monilinia* takođe počinje zimskim tretiranjem nekim od preventivnih fungicida, najčešće na bazi bakra. Ipak, neke zemlje Evrope (Skandinavske zemlje i Holandija) zabranile su upotrebu preparata na bazi bakra, što se može očekivati i u drugim zemljama Evropske Unije (**Holb and Schnabel**, 2005).

Za suzbijanje vrsta roda *Monilinia* najčešće se koriste fungicidi koji utiču na sporulaciju iz sledećih hemijskih grupa: dikarboksimidi (iprodion), benzimidazoli (tiofanat-metil, karbendazim), triazoli (tebukonazol, propikonazol), strobilurini (piraklostrobin i azoksistrobin) i inhibitori sukcinat dehidrogenaze (SDH inhibitori) (boskalid) kao i protektivni fungicidi nespecifičnog mehanizma delovanja (kaptan, mankozeb, metiram, propineb, tiram, folpet, hlorotalonil i ciram) (**Miessner and Stammler**, 2010; **Baker et al.**, 2011). Istraživanja pokazuju da su u suzbijanju vrsta *Monilinia* veoma efikasni sledeći fungicidi: benomil, tiofanat-metil, vinklozolin, iprodion, bitertanol, triforin, tebukonazol i propikonazol (**Harman and Beever**, 1987;

**Takamura and Ochiai**, 1989; **Zehr et al.**, 1999; **Thomidis et al.**, 2009), s tim što treba naglasiti da je benomil zbog nepovoljnih toksikoloških osobina skinut sa Aneksa 1 Direktiva 91/414/EEC i time izbačen iz upotrebe u zaštiti voćaka (**EU Pesticide Database**, 2012).

Do osamdesetih godina XX veka najznačajniji fungicidi korišćeni za suzbijanje vrsta roda *Monilinia* bili su benzimidazoli, a među njima najveću upotrebu imali su benomil i tiofanat-metil (**Ma et al.**, 2003a). Benomil je uspešno korišćen za suzbijanje prouzrokovača sušenja cvetova u Kaliforniji od njegove registracije 1972. do 1977. godine kada je utvrđena rezistentnost (**Sonoda et al.**, 1983; **Michailides et al.**, 1987), od kada je u široj upotrebi tiofanat-metil (**Ma et al.**, 2003a). Od 1977. godine, kada je utvrđena rezistentnost *Monilinia* spp. na benzimidazole, inhibitori sinteze ergosterola (DMI fungicidi) postaju najefikasniji i najšire primenjivani fungicidi protiv vrsta ovog roda (**Zehr et al.**, 1999; **Schnabel and Bryson**, 2004). Osim DMI fungicida, u širokoj upotrebi su i dikarboksimidi, fungicidi kao što su iprodion i vinklozolin, mada je rezistentnost *Monilinia* spp. na ovu grupu fungicida detektovana ubrzo nakon njihovog uvođenja u primenu (**Lim et al.**, 2001). Propikonazol, tebukonazol i fenbukonazol postali su standard za hemijsko suzbijanje vrsta roda *Monilinia* u zasadima breskve u jugoistočnom delu SAD (**Zehr et al.**, 1999). Ispitivanja **Thomidis et al.** (2009) potvrdila su visoku efikasnost tebukonazola i iprodiona protiv prouzrokovača mrke truleži plodova koštičavih voćaka. Uprkos uspešnoj primeni DMI fungicida duže od 30 godina, tek nedavno je zabeležena smanjena osetljivost izolata u nekoliko regiona na istoku SAD (**Zehr et al.**, 1999; **Schnabel and Bryson**, 2004). Sa druge strane, razvijen je jedan novi fungicid iz ove klase – SYR-Z048 za koji još uvek ne postoje podaci o promeni osetljivosti (**Chen et al.**, 2012).

Poslednjih godina, registrovane su nove grupe fungicida sa drugačijim mehanizmom delovanja – strobilurini, karboksamidi, hidroksianilidi i anilinopirimidini koji se preporučuju za suzbijanje prouzrokovača mrke truleži. Međutim, fungicidi iz grupe strobilurina, azoksistrobin i piraklostrobin, aktivne su supstance visokog rizika za razvoj rezistentnosti (**Amiri et al.**, 2008). Zapravo, smanjena osetljivost patogena na ovu grupu jedinjenja zabeležena je u velikom broju zasada jabuke i vinove loze (**Gullino et al.**, 2004; **Köller et al.**, 2004), ali ne i prouzrokovača truleži plodova u zasadima breskve (**Amiri et al.**, 2008). Primeri novih jedinjenja sa drugačijim

mehanizmima delovanja su i fenheksamid i boskalid. Fenheksamid je hidroksianilid koji u veoma malim koncentracijama snažno inhibira izduživanje inicijalnih hifa i porast micelije, a u većim koncentracijama inhibira i klijanje konidija (**Schnabel and Bryson, 2004**), dok boskalid iz grupe karboksamida, kao i azoksistrobin i piraklostrobin, inhibira disanje patogena i ima protektivno dejstvo (**Wong and Wilcox, 2002**).

Za razliku od *M. laxa* i *M. fructicola*, *M. fructigena* značajnije štete prouzrokuje samo kada su plodovi oštećeni, tako da je najznačajnija mera borbe protiv *M. fructigena* suzbijanje insekata koji povređuju plodove i prave ulazne otvore za ovog patogena (**Holb, 2006**). Preporučuje se efikasno suzbijanje *Ragholetis cerasi* u zasadima trešnje i višnje, *Grapholita funebrana* u zasadima šljive, *Anarsia lineatella* i *G. molesta* u zasadima kajsije i breskve. Za suzbijanje *M. fructigena* na koštičavim voćkama preporučuju se 1-2 tretiranja pred berbu plodova (**Balaž, 2000**). Od fungicida za zaštitu plodova od prouzrokovala truleži u Srbiji registrovani su trifloksistrobin, trifloksistrobin + kaptan, karbendazim, ciprodinil + fludioksonil, tiofanat-metil, boskalid + piraklostrobin i bakterija *B. subtilis* (**Grahovac i sar., 2011**).

Za suzbijanje širokog spektra mikroorganizama prouzrokovala propadanja plodova tokom skladištenja trenutno postoji veliki broj fungicida koji su registrovani u SAD. Sa druge strane, u Evropskoj Uniji, Turskoj, kao i u drugim zemljama Evrope zabranjena je primena fungicida u skladištima (**Karabulut and Baykal, 2004**). Ipak, u poređenju sa sredstvima za suzbijanje štetočina broj fungicida koji se mogu koristiti tokom skladištenja ipak je veoma mali. Mnoga sredstva koja su ranije korišćena ne preporučuju se više ili im je upotreba ograničena (**Vico i Jurick, 2012**). Osim toga, dobro je poznat slučaj razvoja rezistentnosti skladišnih patogena na benomil, tiabendazol i imazalil (**Adaskaveg and Förster, 2010**).

U SAD registrovano je nekoliko fungicida za potapanje plodova koje treba uskladištiti (**Mari et al., 2007**). Fludioksonil i fenheksamid, registrovani za ove namene od 2003. i 2005. godine, mogu smanjiti količinu inokuluma koji je prisutan na površini plodova (**Karabulut et al., 2010**), ali ne mogu uticati na miceliju koja se nalazi unutar plodova. **Förster et al. (2007)** ispitivali su u laboratorijskim uslovima efikasnost fungicida u suzbijanju prouzrokovala mrke truleži tokom perioda skladištenja. Utvrdili su visoku efikasnost iprodiona, tebukonazola, azoksistrobina i fenheksamida, pri čemu

su iprodion i tebukonazol pokazali najbolju efikasnost na plodovima inokulisanim vrstom *M. fructicola*.

## 2.9. Osobine najčešće korišćenih fungicida za suzbijanje *Monilinia* spp.

Za suzbijanje *Monilinia* spp. najčešće se koriste jedinjenja iz grupe benzimidazola, dikarboksimida i triazola. Međutim, u novije vreme u upotrebi su jedinjenja iz grupe strobilurina, karboksamida i pirimidil-etil-benzamida.

### 2.9.1. Benzimidazoli

Benzimidazoli su sistemski fungicidi koji deluju na veliki broj patogena, izuzimajući pseudogljive iz klase Oomycetes. Primarni mehanizam delovanja ovih fungicida je inhibicija sinteze  $\beta$ -tubulina, što za posledicu ima sprečavanje deobe jedra (Davidse and Ishii, 1995). Benzimidazoli sa tubulinom formiraju kompleks i sprečavaju normalno izduživanje mikrotubula u vreteno i formiranje deobnog vretena bez koga ne može da se obavi deoba jedra i završi mitotička deoba ćelije (Davidse, 1987). Najvažniji predstavnici fungicida iz ove grupe su benomil, karbendazim, tiabendazol i tiofanat-metil.

Yoshimura et al. (2004) ispitivali su osetljivost izolata *M. fructicola* na tiofanat-metil i dobili  $EC_{50}$  vrednosti u intervalu od 0,17 do preko 30  $\mu\text{g/ml}$ . S obzirom na veliku razliku u osetljivosti podelili su izolate u tri grupe: osetljive ( $EC_{50} < 2 \mu\text{g/ml}$ ), umerno osetljive ( $EC_{50} 2\text{-}30 \mu\text{g/ml}$ ) i rezistentne ( $EC_{50} > 30 \mu\text{g/ml}$ ). Stević i Vukša (2006) utvrdili su parametre osetljivosti izolata *M. laxa* na benomil;  $EC_{50}$  vrednosti su se kretale u intervalu od 123 do 901  $\mu\text{g/kg}$ .

Pojava rezistentnosti gljiva na benzimidazole posledica je promena na  $\beta$ -tubulinu, mestu njihovog vezivanja. Kod različitih vrsta gljiva otkriveno je desetak mutacija na genu za  $\beta$ -tubulin, koje za posledicu imaju rezistentnost na ova jedinjenja. Najčešće i najznačajnije mutacije dešavaju se na kodonima 198 i 200. Ma et al. (2005) utvrdili su da kod rezistentnih izolata *M. laxa* na benzimidazole dolazi do mutacije na kodonu 240 i zamene lecitina fenilalaninom. Sa druge strane, utvrđena je mutacija na kodonu 198 visokorezistentnih izolata *M. laxa* iz Grčke (Malandrakis et al., 2012).

Takođe, utvrđena je i mutacija na kodonu 198 kod visokorezistentnih i na kodonu 6 kod slabo rezistentnih izolata *M. fructicola* na benzimidazole. Izolati rezistentni na jedno jedinjenje iz grupe benzimidazola istovremeno su rezistentni i na ostale predstavnike ove grupe, dok ukrštena rezistenost između benzimidazola i jedinjenja iz drugih hemijskih grupa nije utvrđena (FRAC, 2005).

Pet godina nakon početka upotrebe benomila za suzbijanje *M. fructicola* registrovana je pojava rezistentnosti.  $EC_{50}$  vrednosti rezistentnih izolata iz Kalifornije relativno su niske (0,5-4  $\mu\text{g/ml}$ ) u poređenju sa  $EC_{50}$  vrednostima rezistentnih izolata iz drugih delova sveta (veće od 50  $\mu\text{g/ml}$ ) (Yoshimura et al., 2004). Međutim, veoma nisku efikasnost benomila i tiofanat-metila u suzbijanju *M. fructicola* u polju utvrdili su Ma et al. (2003a; 2005) i Lim et al. (2006). Rezistentnost *M. laxa* na benomil prvi su utvrdili Ogawa et al. (1981). Michailides et al. (1987) testirali su osetljivost većeg broja izolata *M. fructicola* i *M. laxa* na benomil. Kolonije većine ispitivanih izolata *M. fructicola* uobičajeno su rasle na podlozi sa 1 mg/l benomila, a pojedini izolati razvijali su se i na podlozi sa 4 i 8 mg/l benomila, dok su se svi izolati *M. laxa* pokazali kao normalno osetljivi.

### 2.9.2. Dikarboksimidi

Dikarboksimidi ispoljavaju protektivno delovanje u suzbijanju fitopatogenih gljiva iz rodova *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Monilinia*, *Alternaria*, *Sclerotium*, *Phoma*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia* i *Corticium*. Različita aktivnost kao i spektar delovanja pojedinih jedinjenja iz ove grupe uslovljeni su njihovom hemijskom strukturom. Dikarboksimidi imaju cikličnu komponentu koja može biti oksazolidindion (vinklozolin i hlozolinat), sukcinimid (prosimidon i metomeklan) i hidantoin (iprodition).

Primarni mehanizam delovanja dikarboksimida još uvek nije sa sigurnošću utvrđen. Utvrđeno je da inhibiraju porast micelije i klijanje konidija, s tim što je inhibicija klijanja konidija slabije izražena (Edlich and Lyr, 1995). Ova jedinjenja utiču na strukturu i mitotsku deobu ćelije, sintezu proteina ćelijskih membrana, RNK i DNK, a remete i metabolizam sterola i lipida.

Yoshimura et al. (2004) utvrdili su  $EC_{50}$  vrednosti za iprodion za izolate *M. fructicola* u intervalu od 0,01 do 0,65  $\mu\text{g/ml}$ , dok se osetljivost izolata *M. fructicola* iz



Koreje kretala u intervalu od 0,021-399  $\mu\text{g/ml}$  (Lim et al., 2001). Stević i Vukša (2006) takođe su ispitali parametre osetljivosti izolata *M. laxa* na iprodion i utvrdili  $\text{EC}_{50}$  vrednosti u intervalu od 125 do 301  $\mu\text{g/kg}$ .

Razvoj rezistentnosti gljiva na dikarboksimide, prvenstveno iprodion, utvrđen je u drugoj polovini XX veka. Rezistentnost je zabeležena kod *B. cinerea* (Pommer and Lorenz, 1982; Beever and Brein, 1983), *M. fructicola* (Ritchie, 1982), *Sclerotinia homeocarpa* (Detweiler et al., 1983), *Sclerotium cepivorum* (Littley and Rahe, 1984) i *Alternaria alternata* (McPhee, 1980; Ma et al., 2003b). Rezistentnost *M. fructicola* na iprodion nije još uvek utvrđena u SAD, ali je detektovana na Novom Zelandu i u Australiji (Yoshimura et al., 2004).

### 2.9.3. Imidazoli i triazoli

Derivati imidazola i triazola spadaju u grupu heterocikličnih jedinjenja. Imidazoli su petočlana heterociklična jedinjenja sa dva atoma azota, a triazoli sa tri atoma azota. N-derivati imidazola i triazola inhibiraju biosintezu ergosterola gljiva i najpre su bili označeni kao EBIs (Ergosterol Biosynthesis Inhibitors). Ergosterol je glavni konstitutivni i funkcionalni deo ćelijskih membrana gljiva i predstavlja najvažniji sterol kod većine gljiva (Buchenaer, 1987). Međutim, ustanovljeno je da postoje gljive kojima osnovni sterol nije ergosterol, tako da je termin EBIs zamenjen izrazom SBIs (Sterol Biosynthesis Inhibitors).

Fungicidi iz ovih hemijskih grupa inhibiraju demetilaciju ugljenika kod prekursora ergosterola, i to kod lanosterola u položaju C-14 ili u položaju C-24 kod metilen dihidrolanosterola, i označeni su kao DMI fungicidi (DeMethylation Inhibitors) (Kuck et al., 1995). Utvrđeno je da se nesupstituisani azot u heterocikličnom prstenu fungicida vezuje za gvožđe u citohromu P-450, formirajući superoksid –  $\text{Fe}^{3+}$  kompleks, koji inhibira dioksigene reakcije neophodne za hidroksilaciju 14  $\alpha$ -metil grupe intermedijera sterola, što rezultira akumulacijom 14  $\alpha$ -metilovanih sterola (Buchenaer, 1987). Kao posledica rane inhibicije sinteze ergosterola dolazi do akumulacije intermedijera koji sadrže metil grupu - metilovanih sterola, prvenstveno eburikola, obtusifoliola i 14  $\alpha$ -metilfekosterola, dok se sadržaj ergosterola u ćelijskim membranama smanjuje (Nozawa and Morita, 1986). Gljive su na taj način lišene

ergosterola, ali je najverovatnije njihov rast smanjen zbog akumulacije metilovanih sterola, koji izazivaju povećanje permeabilnosti membrana, promenu aktivnosti vezanih enzima u membrani i promene u usvajanju hranljivih materija (**Buchenauer**, 1987). Ovi fungicidi ne inhibiraju klijanje spora gljiva, ali veoma efikasno i u malim koncentracijama sprečavaju rast micelije.

Rezultati **Schnabel and Bryson** (2004) ukazuju na visoku efikasnost DMI fungicida protiv *Monilinia* spp. ali ističu da ona može izostati u godinama sa velikim infektivnim potencijalom patogena. **Yoshimura et al.** (2004) utvrdili su osetljivost izolata *M. fructicola* na tebukonazol ( $EC_{50}$  0,0059-0,0607  $\mu\text{g/ml}$ ), pri čemu je samo 4% izolata imalo  $EC_{50} > 0,025$   $\mu\text{g/ml}$ . **Stević i Vukša** (2006) ispitivali su parametre osetljivosti izolata *M. laxa* i utvrdili  $EC_{50}$  za tebukonazol 14-41  $\mu\text{g/kg}$ . **Zehr et al.** (1999) poredili su osetljivost izolata *M. fructicola* na propikonazol u periodu od nekoliko godina i utvrdili da je došlo do promene u osetljivosti izolata, da su izolati istog porekla tokom godina postajali manje osetljivi. Osim toga i istraživanja **May-De Mio et al.** (2011) pokazuju promene u osetljivosti populacija *M. fructicola* na tebukonazol. Izolati *M. fructicola* prikupljeni tokom 2000-2004. godine imaju znatno niže  $EC_{50}$  vrednosti (0,01-0,27  $\mu\text{g/ml}$ ) od izolata prikupljenih tokom 2005-2008. godine (0,01->100  $\mu\text{g/ml}$ ). Osim toga, autori su detektovali u novim populacijama 15,8% izolata rezistentnih na tebukonazol. **Chen et al.** (2012) ispitivali su osetljivost izolata *M. fructicola* na novi fungicid iz grupe DMI fungicida SYP-Z048.  $EC_{50}$  vrednosti izolata *M. fructicola* za novi fungicid kretale su se u intervalu od 0,003 do 0,047  $\mu\text{g/ml}$  i ukazale na visoku osetljivost izolata i odsustvo rezistentnosti.

Ubrzo nakon uvođenja DMI fungicida detektovana je rezistentnost velikog broja patogena u laboratorijskim uslovima, dok je rezistentnost u polju potvrđena kod manjeg broja patogena. S obzirom na veoma široku primenu u velikom broju useva, rezistentnost na DMI fungicide razvija se sporije u odnosu na druge fungicide sa specifičnim mehanizmom delovanja. Nije detektovana rezistentnost izolata *M. fructicola* na fungicide iz ove grupe, ali je utvrđena smanjena osetljivost izolata *M. fructicola* na propikonazol (**Yoshimura et al.**, 2004).

Genetski mehanizmi razvoja rezistentnosti na DMI fungicide su različiti, ali najčešće dolazi do mutacije u okviru gena za 14  $\alpha$ -metilazu (*CYP51*) ili do njegove pojačane ekspresije. Kod fitopatogene gljive *M. fructicola* utvrđeno je prisustvo

genetičkog motiva „Mona“ u okviru gena MfCYP51 koji se smatra odgovornim za rezistentnost ove vrste (Luo et al., 2008). Međutim, istraživanja Villani and Cox (2011) pokazala su da „Mona“ nije stabilan element koji može ukazati na rezistentnost jer su kod nekih izolata dokazali rezistentnost u *in vitro* testovima, ali nisu detektovali prisustvo „Mona“ elementa. Autori su na osnovu ovih istraživanja zaključili da „Mona“ element ne može biti pouzdan karakter za detekciju rezistentnih izolata *M. fructicola* na DMI fungicide.

#### 2.9.4. Strobilurini

Strobilurini prvi put su identifikovani krajem osamdesetih godina XX veka kada su izolovani iz pojedinih gljiva iz klase Basidiomycetes. Za ove supstance utvrđeno je da poseduju fungicidno i fungistatično delovanje, ali je njihova šira primena izostala zbog izražene fotodegradibilnosti. Na osnovu karakteristika ovih prirodnih jedinjenja stvorene su sintetičke supstance koje imaju istu osnovnu strukturu, ali znatno stabilnije molekule. Prvi fungicidi iz grupe strobilurina koji su se sredinom 90-ih godina prošlog veka pojavili na tržištu bili su azoksistrobin i kresoksim-metil (Sauter et al., 1999). Najznačajniji predstavnici ove grupe su azoksistrobin, trifloksistrobin i piraklostrobin.

Fungicidi iz grupe strobilurina imaju specifičan mehanizam delovanja koji nije bio poznat do njihovog otkrića. Ove supstance vezuju se za proteinske podjedinice citohrom bc1 kompleksa u okviru elektron transportnog lanca, koji je smešten u unutrašnjoj membrani mitohondrija, remeteći proces ćelijskog disanja kod gljiva (Sauter et al., 1995; Jordan et al., 1999; Tamura and Mizutani, 1999; Fisher and Meunier, 2008). Strobilurini se vezuju za ubikvinol oksidazni (Qo) centar citohroma b, što za posledicu ima prekid transfera elektrona sa ubikvinola na citohrom C14 (Fraaje et al., 2003).

S obzirom da inhibiraju ubikvinol oksidazu (Qo), strobilurini i njima slična jedinjenja, gde spadaju oksazolidindioni (famoksadon) i imidazolinoni (fenamidon), u anglosaksonskoj literaturi veoma često se označavaju sa QoI fungicidi (skraćeno od Qo-Inhibitors) (FRAC, 2004).

Kod nekih gljiva i biljaka, inhibitori respiratornog lanca i drugi stresni faktori mogu indukovati stvaranje takozvane alternativne oksidaze. Ova alternativna oksidaza

posredno utiče na proces disanja tako što preusmerava elektrone na ubikvinol (Q) i tako ćelije gljiva postaju manje osetljive na dejstvo ovih jedinjenja (**Ypema and Gold, 1999**). U *in vitro* testovima osetljivosti gljiva i pseudogljiva na fungicide koji remete procese disanja uočeno je da pojedine vrste poseduju sposobnost aktiviranja alternativnog načina disanja. Patogen se nesmetano razvija čak i u prisustvu visokih koncentracija fungicida, zbog čega se dobija lažna slika rezistentnosti izolata na ova jedinjenja. Ovaj fenomen se vezuje isključivo za laboratorijska ispitivanja osetljivosti i nije prisutan u ispitivanjima efikasnosti *in vivo*. Jedno od objašnjenja ove pojave je da biljka domaćin proizvodi flavonoide i da su oni odgovorni za sprečavanje stvaranja alternativnih oksidaza. Kako bi se sprečilo korišćenje alternativnog disajnog puta u ogledima ispitivanja osetljivosti *in vitro* koristi se salicilhidroksamična kiselina (SHAM), supstanca koja inhibira aktiviranje alternativnih oksidaza (**Ziogas et al., 1997**).

U istraživanjima **Burnett et al. (2010)** od tri fungicida iz ove hemijske grupe najbolji antisporulant protiv *M. fructicola* bio je trifloksistrobin. Azoksistrobin je ispoljio umerenu, a kombinacija piraklostrobin+boskalid najslabiju efikasnost. **Spiegel and Stammler (2006)** ispitivali su osetljivost izolata *M. laxa* i *M. fructigena* na piraklostrobin i utvrdili da nema razlike u osetljivosti između izolata različitog porekla. Na osnovu ovih istraživanja preporučili su koncentraciju od 2,5 ppm kao diskriminacionu dozu za identifikaciju rezistentnih sojeva *Monilinia* spp. **Stević i Vukša (2006)** takođe su utvrdili da nema velike razlike u osetljivosti na trifloksistrobin između izolata *M. laxa* različitog porekla; EC<sub>50</sub> vrednosti za trifloksistrobin bile su 4-9 µg/kg.

Kada su strobilurini uvedeni u primenu, pretpostavljalo se da će gljive teško razviti rezistentnost na ova jedinjenja zbog potpuno novog i do tada nepoznatog mehanizma delovanja. Međutim, do pojave rezistentnosti došlo je mnogo ranije nego što se očekivalo. Rezistentnost na strobilurine prvi put je registrovana na severu Nemačke, gde su pronađeni rezistentni sojevi *Blumeria (Erysiphe) graminis* (**Ishii et al., 2001**). Takođe, rezistentnost je detektovana i kod mnogih drugih vrsta gljiva, pa i *M. fructicola* (**Amiri et al., 2010**).

U većini slučajeva rezistentnost na QoI fungicide rezultat je tačkaste mutacije u mitrohondrijalnom genu citohroma b. U položaju 143 dolazi do supstitucije glicina

alaninom (G143A), dok u položaju 129 dolazi do zamene fenilalanina leucinom. **Miessner and Stammler** (2010) ispitivali su značaj mesta mutacije G143A za razvoj rezistentnosti vrsta roda *Monilinia* na QoI fungicide.

### 2.9.5. Pirimidil-etil-benzamidi

Pirimidil-etil-benzamidi poznati su kao inhibitori sukcinat dehidrogenaze (SDH) u respiratornom lancu i imaju značajnu ulogu u zaštiti useva i zasada od različitih fitopatogenih gljiva. Ovi molekuli vezuju se za proteinski kompleks II u mitohondrijalnom respiratornom lancu i na taj način remete proces disanja. Zahvaljujući ovom jedinstvenom mehanizmu delovanja, nije utvrđena ukrštena rezistentnost jedinjenja iz ove grupe sa jedinjenjima iz drugih hemijskih grupa, kao što su strobilurini, benzimidazoli ili aminopirimidini (**Avenot et al.**, 2008).

Fluopiram je jedan od novijih fungicida iz grupe pirimidil-etil-benzamida sa sistemskim načinom delovanja. Budući da je fluopiram nova aktivna materija iz ove grupe još uvek nema mnogo podataka o njegovom delovanju na *Monilinia* spp. U istraživanjima **Hu et al.** (2011b) utvrđeno je da za ispitivanje osetljivost izolata *M. fructicola* na fluopiram nije pogodna PDA podloga jer su  $EC_{50}$  vrednosti bile više od 100 µg/ml za pojedine izolate što nije saglasno sa rezultatima drugih autora (**Amiri et al.**, 2010). Kada su za ispitivanje osetljivosti izolata *M. fructicola* upotreбили druge hranljive podloge dobili su potpuno drugačije rezultate.  $EC_{50}$  vrednosti na MM podlozi (minimal medium) za fluopiram kretale su se u intervalu od 0,059-15,6 µg/ml (**Hu et al.**, 2011b).

### 2.9.6. Karboksamidi

Karboksamidi su sistemski fungicidi koji inhibiraju enzim sukcinat dehidrogenazu koji predstavlja funkcionalnu jedinicu ciklusa trikarboksilnih kiselina i elektrontransportnog sistema mitohondrija, uglavnom bazidiomiceta (**Kulka and Von Schelming**, 1995; **Spiegel and Stammler**, 2006). Selektivnost ove grupe fungicida zasniva se na razlici u osetljivosti enzima na delovanje fungicida i/ili na mogućnosti

dospevanja fungicida do mesta delovanja (**Leroux**, 2004). Novi fungicid širokog spektra delovanja iz ove grupe je boskalid.

**Spiegel and Stammler** (2006) ispitivali su osetljivost izolata *M. laxa* i *M. fructigena* na boskalid i utvrdili da nema razlike u osetljivosti između izolata različitog porekla. Na osnovu ovih istraživanja preporučili su koncentraciju od 2,5 ppm kao diskriminacionu dozu za detekciju rezistentnih sojeva *Monilinia* spp. Sa druge strane, **Hu et al.** (2011b) ispitujući osetljivost izolata *M. fructicola* na boskalid pokazali su da PDA podloga u koju je inkorporiran fungicid nije pogodna za ispitivanje osetljivosti.  $EC_{50}$  vrednosti bile su više od 100  $\mu\text{g/ml}$  za pojedine izolate što nije saglasno sa rezultatima drugih autora kod kojih je utvrđena  $EC_{50}$  vrednost bila manja od 10  $\mu\text{g/ml}$  (**Amiri et al.**, 2010). Kada su za ispitivanje osetljivosti izolata *M. fructicola* na boskalid upotrebili druge hranljive podloge dobili su potpuno drugačije rezultate.  $EC_{50}$  vrednosti na MM podlozi (minimal medium) za boskalid bile su 0,013-2,10  $\mu\text{g/ml}$  (**Hu et al.**, 2011b).

Rezistentnost na boskalid još uvek nije detektovana za vrste roda *Monilinia* (**Spiegel and Stammler**, 2006), ali je detektovana za druge fitopatogene gljive - *Alternaria alternata*, *Corynespora cassiicola*, *Botrytis cinerea*, *Didymella bryoniae*, *Podosphaera xanthii* i *Sclerotinia sclerotiorum* (**Avenot and Michailides**, 2010). Kao razlog pojave rezistentnosti autori navode mutacije na genu AaSDHB kod *A. alternata*, genu SDH B kod *B. cinerea*, H278Y kod *C. cassiicola*, *D. bryoniae* i *P. xanthii*.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U programu istraživanja ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- Da se utvrdi prisustvo, rasprostranjenost i značaj gljiva iz roda *Monilinia*, prouzrokovaca sušenja cvetova, grana i grančica i mrke truleži plodova koštičavih voćaka u Srbiji.
- Da se izvrši precizna i pouzdana identifikacija dobijenih izolata do nivoa vrste primenom morfoloških i molekularnih metoda identifikacije.
- Da se prouče morfološke, odgajivačke, ekološke i patogene osobina izolata *Monilinia* spp.
- Da se izvrši molekularna karakterizacija vrsta roda *Monilinia* sekvencioniranjem ITS regiona odabranih izolata, njihovim međusobnim poređenjem i određivanjem filogenetskog međuodnosa sa izolatima *Monilinia* spp. u svetu.
- Da se ispita intraspecijska varijabilnost *M. fructicola* primenom SSR markera i odrede putevi introdukcije ove vrste u Srbiju.
- Da se ispita osetljivost izolata *Monilinia* spp. na fungicide različitih mehanizama delovanja koji se uobičajeno koriste za njihovo suzbijanje.
- Da se prouči osetljivost izolata *Monilinia* spp. na različite agense za biološku zaštitu - antagonističke mikroorganizme i etarska ulja i utvrdi mogućnost njihove upotrebe za suzbijanje *Monilinia* spp.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Sakupljanje uzoraka obolelih biljaka

Uzorci obolelih delova koštičavih voćaka sa simptomima sušenja cvetova, grana i grančica i mrke truleži plodova sakupljeni su tokom trogodišnjeg perioda od 2010. do 2012. godine. Sakupljanje početnog materijala za ispitivanje obavljeno je sa 119 lokaliteta iz 15 različitih okruga na teritoriji Republike Srbije.

Biljni organi sa simptomima nalik simptomima koje prouzrokuju vrste roda *Monilinia* sakupljeni su u zasadima i zelenim pijacama sa šest vrsta koštičavih voćaka: breskve (*Prunus persica*), kajsije (*Prunus armeniaca*), nektarine (*Prunus persica* var. *nectarina*), šljive (*Prunus domestica*), trešnje (*Prunus avium*) i višnje (*Prunus cerasus*).

Nakon sakupljanja, zaraženi biljni delovi pakovani su pojedinačno u papirne kese, obeleženi i transportovani do Laboratorije za primenjenu fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu, gde su dalje ispitivani.

### 4.2. Izolacija patogena

Iz sakupljenih uzoraka obavljena je izolacija patogena primenom standardnih fitopatoloških metoda (**Dhingra and Sinclair**, 1995). Sitni fragmenti sa prelaza zdravog i obolelog tkiva isecani su sterilnim skalpelom, zatim površinski sterilisani u 2% rastvoru natrijum hipohlorita (NaOCl, 1:1 komercijalna varikina) u trajanju od jedan do dva minuta i preneti na sterilnu PDA podlogu (podloga od krompira, dekstroze i agara, potato dextrose agar, PDA) (200 g krompira, 20 g dekstroze, 17 g agara, 1 l destilovane vode) (**Muntañola-Cvetković**, 1987). Zasejane podloge inkubirane su u mraku, na temperaturi od 24°C do pojave kolonija gljiva. Nakon inkubacije, kolonije koje po tipu porasta odgovaraju vrstama roda *Monilinia* u aseptičkim uslovima presejane su na svežu podlogu sa ciljem dobijanja čiste kulture gljive.

Dobijeni izolati označeni su kombinacijom slova i brojeva pri čemu prvo slovo predstavlja biljku domaćina sa kojeg je izvršena izolacija (K-kajsija, B-breskva, S-šljiva, T-trešnja, V-višnja, N-nektarina), drugo slovo - deo biljke sa koje je izvršena izolacija (P-plod, G-grančica, C-cvet), a naredna slova - lokalitete sa kojih potiču.



### **4.3. Dobijanje čistih kultura monosporijalnih izolata i njihovo čuvanje**

Sa ciljem dobijanja monosporijalnih izolata iz čistih kultura dobijenih izolata starosti sedam dana, odgajenih na PDA podlozi pripremane su suspenzije konidija. U kulture je dodato po 10 ml sterilne vode i blagim struganjem pomoću staklenog štapića obavljeno je oslobađanje micelije i konidija od podloge. Po 100 µl tako dobijene suspenzije spora razliveno je na površinu podloge od vodenog agara (water agar, WA), pripremljene od 17 g agara i 1 l destilovane vode (**Dhingra and Sinclair, 1995**). Nakon inkubacije u termostatu na temperaturi 24°C u trajanju od 18-20 h, direktnim mikroskopiranjem obeležavane su i izdvajane pojedinačne prokljale konidije svakog izolata, a zatim su sterilnom iglom prenete na novu PDA podlogu.

Dobijeni monosporijalni izolati su zatim presejani u epruvete sa zakošenom PDA podlogom i nakon razvoja kultura na temperaturi od 24°C, čuvane u frižideru na temperaturi od 4°C (**Dhingra and Sinclair, 1995**). Izolati su presejavani jednom godišnje. Za dugotrajno čuvanje izolati su skladišteni u 20% glicerolu na temperaturi od -80°C.

### **4.4. Provera patogenosti izolata**

Patogenost svih dobijenih monosporijalnih izolata proverena je veštačkom inokulacijom povređenih i nepovređenih plodova biljaka domaćina sa kojih su izolovani (**Vignutelli et al., 2002**). Inokulacija je obavljena nanošenjem fragmenata micelije izolata (prečnika 3 mm), uzetih sa ivice kolonija starosti sedam dana odgajenih na PDA podlozi, na prethodno površinski dezinfikovane zdrave plodove. Na plod u kontroli nanošen je fragment sterilne PDA podloge. Inokulisani plodovi inkubirani su u vlažnoj komori na temperaturi od 24°C, a pojava simptoma posmatrana je svakodnevno tokom 10 dana. Nakon pojave simptoma mrke truleži, sa inokulisanih plodova urađena je reizolacija patogena na PDA podlogu korišćenjem istih metoda kao i pri izolaciji. Dobijeni reizolati upoređeni su sa izolatima korišćenim za inokulaciju radi potvrde da su dobijeni simptomi truleži inokulisanih plodova posledica patogene aktivnosti izolata. Za dalji rad korišćeni su reizolati.

#### 4.5. Identifikacija patogena

Nakon dobijanja 246 izolata nalik izolatima *Monilinia* spp. pristupilo se identifikaciji do nivoa vrste na osnovu proučavanja patogenih, morfoloških, odgajivačkih i ekoloških karakteristika i potvrde identifikacije primenom lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR). Provera patogenosti, proučavanje specifičnih morfoloških karakteristika koje je opisao Lane (2002) (boja kolonije, odlike ruba i oblik kolonije, sporulacija, prisustvo koncentričnog prstena spora, kvalitativna brzina porasta i prisustvo crne marginalne linije) i molekularna detekcija primenom Multiplex PCR reakcije urađeni su sa svim prikupljenim izolatima. Na osnovu preliminarnih istraživanja pomenutih kriterijuma, pre svega morfoloških, izvršen je odabir reprezentativnih izolata (Tabela 1) – predstavnika preliminarno identifikovanih vrsta *Monilinia* spp. za detaljnija proučavanja patogenih, morfoloških, odgajivačkih, ekoloških i molekularnih karakteristika, kao i za ispitivanje osetljivosti na fungicide. Za proučavanje efekata etarskih ulja i antagonističkih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na *Monilinia* spp., kao i mogućnosti njihove praktične primene, odabran je po jedan reprezentativni izolat od svake vrste.

Tabela 1. Izolati *Monilinia* spp. odabrani za dalja proučavanja

Vrsta	Oznaka izolata	Lokalitet	Biljka domaćin	Godina izolacije
<i>M. laxa</i>	TPGR	Grocka	Trešnja	2010.
	ŠMLEs	Leskovac	Šljiva	2010.
	ŠPSV	Slankamenački Vinogradi	Šljiva	2010.
	TPBN	Bosut	Trešnja	2010.
	ŠMLE	Leskovac	Šljiva	2010.
	VGRSD	Smederevo	Višnja	2011.
	BPSV	Slankamenački Vinogradi	Breskva	2012.
	BMLEs	Leskovac	Breskva	2010.
	TPAL	Alibegovac	Trešnja	2010.
	NPSP	Stara Pazova	Nektarina	2012.
	BPČO	Čortanovci	Breskva	2012.
	TPRŠ	Rimski Šančevi	Trešnja	2012.
	TPLČ	Loznica (ČA)	Trešnja	2012.
	BPZK	Zaklopača	Breskva	2012.
	VGRSE	Sečanj	Višnja	2010.
	VPSV	Slankamenački Vinogradi	Višnja	2012.
	ŠPIV	Ivanjica	Šljiva	2012.
	VPJR	Jermenovac	Višnja	2012.
	KPGO	Golobok	Kajsija	2012.
KPGG	Gornja Gorevnica	Kajsija	2012.	
NPVI	Vinča	Nektarina	2012.	
<i>M. fructigena</i>	BŠPBA	Bare	Šljiva	2012.
	VPBG	Beograd	Višnja	2010.
	ŠPPR	Preljina	Šljiva	2012.
	TPGO	Golobok	Trešnja	2012.
	ŠPBA	Bare	Šljiva	2012.
<i>M. fructicola</i>	NPGM	Topola	Nektarina	2011.
	NPUD1	Udovice	Nektarina	2012.
	NPUD2	Udovice	Nektarina	2012.

#### 4.6. Morfološke karakteristike izolata *Monilinia* spp.

Proučavanje morfoloških odlika obuhvatilo je proučavanje makroskopskih i mikroskopskih karakteristika odabranih izolata patogena. Makroskopske morfološke karakteristike svih dobijenih izolata proučavane su nakon inkubacije od 10 dana na PDA podlozi na temperaturi od 22°C. Posmatrane su karakteristične osobine prema navodima **Lane** (2002): boja kolonije, odlike ruba i oblik kolonije, sporulacija, prisustvo koncentričnog prstena spora, kvalitativna brzina porasta i prisustvo crne marginalne linije.

Od mikroskopskih osobina odabranih izolata ispitivane su: izgled konidiofora, oblik i veličina konidija, koncentracija konidija po jedinici površine, način klijanja konidija, kao i dužina kličinih cevčica pre prvog grananja (**Muntañola-Cvetković**, 1987; **Dhingra and Sinclair**, 1995; **van Leeuwen and van Kesteren**, 1998; **De Cal and Melgarejo**, 1999). Od kultura izolata gajenih 10 dana na MA (malt) podlozi pripremani su privremeni mikroskopski preparati za posmatranje izgleda konidiofora i konidija. Preparat je pripreman u kapi sterilne vode u koju je sterilnom iglom nanošen fragment kolonije bez podloge, a potom prekriven pokrovnim staklom i posmatran uz pomoć optičkog mikroskopa Olympus CX41, pod uvećanjima od 40x do 100x.

Na preparatima pripremanim na opisan način određivana je veličina konidija odabranih izolata prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja. Sve dimenzije merene su na slučajno odabranim, potpuno formiranim i zrelim konidijama u vidnom polju privremenog preparata.

Od kultura iste starosti pravljen je suspenzija spora dodavanjem iste zapremine sterilne destilovane vode po jedinici površine i izvršeno je merenje koncentracije spora pomoću hemocitometra. Konidije su isprane sa 10 ml sterilne vode nakon čega je određena koncentracija spora. Brojanje je izvršeno u tri ponavljanja za svaki odabrani izolat.

Za određivanje načina klijanja konidija i dužine kličine cevčice, kao i za utvrđivanje procenta klijavosti konidija, 100 µl suspenzije konidija zasejano je na WA podlozi i ravnomerno raspoređeno korišćenjem sterilnog staklenog štapića. Nakon inkubacije od 18 h na temperaturi od 24°C u mraku posmatran je način klijanja konidija

i merena dužina kličine cevčice od konidije do mesta prvog grananja. Mereno je 50 kličinih cevčica za svaki izolat, a eksperiment je ponavljen najmanje jednom.

#### 4.7. Praćenje brzine porasta izolata *Monilinia* spp.

Fragmenti micelije 12 odabranih izolata prečnika 3 mm, uzeti sa ivice sedam dana stare kolonije gljive gajene na PDA podlozi, nanošeni su na PDA podlogu u Petri kutijama prečnika 90 mm i inkubirani sedam dana na temperaturi od 24°C. Prečnik kolonije je meren u dva pravca pod pravim uglom i preračunavan je dnevni porast izolata. Ogled je izveden u četiri ponavljanja, a podaci su statistički obrađeni.

#### 4.8. Odgajivačke karakteristike izolata *Monilinia* spp.

Od odgajivačkih odlika proučen je uticaj pet različitih hranljivih podloga i uticaj 12 vrednosti kiselosti PDA podloge na porast 12 odabranih izolata.

**Uticaj hranljivih podloga.** Brzina porasta ispitivanih izolata praćena je na sledećim podlogama:

- krompir-dekstrozni agar (PDA, potato dextrose agar; **Muntañola-Cvetković**, 1987):

krompir	200 g
dekstroza	20 g
agar	17 g
destilovana voda	1 l

- vodeni agar (WA, water agar; **Dhingra and Sinclair**, 1995):

agar	17 g
destilovana voda	1 l

- Čapek agar (CzA, Czapek agar; **Muntañola-Cvetković**, 1987):

NaNO <sub>3</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,50 g
KCl	0,50 g
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,01 g

saharoza	30 g
agar	15 g
destilovana voda	1 l

- malt agar (MA, malt agar; **Muntañola-Cvetković**, 1987):

industrijski slad	500 ml
agar	17 g
destilovana voda	500 ml

- V8 agar (V8A, vegetable-8 juice agar; **Miller**, 1955):

sok svežeg paradajza	200 ml
CaCO <sub>3</sub>	3 g
agar	17 g
destilovana voda	800 ml

Pripremljene podloge razlivane su u Erlenmajer kolbe i sterilisane u autoklavu 20 minuta, na temperaturi od 120°C i pri pritisku od 0,2 MPa. U Petri kutije prečnika 90 mm sa odgovarajućom podlogom naneti su isečci podloge sa micelijom prečnika 3 mm, uzeti sa ivice kolonije gljive gajene na PDA podlozi tokom sedam dana. Zasejane Petri kutije inkubirane su na temperaturi od 24°C u mraku. Brzina porasta merena je sedam dana nakon zasejavanja, merenjem prečnika kolonije u dva pravca pod pravim uglom. Ogljed je izveden u dva nezavisna eksperimenta sa po tri ponavljanja, a podaci su statistički obrađeni.

**Uticaj kiselosti podloge.** Za ispitivanje uticaja kiselosti podloge na porast izolata korišćena je PDA podloga. Kiselost podloge je podešena na 12 vrednosti nakon sterilizacije u intervalu od pH 2 do pH 12 pomoću 0,1N HCl i 0,1N NaOH (**Dhingra and Sinclair**, 1995). Porast izolata praćen je nakon sedam dana od zasejavanja na temperaturi od 24°C u mraku, merenjem prečnika kolonije u dva pravca pod pravim uglom. Ogljed je izveden u dva nezavisna eksperimenta sa po tri ponavljanja, a podaci su statistički obrađeni.

#### 4.9. Ekološke karakteristike izolata *Monilinia* spp.

Proučavanje ekoloških osobina obuhvatilo je uticaj abiotskih faktora, temperature i osvetljenja na porast odabranih izolata.

**Uticaj temperature.** Uticaj temperature na porast izolata praćen je zasejavanjem izolata na PDA podlogu na već opisan način. Nakon zasejavanja, Petri kutije inkubirane su u mraku na sledećim temperaturama: 18, 20, 23, 25, 28 i 30°C. Porast izolata i način merenja urađen je po postupku opisanom kod gajenja gljiva na različitim hranljivim podlogama. Ogled je izveden u dva nezavisna eksperimenta sa po tri ponavljanja, a podaci su statistički obrađeni.

**Uticaj ekstremnih temperatura.** Uticaj ekstremnih temperatura na porast izolata praćen je inkubiranjem izolata zasejanih na PDA podlogu na temperaturama nižim od 4°C (od 0°C do 4°C) i višim od 30°C (od 30°C do 35°C), kako bi bile utvrđene granične temperature porasta odabranih izolata. Porast izolata i način merenja obavljen je po postupku opisanom kod gajenja gljive na različitim hranljivim podlogama. Ogled je izveden u dva nezavisna eksperimenta sa po tri ponavljanja, a dobijeni rezultati statistički obrađeni.

**Uticaj svetlosti.** Porast ispitivanih izolata proučavan je zasejavanjem gljive na PDA podlozi, koja je potom inkubirana sedam dana na temperaturi od 24°C u različitim uslovima osvetljenja: stalni mrak i svetlosni režim 12 h svetlost/12 h mrak. Ogled je izveden u dva nezavisna eksperimenta sa po tri ponavljanja, a podaci su statistički obrađeni.

#### **4.10. Testovi unakrsne patogenosti**

Za testove virulentnosti odabrano je ukupno devet ispitivanih izolata, po četiri izolata *M. laxa* i *M. fructigena* dobijenih sa različitih biljaka domaćina i lokaliteta i jedan izolat *M. fructicola* poreklom sa ploda nektarine (Tabela 1). Virulentnost odabranih izolata proučavana je veštačkim inokulacijama povređenih zrelih plodova koštičavih voćaka: breskve, kajsije, nektarine, šljive, trešnje i višnje (**Vignutelli et al.**, 2002). Plodovi koštičavih voćaka pre postavljanja oglada površinski su dezinfikovani potapanjem u 0,5% rastvor NaClO u trajanju od pet minuta, a zatim ispirani tri puta sterilnom destilovanom vodom i prosušeni na filter papiru u aseptičnim uslovima. Potom je svaki plod povređivan konusnom iglom prečnika 4 mm i dubine 3 mm. U povrede je nanošen fragment micelije prečnika 3 mm uzet sa ivice kulture starosti sedam dana gajene na PDA podlozi. Kao negativna kontrola korišćeni su plodovi u koje

je nanošen fragment sterilne PDA podloge. Za svaki izolat, za svakog domaćina, test je obavljen na ukupno 15 plodova (u tri ponavljanja sa po pet plodova). Inokulisani plodovi inkubirani su u vlažnoj komori na temperaturi od 24°C i relativnoj vlažnosti vazduha od 97%. Veličina truleži merena je nakon jedan, dva i tri dana inkubacije, a brzina širenja truleži je izračunavana na osnovu razlike u veličini lezije merene između dva dana (mm po danu). Dobijeni rezultati statistički su obrađeni.

#### 4.11. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija

##### 4.11.1. Molekularna detekcija i identifikacija

Molekularna detekcija i identifikacija ispitivanih izolata *Monilinia* spp. obavljena je primenom metode lančane reakcije polimeraze (polimerase chain reaction, PCR) po protokolu koji su opisali **White et al.** (1990) i **Côté et al.** (2004) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Pregled prajmera primenjenih za detekciju i identifikaciju *Monilinia* spp.

Ciljana sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca 5'-3'	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
ITS rDNK	<b>MO368-5</b>	GCA AGG TGT CAA AAC TTC CA	351-535 bp	Côté et al., 2004
	<b>MO368-8R</b>	AGA TCA AAC ATC GTC CAT CT		
	<b>MO368-10R</b>	AAG ATT GTC ACC ATG GTT GA		
	<b>Laxa-R2</b>	TGC ACA TCA TAT CCC TCG AC		
ITS rDNK	<b>ITS1</b>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	500-600 bp	White et al., 1990
	<b>ITS4</b>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		

##### 4.11.2. Priprema izolata

Za potrebe molekularne detekcije i identifikacije svi izolati su zasejavani na PDA podlogu i inkubirani u mraku na temperaturi od 24°C. Nakon inkubacije u trajanju od sedam dana iz razvijene kolonije gljive sakupljena je vazдушna micelija sterilnim skalpelom koja je korišćena za ekstrakciju ukupnih DNK. Sakupljanje micelije urađeno je pažljivo kako bi se izbeglo unošenje fragmenata podloge u materijal za ekstrakciju.



#### 4.11.3. Izolacija DNK

Izolacija ukupne količine dezoksiribonukleinskih kiselina (DNK) obavljena je po metodi koju su opisali **Harrington and Wingfield** (1995), korišćenjem komercijalnog preparata PrepmanX (Applied Biosystems, SAD), po uputstvima proizvođača. Uzorak micelije odgajene na PDA podlozi uronjen je u 50  $\mu$ l PrepmanX-a i inkubiran 30 min na temperaturi od 56°C, a potom 10 min na temperaturi od 100°C. Uspeh izolacije DNK i pogodnost za PCR reakciju proverena je amplifikacijom fragmenta veličine oko 600 bp univerzalnim prajmerima ITS1 i ITS4 (**White et al.**, 1990). Sastav reakcione smeše i uslovi PCR reakcije navedeni su kasnije u tekstu.

#### 4.11.4. Molekularna detekcija primenom Multiplex PCR reakcije

Identitet izolata utvrđen na osnovu patogenih, morfoloških, odgajivačkih i ekoloških karakteristika, potvrđen je specifičnom molekularnom detekcijom, primenom reakcije lančanog umnožavanja specifičnog fragmenta DNK uz korišćenje prajmera: MO368-5, MO368-8R, MO368-10R i Laxa-R2, po protokolu **Côté et al.** (2004). Reakciona smeša, finalne zapremine 25  $\mu$ l, pripremljena je od: 12,5  $\mu$ l 2 x PCR Master mix (Fermentas, Lithuania), 7,5  $\mu$ l RNase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf), po 1  $\mu$ l svakog prajmera (100 pmol/ $\mu$ l) i 1  $\mu$ l ekstrahovane DNK uzorka. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša u koju je umesto DNK uzorka dodata RNase-free voda.

PCR reakcije izvedene su u Eppendorf Master Cycler-u (Eppendorf, Germany) pri sledećim uslovima:

- 1 ciklus        -inicijalna denaturacija DNK (95°C - 2 min)
- 35 ciklusa    -denaturacija DNK (95°C - 15 s)  
                  -vezivanje prajmera (60°C - 15 s)  
                  -sinteza fragmenta DNK - elongacija (72°C - 1 min)
- 1 ciklus        -finalna inkubacija (72°C - 3 min)

#### 4.11.5. Molekularna detekcija na osnovu amplifikacije ITS regiona

Za molekularnu detekciju i identifikaciju odabrano je 18 izolata (11 izolata *M. laxa*: BPČO, BPZK, KPGG, KPGO, NPSP, NPVI, ŠPIV, TPLČ, TPRŠ, VPJR i VPSV; četiri izolata *M. fructigena*: BŠPBA, ŠPBA, ŠPPR i TPGO; tri izolata *M. fructicola*: NPGM, NPUD1 i NPUD2), dobijenih sa različitih lokaliteta, biljaka domaćina i biljnih delova, kojima je potvrđena patogenost i koji su prethodno okarakterisani na morfološkom nivou (Tabela 1). Korišćen je jedan par univerzalnih prajmera (ITS1/ITS4) koji omogućava umnožavanje pet genskih segmenata DNK iz ITS (Internal transcribed spacer) regiona rDNK (deo 18S rRNK, ITS1, 5.8S rRNK, ITS2 i deo 28S rRNK). PCR reakcije obavljene su po protokolu koji su opisali **White et al.** (1990) u radnoj zapremini od 25 µl, korišćenjem 12,5 µl 2 x PCR Master mix-a (Fermentas, Lithuania), 9,5 µl RNase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf), po 1 µl svakog prajmera i 1 µl izolovane ukupne DNK. U svim reakcijama kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK u koju je umesto DNK uzorka dodavana RNase-free voda. PCR reakcija izvedena je u Eppendorf Master Cycler-u (Eppendorf, Germany) pri sledećim uslovima reakcije:

- |            |   |
|------------|---|
| 1 ciklus   | -denaturacija DNK (94°C - 1 min 30 s)             |
| 29 ciklusa | -denaturacija DNK (94°C - 30 s)                   |
|            | -vezivanje prajmera (55°C - 30 s)                 |
|            | -sinteza fragmenta DNK - elongacija (72°C - 30 s) |
| 1 ciklus   | -elongacija (72°C - 9 min)                        |

#### 4.11.6. Vizualizacija i analiza produkata PCR reakcije

Vizuelizacija amplifikovanih produkata PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem u agaroznom gelu u 1 x TBE puferu (90 mM Tris, 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1mM EDTA) pri naponu od 100V, bojenjem u 0,1% rastvoru etidijum bromida i posmatranjem pod UV svetlom. Za vizualizaciju produkata dobijenih u Multiplex PCR reakciji pripreman je 1,5% agarozni gel, a za produkte dobijene primenom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 1% agarozni gel, dobijen rastvaranjem odgovarajuće količine agaroze u 1 x TBE puferu i zagrevanjem do temperature

ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja do temperature od približno 60°C, gel je razliven u kalup aparata za horizontalnu elektroforezu (BluePower 500, Serva) u koji su prethodno postavljeni separatori i češljevi, nakon čega je ostavljen na sobnoj temperaturi 30 min da se ohladi i polimerizuje. Posle polimerizacije gela i uklanjanja češljeva, kalup je uranjan u kadicu za horizontalnu elektroforezu sa 1 x TBE puferom. Uzorci za elektroforezu pripremljeni su mešanjem 5 µl produkta PCR reakcije i 1 µl boje 6x Loading dye (Fermentas, Lithuania) i naliveni u bunarčiće po odgovarajućem rasporedu. Pri elektroforezi korišćen je 100 bp DNK marker (Fermentas, Lithuania) radi određivanja veličine produkta poređenjem sa poznatom veličinom DNK fragmenata markera. Posle završene elektroforeze gel je bojen u rastvoru etidijum bromida u trajanju od 10 min. Amplifikovani fragmenti posmatrani su u mračnoj komori pomoću UV svetla na transiluminatoru (Vilber Lourmat, France).

Pojava DNK fragmenata dobijenih u Multiplex PCR reakciji veličine oko 535 bp predstavlja pozitivnu reakciju za detektovanje *M. fructicola*, 425 bp za *M. polystroma*, 402 bp za *M. fructigena* i 351 bp za *M. laxa*. Sa druge strane, prisustvo amplikona dobijenih PCR reakcijom primenom ITS1/ITS4 prajmera dužine oko 500-600 bp označeno je kao pozitivna reakcija.

#### 4.11.7. Prečišćavanje PCR produkta i sekvencioniranje

Nakon uspešne amplifikacije korišćenjem ITS1/ITS4 para prajmera, za sekvencioniranje je odabrano 18 izolata vrsta roda *Monilinia* (Tabela 1). PCR produkti su pre sekvencioniranja prvo prečišćeni pomoću mi-PCR Purification Kit (Metabion International, Germany), po uputstvu proizvođača. U tubice sa PCR produktima dodat je DNA Binding Buffer (pufer za vezivanje) i to u zapremini pet puta većoj od količine PCR smeše i sve je dobro promešano. Smeša je zatim prenetu u kolone i centrifugirana 1 min pri brzini od 12000 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja filtrat je odbačen, u kolone je dodato 750 µl Column Wash Buffer-a i centrifugirano 1 min pri brzini od 12000 rpm na sobnoj temperaturi. Zatim je u kolone dodato još 250 µl istog pufera, centrifugirano pri istim uslovima i na kraju je filtrat odbačen. Kolona je prebačena u novu tubicu u koju je potom dodato 50 µl destilovane vode. Nakon

centrifugiranja u trajanju od 1 min pri brzini od 12000 rpm, u tubici ostaje filtrat sa DNK.

Prečišćeni ampliconi poslani su na uslužno sekvencioniranje u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer u Macrogen Inc. (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., nakon čega su dobijene konsenzus nukleotidne sekvence podnete u GenBank bazu podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) i dodeljen im je pristupni broj (GenBank Accession Number).

#### 4.11.8. Molekularna identifikacija i karakterizacija

Molekularna identifikacija 18 odabranih izolata *Monilinia* spp. (BPČO, BPZK, KPGG, KPGO, NPSP, NPVI, ŠPIV, TPLČ, TPRŠ, VPJR, VPSV, BŠPBA, ŠPBA, ŠPPR, TPGO, NPGM, NPUD1 i NPUD2) (Tabela 1) obavljena je, nakon sekvencioniranja ITS genomnog regiona i njihove obrade, višestrukim uparivanjem sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti pomoću BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analize i softverskog paket MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka (<http://blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pomoću CLUSTAL *W* programa (Thompson et al., 1994), obavljena je potvrda identifikacije dobijenih sekvenci. Za proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen nukleotidne sličnosti, takođe je upotrebljen softverski paket MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

Molekularna karakterizacija ispitivanih izolata obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla čime je pružen uvid u tačno taksonomsko mesto i evolutivnu srodnost vrsta roda *Monilinia*. Za filogenetske analize odabrane su sekvence izolata BPČO, BPZK, KPGG, KPGO, NPSP, NPVI, ŠPIV, TPLČ, TPRŠ, VPJR i VPSV koji su identifikovane kao *M. laxa*, BŠPBA, ŠPBA, ŠPPR i TPGO identifikovane kao *M. fructigena* i NPGM, NPUD1 i NPUD2 identifikovane kao *M. fructicola*. Upoređivanje je vršeno sa 38 sekvenci vrsta roda *Monilinia* dostupnih u GenBank bazi podataka (Tabela 3). Filogenetsko stablo rekonstruisano je korišćenjem Maximum Parsimony metode, integrisane unutar programa MEGA 5 i bootstrap analize u 1000 ponavljanja.

Filogenetsko stablo rutovano je sa dve autgrupe, vrstama *Botryotinia fuckeliana* (GenBank Acc. No. HQ846943) i *Sclerotinia sclerotiorum* (HQ846942) za koji se smatra da su genetički bliske vrstama roda *Monilinia*.

**Tabela 3.** Prikaz sekvenci roda *Monilinia* spp. dostupnih u GenBank bazi podataka korišćenih za filogenetske analize

Vrsta	Naziv izolata	Biljka domaćin	Poreklo izolata	Gen Bank pristupni broj	Literaturni navod
<i>M. laxa</i>	MDA12	Nepoznato	SAD	HQ846948	Zhu et al., 2011
	BUL1A1	Šljiva	Francuska	AF150676	Ioos and Frey, 2000
	Hirodai no. 3272	<i>P. mume</i>	Japan	AB125612	Harada et al., 2004
	Sh675	Šljiva	Čile	EU042149	Tian et al., neobjavljeno
	ES14	Nepoznato	Španj	EF153016	Gell et al., 2007
	CBS298.31	Nepoznato	SAD	HQ846949	Zhu et al., 2011
	1067.k	Jabuka	Norveška	Z73784	Holst-Jensen et al., 1997
	Hirodai no. 2646	<i>P. mume</i>	Japan	AB125618	Harada et al., 2004
<i>M. fructigena</i>	GENA4	Nepoznato	Velika Britanija	HQ846945	Zhu et al., 2011
	3FG	Dunja	Mađarska	AM937109	Petróczy and Palkovics, neobjavljeno
	UASWS0643	Jabuka	Švajcarska	HQ166417	Lefort et al., neobjavljeno
	IHEM	Kruška	Belgija	FJ515296	Fauche and Jacon, neobjavljeno
	40FG	Dunja	Mađarska	AM937113	Petróczy and Palkovics, neobjavljeno
	WASWS0333	Jabuka	Švajcarska	EU098121	Crovadore et al., neobjavljeno
	W17	Nepoznato	Španj	EF207424	Gell et al., 2007
	COY2M	Šljiva	Francuska	AF150680	Ioos and Frey, 2000
	1079.k	Šljiva	Norveška	Z73781	Holst-Jensen et al., 1997
	<i>M. fructicola</i>	99.2.G5.04	Nepoznato	SAD	DQ314730
Ft		Nepoznato	Francuska	HQ846967	Zhu et al., 2011
LH01		Red bayberry	Kina	AM887528	Chen, neobjavljeno
W1		Nepoznato	Španija	EF207420	Gell et al., 2007
Hirodai no. 2636		Trešnja	Japan	AB125615	Harada et al., 2004
M1PL		Nepoznato	Poljska	JX312665	Poniatowska et al., 2013
782.k		Breskva	Norveška	Z73777	Holst-Jensen et al., 1997
M10020029		Breskva	Slovenija	GU967379	Munda and Viršček, 2010
P164		Nepoznato	Italija	FJ411110	Pellegrino et al., 2009
THF-1		Breskva	Kina	FJ515894	Xia and Yu, neobjavljeno
BHY1		Nepoznato	Kina	HQ846927	Zhu et al., 2011
SLT2		Breskva	Kina	HQ846939	Zhu et al., 2011
NE18		Nepoznato	Novi Zeland	HQ846919	Zhu et al., 2011
LVN8		Nepoznato	SAD	HQ846966	Zhu et al., 2011
DAOM231119		Vinova loza	Kanada	AY289185	Sholberg et al., 2003
Nepoznato		Jabuka	Srbija	JN176564	Vasić et al., 2012
<i>M. polystroma</i>		HML3	Šljiva	Kina	GU067539
	2319	Nepozanto	Japan	HQ856916	Zhu et al., 2011
	UFT	Jabuka	Mađarska	AM937114	Petróczy and Palkovics, 2009
	AP1	Jabuka	Poljska	JF820317	Jabukowska et al., neobjavljeno
	MP13	Jabuka	Srbija	JX315717	Vasić et al., 2013

#### 4.11.9. SSR marker analiza izolata *Monilinia fructicola* poreklom iz Srbije

Molekularni markeri koriste se za analiziranje strukture populacije patogena, a među njima su najpopularniji mikrosatelitni ili SSR (simple sequence repeat) markeri. Analiza mikrosatelita ukazuje na genetički diverzitet unutar populacije i može pružiti

informacije o međuodnosu pojedinih haplotipova pružajući osnovu ispitivanju filogeografije neke vrste.

U saradnji sa dr Andrea Patocchi i dr Maya Jänsch sa Agroscope Changins-Wädenswil Research Station, Wädenswil, Švajcarska, određeni su SSR (simple sequence repeat) markeri za tri izolata *M. fructicola* poreklom iz Srbije. **Jansch et al.** (2012) razvili su SSR markere sa ciljem utvrđivanja preciznog porekla i genetičkog diverziteta vrste *M. fructicola* u Evropi. Pomoću protokola **Brunner and Frey** (2004) SSR markeri razvijeni su na osnovu ponavljanja AG, AT, CTT i TCG nukleotida, a kao polazne sekvence korišćene su raspoložive sekvence *M. laxa* i *M. fructicola*. Prajmeri su dizajnirani pomoću programa PRIMER3. Upotrebom Multiplex PCR kit-a (QIAGEN) u samo jednoj reakciji umnoženo je pet različitih SSR markera. PCR smeša finalne zapremine od 10 µl sadržala je 2 µl DNK, 5 µl Multiplex PCR Master Mix-a, 1 µl Q-Solution, 1 µl sterilne vode i 1 µl prajmer mix-a (finalne koncentracije CHML5f/r 1,875 µM, CHMFC1f/r 5 µM, CHMFC4f/r 1,25 µM, CHMFC5f/r 1,875 µM i CHMFC12f/r 3,75 µM). PCR reakcija izvedena je u Termocycler-u (SensoQuest) pri sledećim uslovima:

- |            |   |
|------------|---|
| 1 ciklus   | -inicijalna denaturacija DNK (95°C - 15 min)            |
| 35 ciklusa | -denaturacija DNK (94°C - 40 s)                         |
|            | -vezivanje prajmera (50°C - 1 min 30 s)                 |
|            | -sinteza fragmenta DNK - elongacija (72°C - 1 min 30 s) |
| 1 ciklus   | -finalna inkubacija (60°C - 30 min)                     |

Analiza dobijenih fragmenata obavljena je u ABI PRISM<sup>®</sup>3100 DNK kapilarnom sekvencionatoru (Applied Biosystems). Ukupna zapremina od 0,8 µl rastvorenog u odnosu 1:20 PCR produkta premeštena je u 15 µl formamida koji sadrži 0,25 µl florescentnog GeneScan<sup>™</sup>-500-LIZ<sup>™</sup> standarda veličine (Applied Biosystems). Ovako pripremljen uzorak je denaturisan na 95°C tokom 5 min, potom brzo rashlađen i sekvencioniran. Za analizu podataka korišćen je GeneMapper<sup>™</sup> v. 4.0 (Applied Biosystems).

Korišćeni prajmeri umnožavaju alelne oblike različitih dužina izolata *M. fructicola* poreklom iz Evrope (**Jansch et al.**, 2012): CHML5 umnožava jedan alelni oblik dužine 220 bp, marker CHMFC1 tri alelna oblika dužine 169, 173 i 176 bp, CHMFC4 dva alelna oblika od 216 i 223 bp, CHMFC 5 jedan alelni oblik od 160 bp.

Kao marker koji detektuje najviše alalnih oblika izdvoji se CHMFc1 (sa identifikovanih 30 alelnih oblika različite dužine), dok je marker sa najmanje detektovanih alelnih oblika CHMf12 (sa jednim alelnim oblikom dužine 160 bp). Prajmeri CHML5, CHMFc4 i CHMFc 5 detektuju pet, četiri i pet različita alelna oblika.

#### 4.12. Utvrđivanje nivoa osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na fungicide

Ispitivanja osetljivosti vrsta roda *Monilinia* na fungicide obuhvatila su proučavanje delovanja komercijalnih formulacija fungicida iz sedam hemijskih grupa različitih mehanizama delovanja (Tabela 4).

**Tabela 4.** Pregled fungicida korišćenih u ispitivanjima

Preparat	Proizvođač	Aktivna supstanca	Hemijska grupa	Sadržaj aktivne supstance
Bravo 720 SC	Syngenta	Hlorotalonil	Hloronitrili	720 g/l
Kidan EC	Bayer CropScience	Iprodion	Ditiokarbamati	255 g/kg
Spartak 450-EC	Sinochem Ningbo	Prohloraz	Imidazoli	500 g/kg
Quadris	Syngenta	Azoksistrobin	Strobilurini	250 g/kg
Akord	Galenika Fitofarmacija	Tebukonazol	Triazoli	250 g/kg
Cantus	BASF	Boskalid	Karboksamidi	500 g/kg
Luna Privilege	Bayer CropScience	Fluopiram	Piridiletamid	500 g/l

Parametri osetljivosti 12 odabranih pojedinačnih monosporijalnih izolata (10 izolata vrste *M. laxa*: TPBN, TPAL, TPGR, VGRSD, NPGF, VPRA, ŠMLE, ŠLJSV, ŠMLEs, BPSV i BPBN; jedan izolat *M. fructigena*: VPBG i jedan izolat *M. fructicola*: NPGM) (Tabela 1) na fungicide ocenjeni su po delimično modifikovanoj metodi **Leroux and Gredt** (1972). Micelija izolata starosti sedam dana zasejavana je na PDA podlogu koja sadrži različite koncentracije fungicida i inkubirana na temperaturi od 24°C. Preliminarnim ispitivanjem određene su koncentracije fungicida kojima se postiže inhibicija porasta izolata između 5% i 95% u odnosu na kontrolu. Za određivanje parametara osetljivosti korišćena je skala koncentracija sa simetrično raspoređenim koncentracijama u utvrđenom opsegu, kako bi se dobila što pouzdanija

vrednost parametra  $EC_{50}$  (Robertson et al., 1984). Za ispitivanje osetljivosti korišćene su sledeće skale koncentracija:

- za tebukonazol 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,05; 0,03; 0,025; 0,0125 i 0,006 mg/l,
- za iprodion: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,6; 0,5; 0,3; 0,25; 0,125; 0,06 i 0,03 mg/l,
- za hlorotalonil: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 i 0,06 mg/l,
- za boskalid: 2000; 1500; 1000; 750; 500; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 i 0,006 mg/l,
- za fluopiram: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 i 0,06 mg/l,
- za prochloraz: 0,05; 0,025; 0,0125; 0,006 i 0,003 mg/l i
- za azoksistrobin: 100; 25; 10; 5; 1; 0,1; 0,01; 0,001 mg/l.

Fungicidi su prvo u aseptičkim uslovima dispergovani u sterilnoj destilovanoj vodi a zatim su, uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici, aseptično dodavani u rastopljenu hranljivu podlogu prethodno ohlađenu do 55°C da bi se sprečila termička deaktivacija aktivne supstance. Za ispitivanje osetljivosti na fungicide korišćena je PDA podloga. Odnos mešanja disperzije fungicida i podloge bio je 1:9. U hranljivu podlogu u kontroli dodavana je ista količina sterilne destilovane vode. Nakon homogenizacije, podloga je u sterilnim uslovima razlivena u Petri kutije prečnika 90 mm, a posle hlađenja podloge vršeno je zasejavanje odabranih izolata vrsta roda *Monilinia* i inkubacija u mraku na temperaturi od 24°C. Za zasejavanje su korišćeni fragmenti micelije prečnika 3 mm, uzeti sa sedam dana stare ivice kolonije, odgajane u mraku na PDA podlozi na temperaturi od 24°C. Svi testovi izvedeni su u tri ponavljanja. Nakon inkubacije od četiri dana meren je prečnik kolonije u dva pravca pod pravim uglom. Za probit analizu uzimani su odgovori na najmanje četiri koncentracije, preračunati na procenat inhibicije u odnosu na kontrolu. Izračunate su koncentracije koje inhibiraju porast micelije 50% u odnosu na kontrolu (vrednost  $EC_{50}$ ) i nagib regresione linije (b) (Finney, 1964).

#### **4.12.1. Ispitivanje osetljivosti izolata na azoksistrobin u prisustvu salicilhidroksamične kiseline (SHAM)**

Ispitivanje osetljivosti izolata roda *Monilinia* na azoksistrobin, fungicid iz grupe strobilurina, izvršeno je metodom koja je detaljno opisana u prethodnom poglavlju. Preliminarnim testiranjima korišćenjem široke skale koncentracija azoksistrobina (1000;



100, 10; 1; 0,10; 0,01; i 0,001 mg/l) utvrđeno je da ni jedna koncentracija nije dovela do inhibicije porasta micelije u poređenju sa kontrolom u koju je dodata sterilna destilovana voda.

Radi eliminisanja efekta lažne rezistentnosti na strobilurine ispitivanja su nastavljena prethodno opisanom metodom uz dodatak salicilhidroksamične kiseline (SHAM), inhibitora terminalnih oksidaza (**Ziogas et al.**, 1997). Za svaki ispitivani izolat izvršena je prethodna provera toksičnosti SHAM-a, kako bi se utvrdilo pri kojoj koncentraciji ova supstanca ne utiče na porast izolata tako što su različite koncentracije SHAM-a od 1000; 100, 10; 1; 0,10; 0,01; i 0,001 mg/l inkorporirane u PDA podlogu pri čemu je odnos SHAM-a i podloge bio 1:9. Kao kontrola korišćena je PDA podloga u koju je dodavana sterilna destilovana voda. Podloga je zatim razlivena u Petri kutije, a nakon hlađenja izvršeno je zasejavanje ispitivanim izolatima. Najviše koncentracije SHAM-a pri kojima ne dolazi do inhibicije porasta micelije izolata uzete su kao radne koncentracije za mešanje sa fungicidom za svaki izolat. Zatim je smeša SHAM-a i fungicida dodata u PDA podlogu u odnosu 1:9. U kontrolu je u smeši sa SHAM-om umesto fungicida dodata sterilna destilovana voda. Zasejavanje podloga i očitavanje efekata obavljeno je kao i za ostale fungicide.

#### **4.13. Određivanje minimalne fungistatične i minimalne letalne koncentracije fungicida na izolate *Monilinia* spp.**

Određivanje minimalne fungistatične koncentracije (MFC), najniže koncentracije koja potpuno inhibira porast izolata, i minimalne letalne koncentracije (MLC), najniže koncentracije koja ispoljava letalni efekat na izolate, izvedeno je po delimično modifikovanoj metodi **Ishii** (1995). Za ova ispitivanja odabran je po jedan izolat *M. laxa* (TPGR), *M. fructigena* (ŠPPR) i *M. fructicola* (NPGM). Postupak inkorporacije različitih koncentracija fungicida u PDA podlogu i zasejavanja izolata detaljno je opisano u okviru prethodne metode. Zasejane podloge u koju su dodati fungicidi inkubirane su sedam dana u mraku na temperaturi od 24°C, nakon čega je utvrđivan efekat potpune inhibicije porasta i određivana minimalna fungistatična koncentracija fungicida. Inokulum svih izolata za koje nakon inkubacije od sedam dana na podlozi u koju je dodata određena koncentracija fungicida nije zabeležen inicijalni

porast, prebačen je na PDA podlogu bez fungicida i inkubiran dodatnih sedam dana kako bi se utvrdilo da li je data koncentracija fungicida osim fungistatičnog ispoljila i letalni efekat na proučavane izolate. Najniža koncentracija fungicida posle koje nije zabeležen inicijalni porast izolata na podlozi bez fungicida označena je kao minimalna letalna koncentracija (MLC).

#### **4.14. Utvrđivanje antifungalnog uticaja etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp.**

##### **4.14.1. *In vitro* efekat gasovite faze etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp.**

Antifungalna aktivnost 56 etarskih ulja različitog porekla proučavana je na PDA podlozi u staklenim Petri kutijama prečnika 90 mm. Za ova proučavanja odabran je po jedan izolat *M. laxa* (TPGR), *M. fructigena* (ŠPPR) i *M. fructicola* (NPGM). Podloge su zasejavane ispitivanim izolatima postavljanjem četiri isečka micelije (R=3 mm) starosti sedam dana u Petri kutije. Svi izolati su izlagani dejstvu para etarskih ulja dodatih u koncentracijama: 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 i 0,65  $\mu\text{l/ml}$  vazduha na unutrašnju stranu poklopca Petri kutije na koji je, zatim, postavljan njen donji deo sa zasejanom podlogom. Kutije su pojedinačno umotavane u samolepljivu foliju i postavljane u položaj poklopcem na dole kako bi se sprečio gubitak pare. Izlaganje dejstvu para proučavanih ulja trajalo je sedam dana, na temperaturi 24°C. Kao kontrola korišćene su kulture testiranih izolata gajene u identičnim uslovima, ali bez dodavanja etarskih ulja.

Inhibicija porasta testiranih izolata ocenjivana je sedam dana nakon tretmana. Efekat koncentracija ulja koje su potpuno zaustavile porast izolata nakon izlaganja dejstvu para ulja u trajanju od sedam dana na temperaturi 24°C, označen je kao fungistatičan, a najniža koncentracija kao minimalna fungistatična koncentracija (MFC).

Nakon sedam dana, Petri kutije u kojima je porast izolata bio potpuno zaustavljen, otvarane su i provetravane pri struji vazduha u laminarnoj komori u trajanju od 30 min radi uklanjanja gasovite faza ulja i određivanja fungicidnog (letalnog) efekta. Smatrano je da određena koncentracija ulja ispoljava letalan efekat ako sedam dana posle provetranja nije zabeležen inicijalni porast izolata, a minimalna koncentracija koja je ispoljila letalan efekat označena je kao minimalna letalna koncentracija (MLC). Ogled je izveden dva puta sa četiri ponavljanja po tretmanu.

#### 4.14.2. Određivanje minimalnog perioda ekspozicije

Za etarska ulja za koja su utvrđene najniže vrednosti minimalne fungistatične i minimalne letalne koncentracije određivan je i minimalni period ekspozicije za datu koncentraciju ulja kojim se postiže letalan efekat. Po jedan izolat *M. laxa* (TPGR), *M. fructigena* (ŠPPR) i *M. fructicola* (NPGM) izlagan je parama etarskih ulja tokom perioda od jedan do sedam dana na prethodno opisan način. Najkraći period ekspozicije pri određenoj koncentraciji ulja na kojoj je zabeležen letalni efekat utvrđen je kao minimalni period ekspozicije.

#### 4.14.3. Proces formulacije etarskih ulja origana i timijana

Formulacije etarskih ulja origana i timijana pripremljene su mešanjem nosioca uljane faze (esterifikovano ulje repice) (80%), etarskog ulja timijana ili origana (10%) i smešom nejonskih emulgatora (10%). Homogenizacija je izvršena uz pomoć magnetne mešalice (IKA, RH basic 2) tokom perioda od 30 min i dobijene su formulacije tipa koncentrat za emulziju (EC).

#### 4.14.4. *In vitro* efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate *Monilinia* spp.

Ispitivanje *in vitro* efekta formulisanih etarskih ulja na izolate TPGR (*M. laxa*), ŠPPR (*M. fructigena*) i NPGM (*M. fructicola*) izvedeno je na PDA podlozi. Formulirana etarska ulja origana i timijana dodavana su u bunarčić prečnika 10 mm u podlozi i praćena je inhibicija porasta micelije patogena u odnosu na kontrolu. Kao standardne supstance za poređenje korišćene su komercijalno dostupne formulacije etarskog ulja čajnog drveta (Timorex Gold, 1% emulzija) i fungicida iprodiona u koncentraciji primene, dok je kao negativna kontrola poslužila sterilna destilovana voda. Eksperiment je ponovljen dva puta. Dobijeni rezultati su statistički obrađeni.

#### **4.14.5. *In vivo* efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate *Monilinia* spp.**

Ispitivanje *in vivo* efekta formulisanih etarskih ulja urađeno je u kontrolisanim uslovima laboratorije na zrelih plodovima jabuke koji su prethodno površinski dezinfikovani u rastvoru NaClO, isprani destilovanom vodom i prosušeni na vazduhu u aseptičnim uslovima. Korišćeni su plodovi jabuke jer su dostupni tokom cele godine. Plodovi su povređeni pomoću konusnog bušača prečnika 4 mm i dubine 3 mm. U povredu je nanošeno 10 µl formulisanog ulja i izvršena inokulacija micelijom gljive prečnika 3 mm koja je uzeta sa ivice kolonije starosti sedam dana gajene na PDA podlozi. Za testove u *in vivo* uslovima korišćeni su isti izolati kao i u *in vitro* testovima. Kao standardne supstance za poređenje korišćene su komercijalno dostupne formulacije etarskog ulja čajnog drveta (Timorex Gold, 1% emulzija) i fungicida iprodiona u koncentraciji primene, dok je kao negativna kontrola poslužila sterilna destilovana voda. Inokulisani plodovi inkubirani su u vlažnoj komori na temperaturi od 24°C i relativnoj vlažnosti vazduha 97% tokom sedam dana. Posmatrana je pojava truleži na plodovima i merena je širina i dužina lezija. Eksperiment je ponovljen najmanje jednom. Dobijeni rezultati su statistički obrađeni.

#### **4.15. Utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp.**

##### **4.15.1. Pripremanje sojeva *Bacillus subtilis***

U ispitivanjima korišćeni su sojevi bakterije *B. subtilis* iz komercijalno dostupnih preparata - Ekstrasol (Bisolbi Inter, Rusija) i Serenade (Intrachem Bio, Italija), kao i soj *B. subtilis* N146 dobijen iz kolekcije Instituta za mikrobiologiju, Nacionalne Akademije Nauka iz Minska, Belorusija. Bakterije su odgajane u 100 ml tečnog Meynell medijuma (30 g melase, 7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O, 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g Na citrat i 1 l destilovane vode) u Erlenmajer posudama na rotacionom šejkeru pri brzini od 240 rpm četiri dana na temperaturi od 28°C.

#### 4.15.2. Pripremanje izolata *Monilinia* spp.

Odabran je po jedan izolat *M. laxa* (TPGR), *M. fructigena* (ŠPPR) i *M. fructicola* (NPGM) čije su spore i micelija korišćene za ispitivanje u *in vitro* i *in vivo* ogledima. Za dobijanje konidija korišćena je MALT podloga. Kolonije su inkubirane na temperaturi od 24°C u trajanju od 7-10 dana sve dok površinu agara u potpunosti nisu pokrile micelija i spore gljive. Nakon inkubacije, u svaku Petri kutiju dodato je 10 ml sterilne destilovane voda i Tween 20 (Sigma) (1 kap), a micelija i spore su odvojeni od podloge sterilnim štapićem. Konačna koncentracija suspenzije konidija od  $1 \times 10^5$  konidija/ml podešena je pomoću hemocitometra.

#### 4.15.3. *In vitro* utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp.

Ogled je izveden u Petri kutijama prečnika 90 mm u koje je razliveno 20 ml PDA podloge. Na razlivenu i očvrslu PDA podlogu po celoj površini je homogeno raspoređena suspenzija spora ispitivanih izolata koncentracije  $10^5$  konidija/ml. U centralnom delu zasejanih podloga izbušeni su bunarčići prečnika 10 mm u koje je dodavano po 100 µl suspenzije tri proučavana soja *B. subtilis* (Ekstrasol, Serenade i N146). Za standardni tretman korišćena je suspenzija iprodiona u preporučenoj koncentraciji primene, a kao negativna kontrola sterilna destilovana voda. Ocena antagonističke aktivnosti bakterija *B. subtilis* vršena je nakon inkubacije od 48 h na temperaturi od 24°C merenjem prečnika inhibitorne zone oko bunarčića u kojoj nije uočen porast micelije (mm) i poređenjem sa prečnikom inhibitorne zone u kontroli i tretmanu u kome je korišćen standardni fungicid. Ogled je izveden u četiri ponavljanja i ponovljen dva puta, a rezultati statistički obrađeni.

#### 4.15.4. *In vivo* utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp.

*In vivo* ogled izveden je na zrelim plodovima jabuke u kontrolisanim uslovima laboratorije. Korišćeni su plodovi jabuke jer su dostupni tokom cele godine. Plodovi

jabuke površinski su dezinfikovani na prethodno opisan način, prosušeni i povređeni sterilnom konusnom iglom (prečnika 4 mm i dubine 3 mm). U povrede je nanošeno 10 µl suspenzije bakterija *B. subtilis*. Kao standardni tretman korišćena je suspenzija iprodiona u preporučenoj koncentraciji primene, a za negativnu kontrolu sterilna destilovana voda. Inokulacija dodavanjem 10 µl suspenzije spora *Monilinia* spp. u povredu izvršena je u dve varijante: neposredno nakon tretmana (I varijanta) i 24 h nakon tretmana (II varijanta). Inokulisani plodovi inkubirani su u vlažnoj komori na temperaturi od 24°C i relativnoj vlažnosti vazduha 97%. Radi procene efekata tretmana posmatrana je pojava simptoma truleži na inokulisanim plodovima sedam dana nakon inokulacije, i merena dužina i širina zahvaćenog tkiva. Ogled je izveden u četiri ponavljanja i ponovljen dva puta, a rezultati su statistički obrađeni.

#### 4.15.5. Razvoj formulacije preparata na bazi *Bacillus subtilis*

Tri različite formulacije preparata na bazi soja N146 *B. subtilis* pripremljene su na sledeći način:

•**Formulacija 1** pripremljena je mešanjem sirove suspenzije *B. subtilis* N146 (90 g) sa glicerolom (5 g) i polietilenglikolom (5 g). Homogenizacija (20 min) izvršena je uz pomoć magnetne mešalice (IKA, RH basic 2) i dobijena je formulacija tipa koncentrat za suspenziju (SC).

•**Formulacija 2** pripremljena je mešanjem sirove suspenzije *B. subtilis* N146 (90 g) sa glicerolom (5 g) i smešom nejonskih emulgatora (5 g). Homogenizacija (30 min) izvršena je uz pomoć magnetne mešalice (IKA, RH basic 2) i dobijena je formulacija tipa koncentrat za suspenziju (SC).

•**Formulacija 3** pripremljena je mešanjem sirove suspenzije *B. subtilis* N146 (45 g) sa uljem od soje (48 g), glicerolom (4,5 g) i smešom nejonskih emulgatora (2,5 g). Homogenizacija (15 min) je izvršena uz pomoć laboratorijske mešalice Ultra turex i dobijena je formulacija tipa suspoemulzija (SE).

Razvijena su tri ađuvanta na bazi biljnih ulja i smeše nejonskih emulgatora: ađuvant na bazi ulja od soje sa 15% emulgatora, ađuvant na bazi esterifikovanog ulja uljane repice sa 10% emulgatora i ađuvant na bazi ulja od suncokreta sa 15%

emulgatora. Ađuvanti su pripremljeni mešanjem uljnih faza i emulgatora korišćenjem magnetne mešalice (IKA, RH basic 2, vreme mešanja 30 min, temperatura 40°C).

Neposredno pre ispitivanja formulacije 1, 2 i 3 mešane su sa sva tri ađuvanta pojedinačno i primenjivane samostalno i u smeši sa svakim od prethodno razvijenih formulacija kako bi se utvrdio uticaj ađuvanata na povećanje efikasnosti i izvršilo međusobno poređenje efekata.

Pre samog razvoja formulacija sve predviđene komponente formulacija (pomoćne materije) pojedinačno su ispitane kako bi se utvrdilo da li ispoljavaju fitotoksične osobine te su one materije koje su bile pozitivne isključene iz daljih ispitivanja. Takođe, u preliminarna istraživanja bile su uključene i slepe probe sa svim komponentama koje su korišćene u navedenim formulacijama izuzev *B. subtilis* N146.

#### **4.15.6. Ispitivanje efekata formulacija *Bacillus subtilis* na *Monilinia* spp. *in vitro***

Ogled je izveden u Petri kutijama prečnika 90 mm u kojima je prethodno razliveno 20 ml PDA podloge. Na razlivenu i očvrslu PDA podlogu po celoj površini je homogeno raspoređena suspenzija spora izolata vrsta roda *Monilinia* koncentracije  $10^5$  konidija/ml pripremljena na prethodno opisan način. U centralnom delu zasejane podloge izbušen je bunarčići prečnika 10 mm u koji je naliveno 100 µl suspenzije formulacija, kao i neformulisane (sirove) suspenzije soja *B. subtilis* N146 pripremljene na prethodno opisan način. Za standardni tretman korišćena je suspenzija iprodiona u preporučenoj koncentraciji primene, a kao negativna kontrola sterilna destilovana voda. Ogled je izveden u četiri ponavljanja i ponovljen dva puta, a rezultati su statistički obrađeni.

#### **4.15.7. Ispitivanje efikasnosti formulisanih preparata na bazi *Bacillus subtilis* u suzbijanju *Monilinia* spp. *in vivo***

Ispitivanje efikasnosti formulisanih preparata izvedeno je na zrelim plodovima jabuke u kontrolisanim uslovima laboratorije. Korišćeni su plodovi jabuke jer su dostupni tokom cele godine. Plodovi jabuke površinski su dezinfikovani, prosušeni i povređeni sterilnom konusnom iglom (prečnika 4 mm i dubine 3 mm). U povrede je

nanošeno 10 µl formulisanih preparata na bazi *B. subtilis* N146. Za standardni tretman korišćena je suspenzija iprodiona u preporučenoj koncentraciji primene, sirova suspenzija *B. subtilis* N146 pripremljena na već opisan način, komercijalno dostupan preparat Serenade (1%), a kao negativna kontrola sterilna destilovana voda. Inokulacija dodavanjem 10 µl suspenzije spora *Monilinia* spp. u povredu izvršena je neposredno nakon tretmana (I varijanta) i 24 h nakon tretmana (II varijanta). Inokulisani plodovi inkubirani su u vlažnoj komori na temperaturi od 24°C i relativnoj vlažnosti vazduha 97%. Radi procene efekata tretmana posmatrana je pojava simptoma truleži na inokulisanim plodovima sedam dana nakon inokulacije i merena dužina i širina zahvaćenog dela. Ogled je izveden u četiri ponavljanja i ponovljen dva puta, a rezultati su statistički obrađeni.

#### 4.16. Statistička obrada podataka

Podaci dobijeni u okviru praćenja brzine rasta, odgajivačkih i ekoloških karakteristika izolata, testova unakrsne patogenosti i ispitivanja efekata etarskih ulja i bakterije *B. subtilis* na izolate *Monilinia* spp. obrađeni su jednofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA), a značajnost razlika srednjih vrednosti je određena *Duncan*-ovim testom ( $P < 0,05$ ) korišćenjem softverskog paketa Statistika (StatSoft Inc, 2001). Dobijeni podaci prikazani su u tabelama u obliku srednjih vrednosti i standardne devijacije.

Podaci dobijeni ispitivanjem osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na fungicide obrađeni su probit analizom na osnovu principa koje je definisao **Finny** (1964). U tabelama su prikazane koncentracije koje inhibiraju porast 50% u odnosu na kontrolu ( $EC_{50}$ ) i nagib regresione linije ( $b$ ). Razlike u osetljivosti izolata određene su na osnovu preklapanja/nepreklapanja intervala poverenja za  $EC_{50}$  vrednosti.



## 5. REZULTATI

### 5.1. Simptomi oboljenja

Simptomi oboljenja koje su prouzrokovale vrste roda *Monilinia* uočeni su na cvetovima, granama, grančicama i plodovima u vidu sušenja cvetova, grančica i grana, i truleži plodova (Slike 1-8) na šest vrsta koštičavih voćaka u Srbiji: breskvi, kajsiji, nektarini, trešnji, višnji i šljivi. Prvi simptomi u vidu uvenuća prašnika, nekroze tučka, kruničnih i čašičnih listića zapaženi su u rano proleće, tokom sve tri godine istraživanja (Slika 1). Zaraženi cvetovi su opadali ili, češće, ostali pričvršćeni na granama.

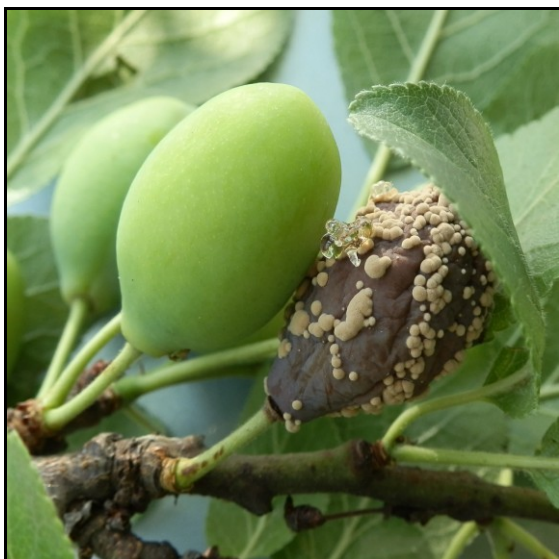
Prvi simptomi na plodovima, u vidu manjih kružnih, mrkih pega nalik oreolu oko mesta infekcije, najčešće su uočavani na mestu rana ili povreda (Slika 2). Razvojem oboljenja pege su se pravilno koncentrično širile, a pri uslovima povišene temperature i vlažnosti, za nekoliko dana mrka trulež potpuno je zahvatala čitave plodove (Slika 6). Mrke pege u početku su bile ravne, ali ubrzo je u okviru pega dolazilo do sporulacije parazita, nastajanja sitnih pukotina na pokožici zaraženog dela ploda iz kojih su izbijale sporodohije u vidu koncentričnih krugova. Mrka trulež potpuno je zahvatala plodove, koji su venuli, sušili se, smežurali i pretvarali u „mumije” koje su ostajale da vise na granama ili opadale na zemlju ispod krošnje (Slika 7).



**Slika 1.** *Monilinia* sp.: Sušenje cvetova višnje (prirodna infekcija)



**Slika 2.** *Monilinia* sp.: Mrka trulež ploda kajsije (prirodna infekcija)



**Slika 3.** *Monilinia* sp.: Mrka trulež pojedinačnog ploda šljive (prirodna infekcija)



**Slika 4.** *Monilinia* sp.: Mrka trulež plodova šljive na dodiru dva ploda (prirodna infekcija)



**Slika 5.** *Monilinia* sp.: Mrka trulež plodova trešnje (prirodna infekcija)



**Slika 6.** *Monilinia* sp.: Mrka trulež ploda kajsije (prirodna infekcija)



**Slika 7.** *Monilinia* sp.: Mumificirani plodovi šljive (prirodna infekcija)

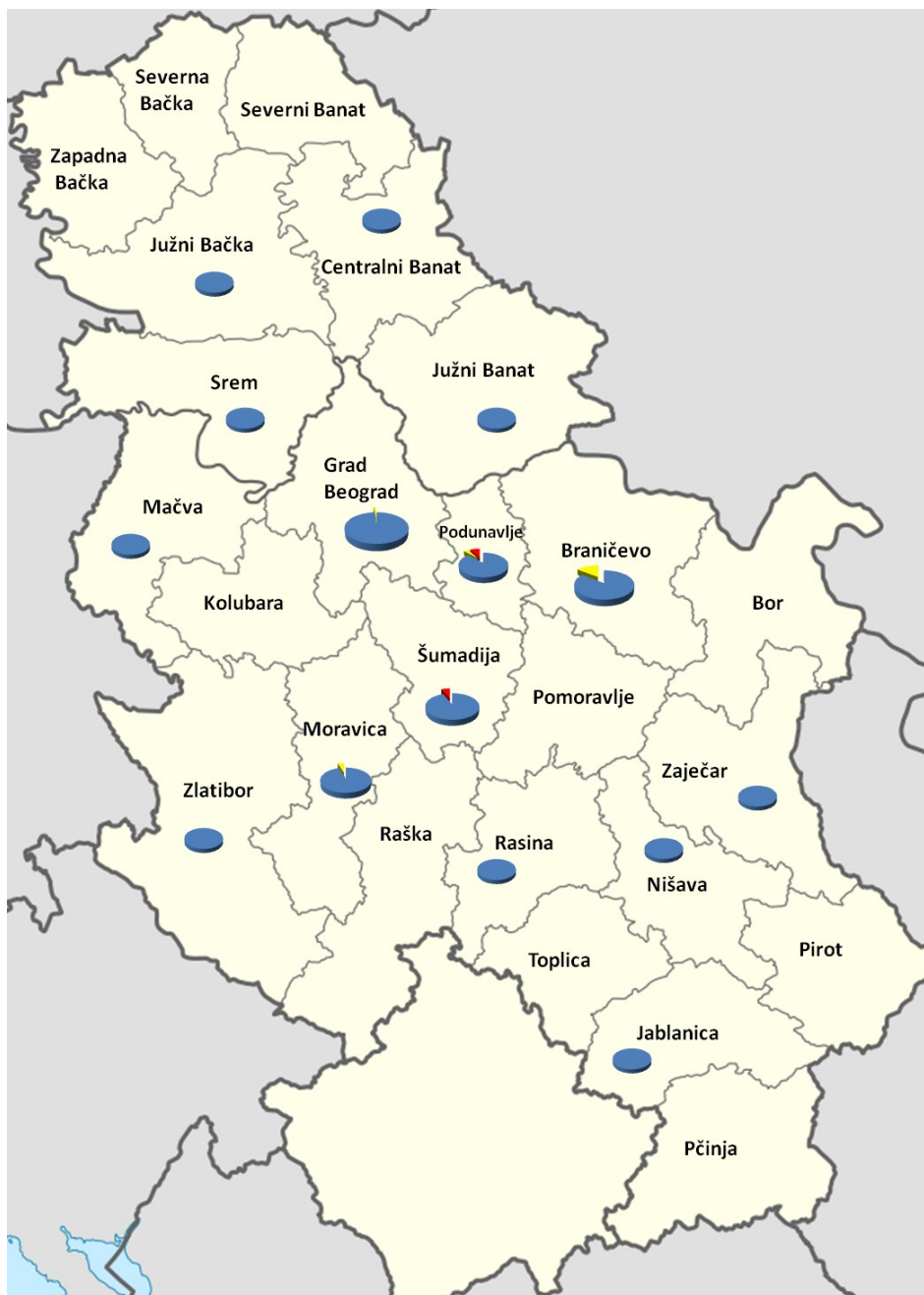
**Slika 8.** *Monilinia* sp.: Uskladišteni truli plodovi šljive (prirodna infekcija)

## 5.2. Izolacija patogena i dobijanje monosporijalnih izolata

Prikupljanje obolelih biljnih delova koštičavih voćaka sa simptomima koje prouzrokuju vrste roda *Monilinia* obavljeno je tokom trogodišnjeg perioda od 2010. do 2012. godine. Pregledom 119 lokaliteta iz 15 okruga u Srbiji, prikupljen je 321 uzorak obolelih biljnih delova kako iz komercijalnih zasada, tako i iz okućnica i sa zelenih pijaca (Slika 9, Tabela 5).

**Tabela 5.** Biljke domaćini sa kojih je izvršena izolacija *Monilinia* spp.

Biljka domaćin	Broj izolata	Broj lokaliteta
Šljiva	80	39
Višnja	31	18
Trešnja	66	30
Kajsija	14	6
Breskva	20	10
Nektarina	35	16
<b>Ukupno</b>	<b>246</b>	<b>119</b>



Slika 9. Geografska distribucija dobijenih izolata *Monilinia* spp.

■ *M. laxa*    ■ *M. fructigena*    ■ *M. fructicola*

Iz zaraženog biljnog tkiva izolacijom fitopatogenih gljiva izdvojen je veliki broj izolata koji su grupisani po izgledu i po poreklu. Dobijeno je ukupno 246 izolata sa micelijom nalik vrstama roda *Monilinia*, i to 192 iz svežih plodova, 45 iz mumificiranih plodova i devet iz grančica. Svi dobijeni izolati *Monilinia* spp. prečišćeni su do monosporijalnih izolata, koji su korišćeni za dalji rad.

### 5.3. Provera patogenosti

Patogenost dobijenih izolata proverena je na dva načina, inokulacijama povređenih i nepovređenih plodova biljaka domaćina sa kojih vode poreklo. Kao negativna kontrola, korišćeni su odgovarajući plodovi inokulisani na isti način, fragmentom sterilne podloge ili sterilnom vodom. Provera patogenosti 246 dobijenih monosporijalnih izolata *Monilinia* spp. primenom veštačkih inokulacija povređenih plodova biljaka domaćina sa kojih su izolovani pokazala je da su svi izolati tri dana nakon inkubacije na temperaturi od 24°C prouzrokovali trulež tkiva svetlo smeđe boje, karakterističnu za *Monilinia* spp. (Slika 10). Od mesta inokulacije trulež se širila zahvatajući kako pokožicu tako i mezokarp ploda. Nekrotirane površine su u završnoj fazi oboljenja prekrivene sivkastom prevlakom konidiofora i konidija parazita. Na plodovima koji su kao negativna kontrola inokulisani sterilnim fragmentom PDA podloge nije došlo do pojave simptoma tipa truleži niti bilo kakvih drugih promena. Sa inokuliranih plodova obavljena je reizolacija patogena i reizolati su upoređeni sa izolatima korišćenim za inokulaciju. Dobijeni reizolati po izgledu kolonije i morfologiji reproduktivnih tvorevina u potpunosti su odgovarali izvornim izolatima čime je potvrđena patogenost izolata i ispunjeni Kohovi postulati.

Veštačka inokulacija nepovređenih plodova svih šest domaćina takođe je dovela do pojave simptoma mrke truleži plodova (Slika 11). Uočena je razlika u intenzitetu sporulacije na plodovima inokuliranim različitim vrstama roda *Monilinia*. Na nepovređenim plodovima inokuliranim izolatima *M. laxa* i *M. fructigena* nije došlo do formiranja spora, dok je intenzitet sporulacije na plodovima inokuliranim vrstom *M. fructicola* bio veoma intenzivan.



**Slika 10.** *Monilinia* spp.: Trulež inokulisanih plodova koštičavih voćaka (desni plod na svakoj slici) i kontrola inokulisana fragmentom sterilne PDA podloge (levi plod na svakoj slici)



Slika 11. Veštačka inokulacija nepovredjenih plodova koštičavih voćaka fragmentom micelije izolata *Monilinia* spp.

#### 5.4. Izolati *Monilinia* spp.

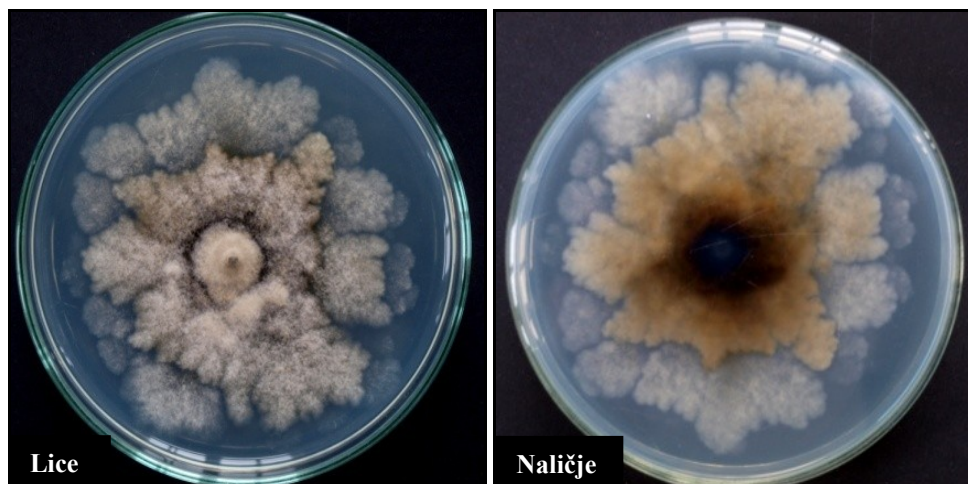
Izolacijom fitopatogenih gljiva iz zaraženih biljaka koštičavih voćaka uočena je jasna razlika u morfološkim karakteristikama izolata. Na osnovu izgleda kolonije, izolati su podeljeni u tri grupe: *Monilinia* spp. grupa I sa ukupno 237 izolata; *Monilinia* spp. grupa II sa šest izolata i *Monilinia* spp. grupa III sa tri izolata. Provera patogenosti, uporedno proučavanje specifičnih morfoloških karakteristika koje je opisao Lane (2002) (boja kolonije, odlike ruba i oblik kolonije, sporulacija, prisustvo koncentričnog prstena, kvalitativna brzina porasta i prisustvo crne marginalne linije) i molekularna detekcija primenom Multiplex PCR reakcije urađeni su na svim prikupljenim izolatima iz sve tri grupe (ukupno 246 izolata).

Za detaljnija proučavanja morfoloških, odgajivačkih, ekoloških i molekularnih karakteristika, kao i ispitivanje osetljivosti na fungicide odabrano je 29 reprezentativnih izolata *Monilinia* spp. iz različitih grupa, vodeći računa o zastupljenosti vrsta roda *Monilinia*, biljaka domaćina i lokaliteta sa kojih su izolati dobijeni (Tabela 1). Za proučavanje efekata etarskih ulja i antagonističkih sojeva bakterije *B. subtilis* na *Monilinia* spp., kao i mogućnosti njihove praktične primene, odabran je po jedan izolat od sve tri dobijene vrste: TPGR (*M. laxa*), ŠPPR (*M. fructigena*) i NPGM (*M. fructicola*).

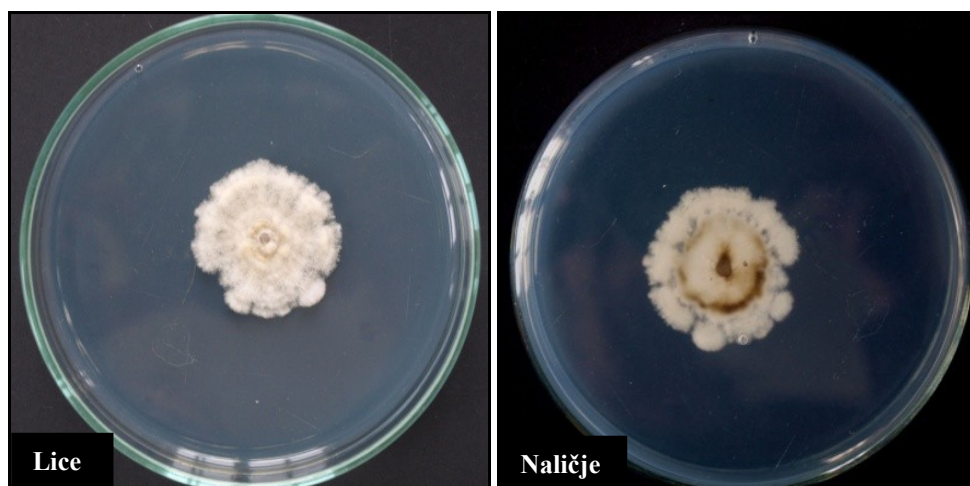
#### 5.5. Morfološke karakteristike izolata *Monilinia* spp.

**Makroskopske karakteristike.** Na osnovu proučenih makroskopskih karakteristika (boje kolonije, odlika ruba i oblik kolonije, sporulacije, prisustva koncentričnog prstena, kvalitativne brzine porasta i prisustva crne marginalne linije) 246 izolata uočeno je njihovo razdvajanje u tri jasno odvojene grupe. Prvu grupu čini 237 izolata koji na PDA podlozi imaju svetlo smeđu do sivu koloniju oblika rozete, režnjevutih ivica, bez prisustva spora. U drugu grupu svrstano je šest izolata krem-žute boje, ravnih ivica, sa prisutnim retkim sporama, dok su u trećoj grupi tri izolata smeđe do sive boje koji obilno sporulišu, formiraju koncentrične prstenove spora i imaju ravnu ivicu kolonije. Prva grupa izolata je na osnovu pomenutih morfoloških osobina preliminarno identifikovana kao vrsta *M. laxa* (Slika 12, Tabela 6), druga kao *M. fructigena* (Slika 13, Tabela 6) i treća kao *M. fructicola* (Slika 14, Tabela 6).

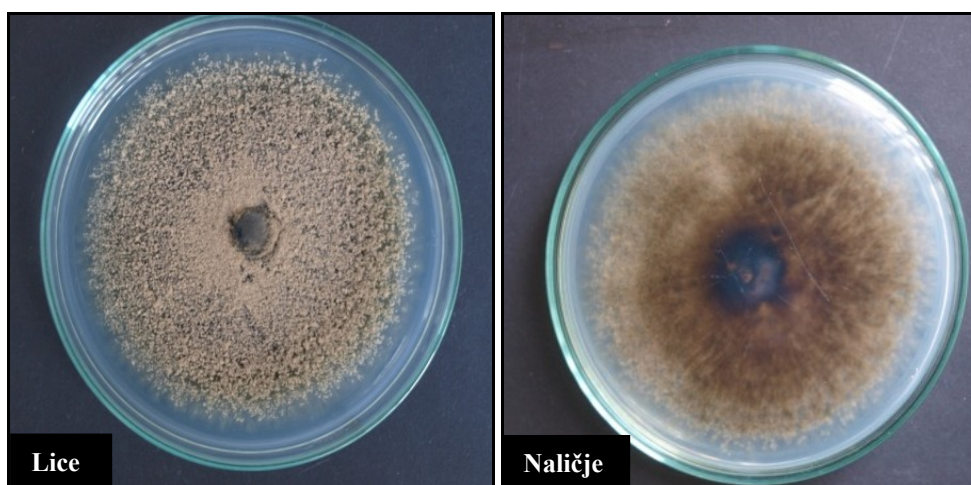




Slika 12. *Monilinia laxa*: Izgled micelije na PDA podlozi nakon inkubacije od sedam dana na 24°C



Slika 13. *Monilinia fructigena*: Izgled micelije na PDA podlozi nakon inkubacije od sedam dana na 24°C



Slika 14. *Monilinia fructicola*: Izgled micelije na PDA podlozi nakon inkubacije od sedam dana na 24°C

**Tabela 6.** Prikaz proučavanih makroskopskih osobina izolata roda *Monilinia*

Vrsta	Boja kolonije	Oblik kolonije <sup>1</sup>	Ivica kolonije <sup>2</sup>	Sporulacija <sup>3</sup>	Prisustvo koncentričnog prstena spora <sup>4</sup>	Prisustvo crne marginalne linije <sup>5</sup>	Brzina porasta <sup>6</sup>
<i>M. laxa</i>	Sivo-smeđa	-	R	-	-	+/-	Srednji
<i>M. fructigena</i>	Bela-žuta	R	C	+	+	+/-	Spor
<i>M. fructicola</i>	Sivo-smeđa	-	C	++	+	-	Brz

<sup>1</sup> Oblik kolonije: R-rozeta, - odsustvo rozete;

<sup>2</sup> Ivica kolonije: R-režnjevita, C- celovita;

<sup>3</sup> Sporulacija: + prisutna, - odsutna;

<sup>4</sup> Prisustvo koncentričnog prstena spora: + prisutan, - odsutan;

<sup>5</sup> Prisustvo crne marginalne linije: + prisutna, - odsutna;

<sup>6</sup> Brzina porasta: spora<70mm, srednja 70-80mm, brza>80mm za 10 dana na temperaturi 22°C.

**Mikroskopske karakteristike.** Proučavanje mikroskopskih svojstava, odnosno utvrđivanje oblika i veličine konidija, intenziteta sporulacije, načina klijanja konidija, kao i dužine kličnih cevčica do prvog grananja ukazalo je na grupisanje svih 13 odabranih izolata *Monilinia* spp. u tri morfološke grupe. Svi odabrani izolati *Monilinia* spp. obrazuju hijalinske, jednoćelijske konidije sedam dana posle zasejavanja. Konidije su limunastog do ovalnog oblika i formiraju razgranate nizove, pri čemu je najmlađa spora ona koja se nalazi u osnovi niza. Izolati vrste *M. laxa* obrazuju konidije čije su dimenzije u opsegu 11,25-15,42  $\mu\text{m}$  x 8,25-11,07  $\mu\text{m}$ , izolati *M. fructicola* 16,00-16,92  $\mu\text{m}$  x 9,87-10,75  $\mu\text{m}$ , dok izolati *M. fructigena* obrazuju u proseku konidije najvećih dimenzija (19,25-23,50  $\mu\text{m}$  x 11,92-13,50  $\mu\text{m}$ ). Uporedni pregled prosečnih dimenzija konidija 13 odabranih izolata uključenih u ispitivanjima mikroskopskih karakteristika prikazan je u Tabeli 7.

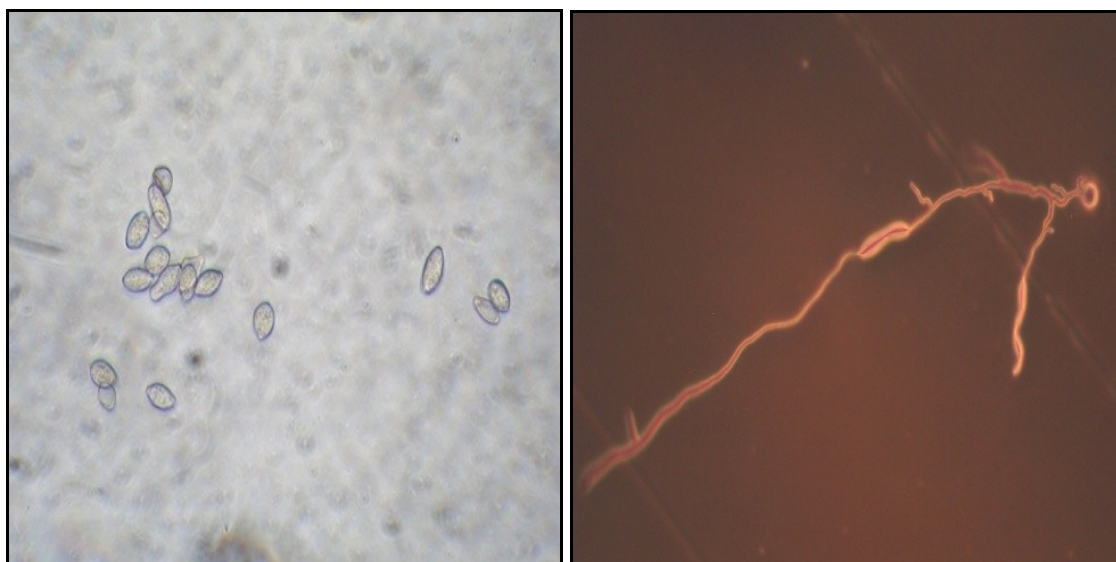
**Tabela 7.** Prikaz prosečnih dimenzija konidija odabranih izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Oznaka izolata	Dužina ( $\mu\text{m}$ )			Širina ( $\mu\text{m}$ )		
		Min	Max	Prosek	Min	Max	Prosek
<i>M. laxa</i>	TPGR	12,50	17,50	<b>14,32</b>	7,50	12,50	<b>9,17</b>
	ŠMLE	7,50	12,50	<b>11,25</b>	5,00	10,00	<b>8,25</b>
	VPRA	10,00	15,00	<b>13,00</b>	7,50	10,00	<b>8,87</b>
	KPST	10,00	15,00	<b>12,00</b>	7,50	12,50	<b>8,62</b>
	BPSV	12,50	17,50	<b>14,12</b>	7,50	12,50	<b>9,87</b>
	NPVL	15,00	25,00	<b>15,42</b>	10,00	15,00	<b>11,07</b>
<i>M. fructigena</i>	ŠPPR	20,00	25,00	<b>23,50</b>	12,50	15,00	<b>13,50</b>
	VPBG	20,00	25,00	<b>22,00</b>	10,00	15,00	<b>13,00</b>
	TPGO	15,00	25,00	<b>19,25</b>	10,00	15,00	<b>11,92</b>
	BŠPBA	17,50	25,00	<b>21,42</b>	10,00	15,00	<b>13,07</b>
<i>M. fructicola</i>	NPGM	12,50	20,00	<b>16,00</b>	7,50	12,50	<b>10,75</b>
	NPUD1	15,00	22,50	<b>16,92</b>	7,50	12,50	<b>10,57</b>
	NPUD2	12,50	20,00	<b>16,25</b>	7,50	12,50	<b>9,87</b>

**Tabela 8.** Prikaz proučavanih mikroskopskih karakteristika izolata *Monilinia* spp.

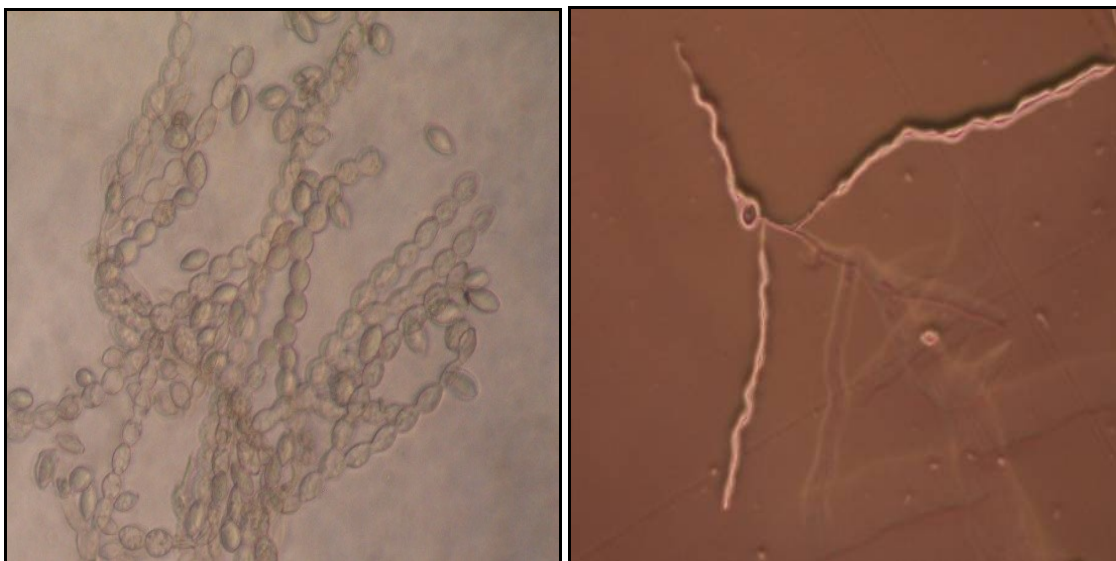
Vrsta	Izolat	Dužina kličine cevčice (µm)		Broj konidija (cm <sup>2</sup> )	Klijavost konidija(%)
		Prosek	Opseg		
<i>M. laxa</i>	NPVL	40	20-70	0,29x10 <sup>4</sup>	88,00
<i>M. fructigena</i>	ŠPPR	197	70-800	1,54x10 <sup>4</sup>	83,34
<i>M. fructicola</i>	NPUD1	365	210-600	0,27x10 <sup>5</sup>	88,66

Izolat NPVL, predstavnik prve morfološke grupe u okviru proučavanih izolata, obrazovao je konidije prosečnih dimenzija 15,42 µm x 11,07 µm koje su klijale na WA podlozi i formirale kličine cevčice prosečne dužine 40 µm (20-70 µm) pre prvog grananja. Broj konidija izmeren pomoću hemocitometra i preračunat po jedinici površine (cm<sup>2</sup>) iznosio je 0,29 x 10<sup>4</sup> (Slika 15, Tabela 8).



**Slika 15.** *Monilinia laxa*: Izgled konidija (levo) i način klijanja konidija (desno) (uvećanje 40x)

Izolat ŠPPR, predstavnik vrste *M. fructigena*, obrazovao je u proseku konidije najvećih dimenzija (23,50 µm x 13,50 µm), iz kojih se, za razliku od konidija drugih grupa izolata, iz jedne konidije formiralo nekoliko kličinih cevčica prosečne dužine 197 µm pre prvog grananja (Slika 16, Tabela 8).



**Slika 16.** *Monilinia fructigena*: Izgled konidija (levo) i način klijanja konidija (desno) (uvećanje 40x)

Predstavnik treće morfološke grupe, izolat NPUD1, formirao je konidije prosečnih dimenzija  $16,92 \mu\text{m} \times 10,57 \mu\text{m}$  koje su klijale u kličine cevčice najveće dužine (prosečno  $365 \mu\text{m}$  pre grananja). Pored toga, ovaj izolat ispoljava najveći intenzitet sporulacije formirajući najveći broj konidija po jedinici površine ( $0,27 \times 10^5$ ) (Slika 17, Tabela 8).

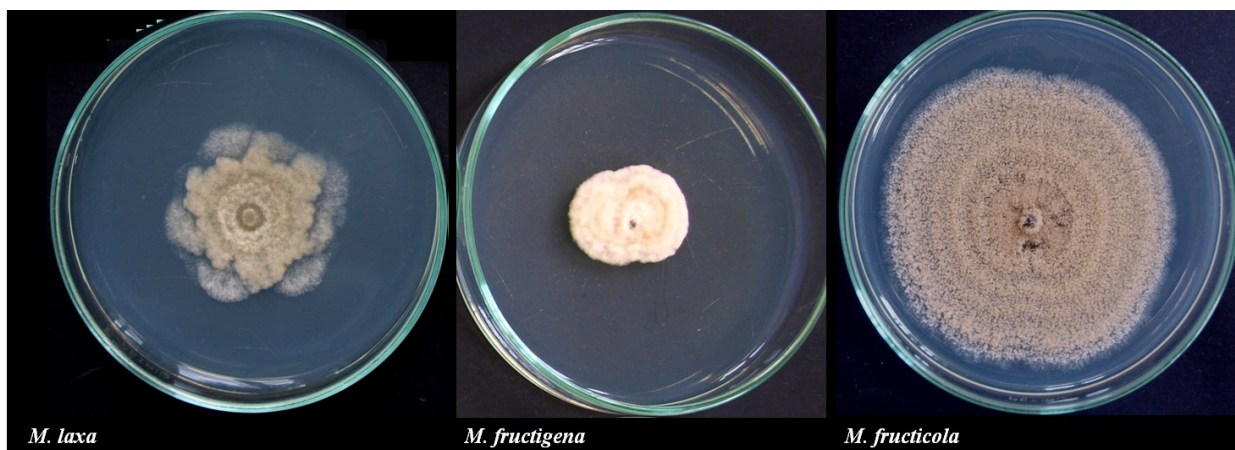


**Slika 17.** *Monilinia fructicola*: Izgled konidija (levo) i način klijanja konidija (desno) (uvećanje 40x)

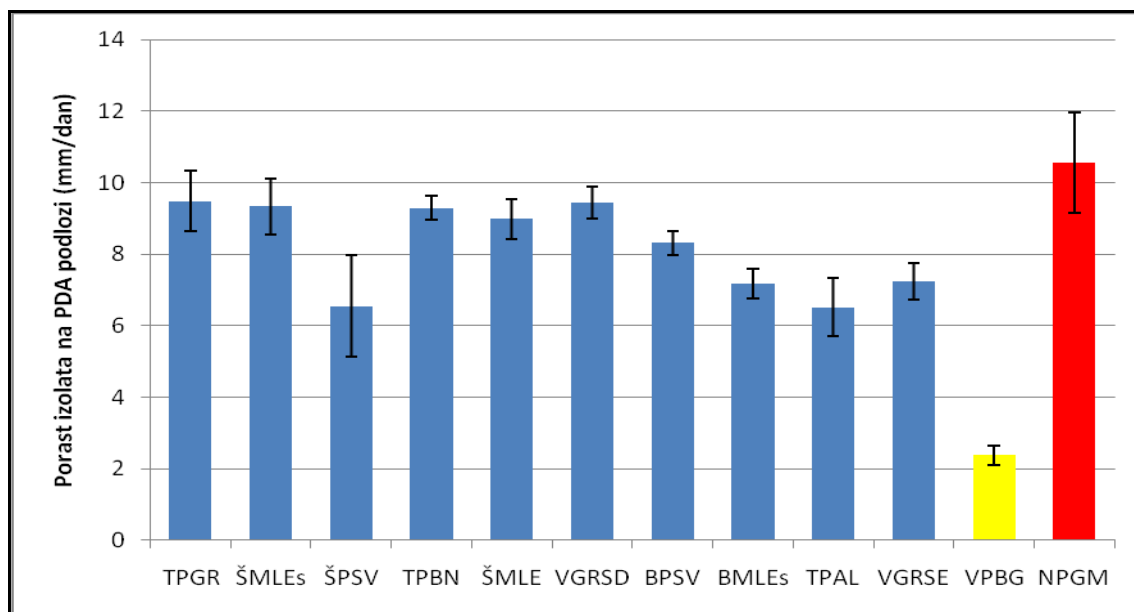
Praćenjem procenta klijavosti na WA podlozi utvrđeno je da konidije ispitivanih izolata klijavaju u sličnom procentu, odnosno nema značajnih razlika između izolata različitih vrsta. Procenat klijavosti konidija bio je od 83,34% za vrstu *M. fructigena* do 88% za *M. laxa* i 88,66% za *M. fructicola* (Tabela 8).

### 5.6. Praćenje brzine porasta izolata *Monilinia* spp.

Na temperaturi od 24°C izolati različitih vrsta ispoljili su statistički značajnu razliku u brzini rasta kolonije ( $P < 0,01$ ) (Slika 18, Grafikon 1, Tabela 9). Izolati vrste *M. laxa* imali su dnevni porast od 6,52 do 9,48 mm/dan. U okviru te grupe najveći dnevni porast od 9,48 mm/dan zabeležen je za izolat TPGR (sa trešnje), dok je izolat TPAL (sa trešnje) rastao najsporije (6,52 mm/dan). Izolat VPBG (sa višnje), predstavnik vrste *M. fructigena* imao je znatno manji prosečan dnevni porast (2,38 mm/dan), dok je izolat *M. fructicola* (NPGM) sa nektarine imao najveći dnevni porast (10,55 mm/dan). Međutim, rezultat *Duncan*-ovog testa pokazuje da izolati osim što se grupišu u zavisnosti od vrste, grupišu se i u okviru pojedinih grupa. Na osnovu ove osobine, ispitivani izolati *Monilinia* spp. ispoljili su izraženu kako interspecijsku tako i intraspecijsku varijabilnost.



**Slika 18.** Prosečna brzina porasta izolata *Monilinia* spp. nakon inkubacije od sedam dana na PDA podlozi na 24°C



**Grafikon 1.** Prosečan dnevni porast micelije izolata *Monilinia* spp. na PDA podlozi

■ *M. laxa*    ■ *M. fructigena*    ■ *M. fructicola*

**Tabela 9.** Prosečan dnevni porast micelije izolata *Monilinia* spp. na PDA podlozi

Vrsta	Izolac	Prosečan dnevni porast (mm/dan) <sup>1</sup>
<i>M. laxa</i>	TPGR	9,48 ± 0,85 b
	ŠMLEs	9,33 ± 0,79 b
	ŠPSV	6,55 ± 1,42 d
	TPBN	9,29 ± 0,34 b
	ŠMLE	8,98 ± 0,57 bc
	VGRSD	9,45 ± 0,45 b
	BPSV	8,31 ± 0,33 c
	BMLEs	7,17 ± 0,42 d
	TPAL	6,52 ± 0,80 d
	VGRSE	7,24 ± 0,51 d
<i>M. fructigena</i>	VPBG	2,38 ± 0,27 e
<i>M. fructicola</i>	NPGM	10,55 ± 1,40 a

<sup>1</sup> Ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

### 5.7. Odgajivačke karakteristike izolata *Monilinia* spp.

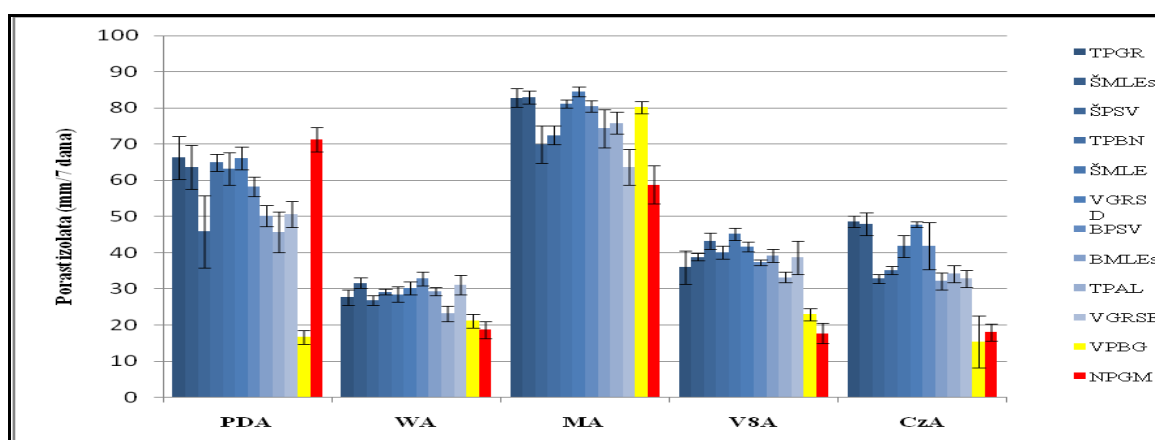
**Uticaj hranljivih podloga.** Porast 12 ispitivanih izolata praćen je na pet različitih hranljivih podloga (PDA, MA, V8A, WA i CzA). Ispitivani izolati rasli su na svim hranljivim podlogama različitom brzinom, pri čemu je generalno najveći porast zabeležen na MA i PDA podlozi, dok je najmanji bio na WA podlozi (Grafikon 2, Tabela 10). Hranljive podloge uticale su statistički značajno na porast ispitivanih izolata

( $P < 0,01$ ). Pored razlika u brzini porasta ispoljene su značajne razlike u morfološkim osobinama izolata na hranljivim podlogama (Slika 19). Na PDA, MA i V8A podlozi svi ispitivani izolati imali su kompaktnu miceliju, dok je na WA i CzA podlozi micelija izolata bila retka i prozirna.

Izolati vrste *M. laxa* najbrže su rasli na MA podlozi, na kojoj je prosečan porast nakon sedam dana bio u intervalu od  $63,67 \pm 4,84$  mm do  $84,50 \pm 1,38$  mm. Izolati ove vrste prosečno najsporije su rasli na WA podlozi ( $23,17 \pm 2,04$  do  $32,83 \pm 1,94$  mm). Obrazovanje konidija zabeleženo je na MA podlozi sedam dana od zasejavanja nezavisno od svetlosnog režima, kao i na PDA podlozi 10 dana od zasejavanja samo u prisustvu svetlosti. Izolati vrste *M. laxa* na PDA i MA podlozi formirali su koloniju karakterističnog oblika rozete, dok na ostalim podlogama ova pojava nije uočena.

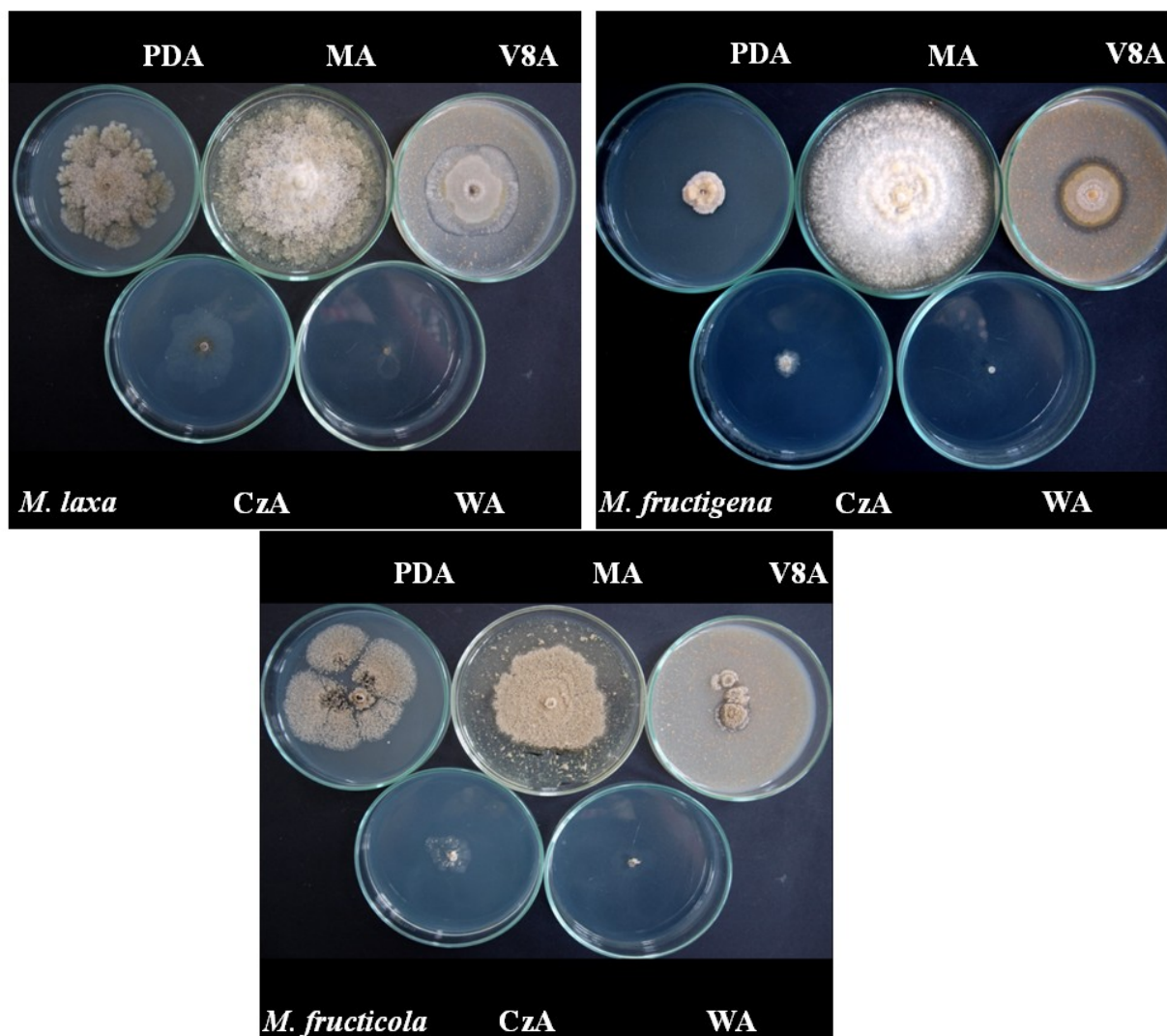
Izolat VPBG, vrsta *M. fructigena*, ispoljio je prosečno najveći porast nakon sedam dana na MA podlozi ( $80,17 \pm 1,72$  mm), a najmanji na CzA podlozi ( $15,33 \pm 7,15$  mm). Izolat VPBG formirao je konidije na PDA i MA podlozi sedam dana od zasejavanja nezavisno od svetlosnog režima. Na PDA i MA podlozi izolat VPBG formirao je koncentrične prstenove spora žute boje koji na ostalim ispitivanim podlogama nisu zabeleženi.

Izolat NPGM, predstavnik vrste *M. fructicola*, imao je prosečno najveći porast na PDA podlozi ( $71,33 \pm 3,39$  mm), a najmanji na V8A podlozi ( $17,67 \pm 2,80$  mm). Ova vrsta, za razliku od prethodnih, formira konidije na svim ispitivanim podlogama tri dana nakon zasejavanja osim na WA. Obilno formiranje konidija u vidu koncentričnih prstenova spora naročito je izraženo na PDA podlozi.



**Grafikon 2.** Uticaj različitih hranljivih podloga na porast micelije izolata *Monilia* spp.

■ *M. laxa*    ■ *M. fructigena*    ■ *M. fructicola*



**Slika 19.** Porast izolata *Monilinia* spp. na različitim podlogama (PDA-podloga od krompira, dekstroze i agara; MA-malt podloga; V8A-podloga od paradajz soka; CzA-Čapekova podloga; WA-vodeni agar)



Tabela 10. Uticaj različitih hranljivih podloga na porast micelije izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolot	Prosečan porast (mm/ 7dana) <sup>1</sup>					
		PDA*	WA*	MA*	V8A*	CZA*	
<i>M. laxa</i>	TPGR	66,33 ± 5,96 bc	27,67 ± 2,07 ef	82,83 ± 2,64 a	36,00 ± 4,65 ef	48,67 ± 1,63 a	
	ŠMLEs	63,67 ± 6,06 cd	31,67 ± 1,37 ab	83,00 ± 1,79 a	38,83 ± 0,98 cde	48,00 ± 3,16 a	
	ŠPSV	45,83 ± 9,93 e	26,83 ± 1,33 e	70,00 ± 5,10 c	43,33 ± 2,25 ab	32,83 ± 1,17 c	
	TPBN	65,00 ± 2,37 c	29,17 ± 0,75 cdef	72,50 ± 2,66 bc	40,17 ± 1,83 cd	35,17 ± 1,17 c	
	ŠMLE	63,17 ± 4,45 cd	28,50 ± 2,07 def	81,17 ± 1,17 a	45,17 ± 1,60 a	41,83 ± 3,06 b	
	VGRSD	66,17 ± 3,13 bc	30,17 ± 1,83 bcd	84,50 ± 1,38 a	41,67 ± 1,37 bc	47,83 ± 0,75 b	
	BPSV	58,33 ± 2,66 d	32,83 ± 1,94 a	80,50 ± 1,52 a	37,33 ± 0,82 de	41,83 ± 6,52 b	
	BMLEs	50,17 ± 2,93 e	29,33 ± 1,21 bcde	74,33 ± 5,35 b	39,17 ± 1,83 cde	32,17 ± 2,32 c	
	TPAL	45,67 ± 5,57 e	23,17 ± 2,04 g	75,83 ± 3,06 b	33,17 ± 1,47 f	34,17 ± 2,40 c	
	VGRSE	50,67 ± 3,56 e	31,17 ± 2,64 abc	63,67 ± 4,84 d	38,67 ± 4,68 cde	32,83 ± 2,32 c	
<i>M. fructigena</i>	VPBG	16,67 ± 1,86 f	21,17 ± 1,94 g	80,17 ± 1,72 a	23,00 ± 1,67 g	15,33 ± 7,15 d	
<i>M. fructicola</i>	NPGM	71,33 ± 3,39 a	18,67 ± 2,34 h	58,83 ± 5,23 e	17,67 ± 2,80 h	18,00 ± 2,45 d	

<sup>1</sup> Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna

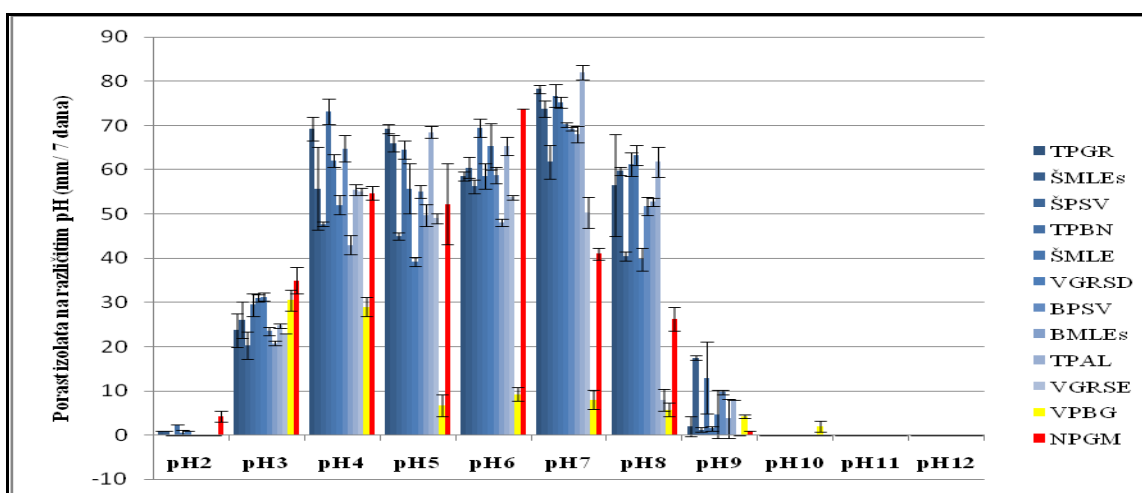
\* PDA-podloga od krompira, dekstroze i agara; MA-malt podloga; V8A-podloga od paradajz soka; CZA-Čapekova podloga; WA-vodeni agar

**Utjecaj kiselosti podloge.** Porast 12 ispitivanih izolata praćen je na PDA podlozi različitih pH vrednosti (pH 2-pH 11). Ispitivani izolati ispoljili su statistički značajnu razliku u brzini porasta micelije na podlogama kiselosti u intervalu pH 3-pH 9 ( $P < 0,01$ ). Na jako kiseloj podlozi (pH 2) porast su ispoljili izolati *M. laxa* i *M. fructicola*, a na podlogama kiselosti više od pH 9 porast je zabeležen samo za izolat *M. fructigena* (Grafikon 3, Tabela 11). Osim razlika u brzini porasta ispoljene su značajne razlike u morfološkim osobinama izolata na podlogama različite pH vrednosti (Slika 20).

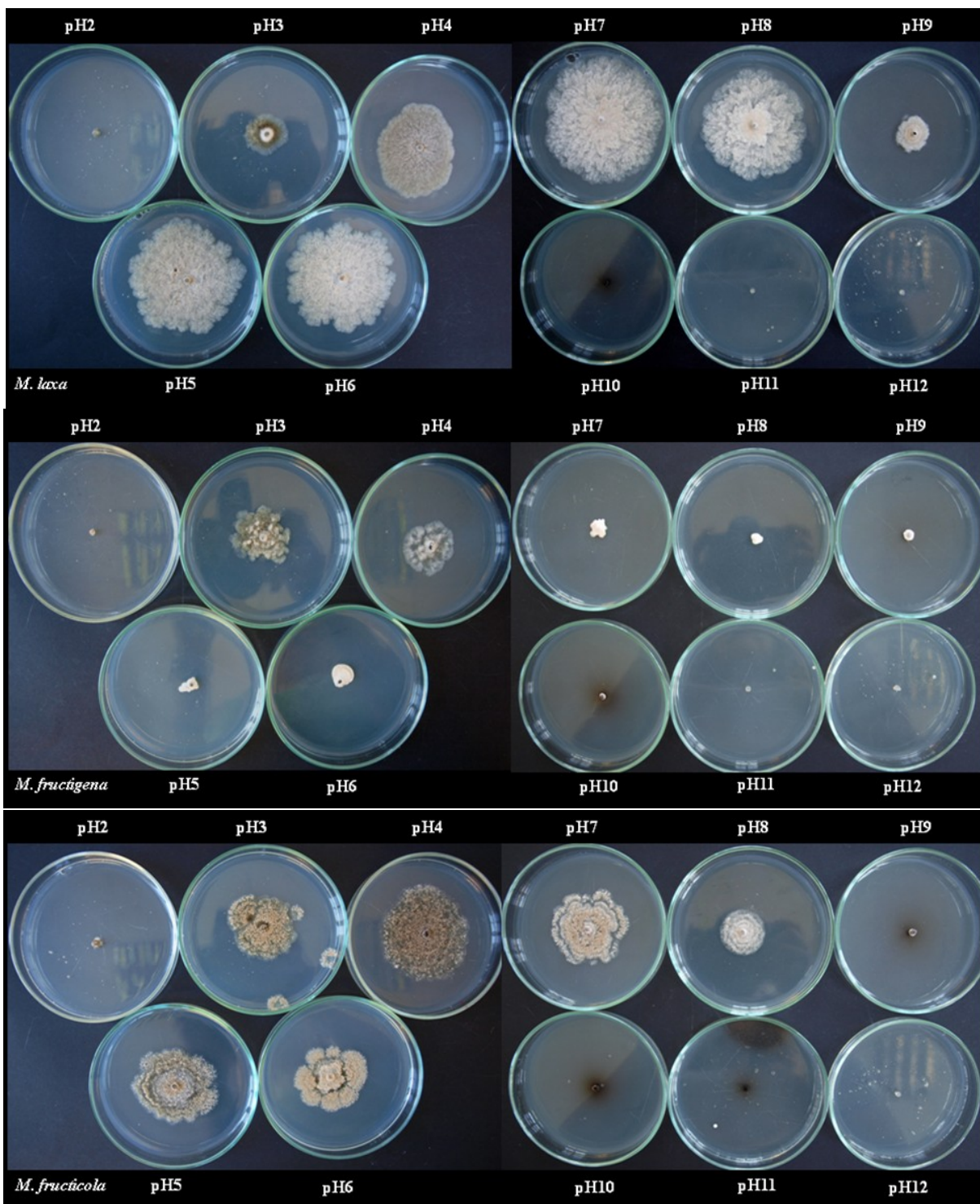
Izolati *M. laxa* imali su najveći prosečni porast na PDA podlozi pH vrednosti 7 ( $50,25 \pm 3,50$  mm do  $82,00 \pm 1,63$  mm tokom sedam dana), dok na podlozi pH vrednosti većoj od 9 nisu uopšte rasli. Karakterističan oblik rozete bio je uočljiv na podlogama kiselosti pH 5-pH 8, dok je na drugim pH vrednostima micelija bila ravnog oboda.

Sa druge strane, izolat VPBG, predstavnik vrste *M. fructigena*, najveći porast ( $30,50 \pm 2,83$  mm) ispoljio je na podlozi niske pH vrednosti (pH 3) i jedini je izolat koji je rastao na podlozi pH vrednosti 10. Na podlogama kiselosti pH 5-pH 9 izolat VPBG formirao je tipičnu koloniju belo-žute boje sa koncentričnim prstenovima spora, dok je micelija na podlogama kiselosti pH 3 i pH 4 bila siva i režnjevito oblika.

Izolat NPGM, identifikovan kao *M. fructicola*, najbrži prosečan porast ispoljio je na PDA podlozi pH vrednosti 6, a najsporije na podlozi pH 9, dok na podlogama sa višim pH vrednostima nije rastao. Na svim podlogama različitih pH vrednosti na kojima je rastao, formirao je tipične kolonije sa koncentričnim prstenovima spora.



**Grafikon 3.** Utjecaj različitih pH vrednosti PDA podloge na porast micelije izolata *Monilia* spp. ■ *M. laxa* ■ *M. fructigena* ■ *M. fructicola*



Slika 20. Porast izolata *Monilinia* spp. na PDA podlozi različitih pH vrednosti

Tabela 11. Uticaj različitih pH vrednosti PDA podloge na porast micelije izolata *Monilinia* spp.

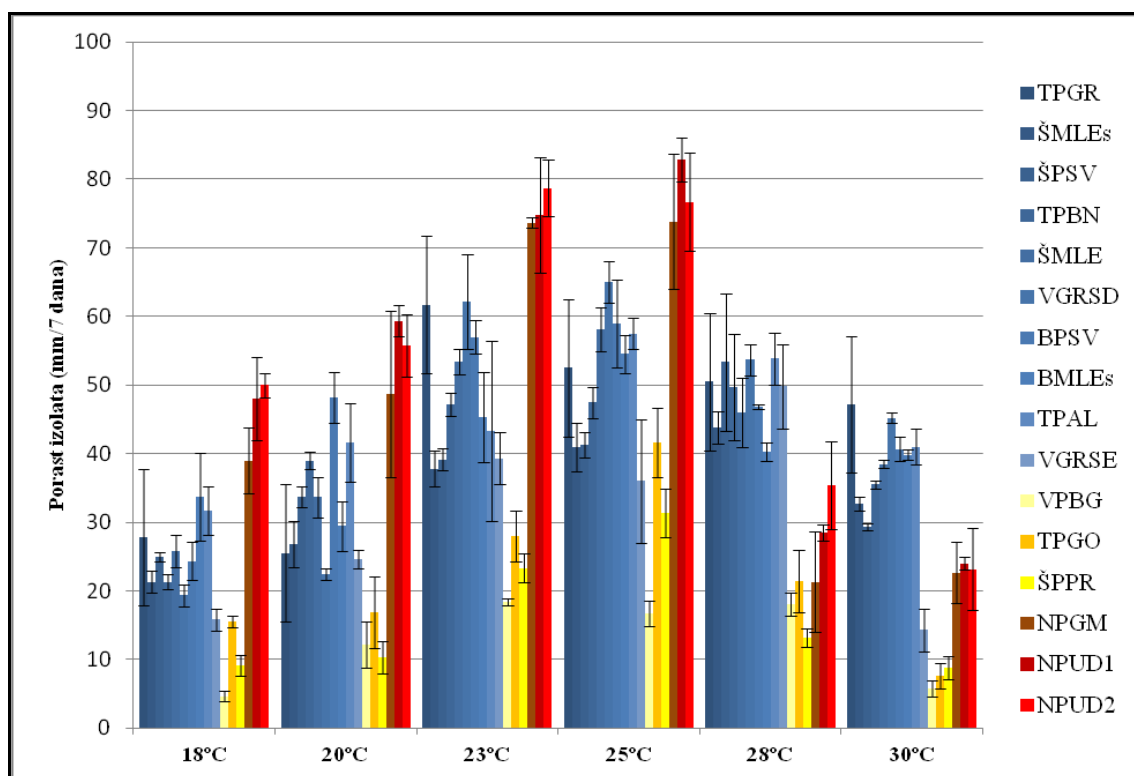
Vrsta	Izolát	Prosečan porast (mm/7 dana) <sup>1</sup>											
		pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10	pH11	pH12	
<i>M. laxa</i>	TPGR	1,00 ± 0,00c	23,75 ± 3,77cd	69,25 ± 2,63ab	69,25 ± 0,96a	58,50 ± 1,00de	78,25 ± 0,96b	56,50 ± 11,56bc	2,00 ± 2,31e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	ŠMLEs	0,00 ± 0,00c	26,00 ± 4,08c	55,75 ± 9,36d	66,00 ± 1,83a	60,50 ± 2,38d	73,75 ± 1,89	59,75 ± 0,96ab	17,50 ± 0,58a	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	ŠPSV	0,00 ± 0,00d	20,25 ± 3,10d	47,75 ± 0,50ef	45,00 ± 0,82d	56,25 ± 1,50ef	61,75 ± 3,77	40,50 ± 1,00d	1,25 ± 0,50e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	TPBN	2,50 ± 0,58b	29,50 ± 2,52b	73,25 ± 2,87a	64,50 ± 2,08a	69,50 ± 2,08b	76,75 ± 2,63bc	61,25 ± 2,63ab	13,00 ± 8,08ab	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	ŠMLE	0,50 ± 0,00cd	31,00 ± 0,82b	62,00 ± 1,41d	55,75 ± 5,68b	58,50 ± 2,89de	75,25 ± 1,26bc	63,25 ± 2,22a	1,50 ± 0,58e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VGRSD	1,00 ± 0,00c	31,25 ± 0,96b	52,00 ± 2,16de	39,25 ± 0,96e	65,25 ± 5,32e	70,25 ± 0,50d	39,75 ± 2,63d	4,75 ± 5,50de	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	BPSV	0,00 ± 0,00d	23,50 ± 1,00cd	64,75 ± 2,99bc	55,00 ± 1,41b	58,75 ± 1,89de	69,25 ± 0,50d	51,75 ± 2,06c	9,75 ± 0,50bc	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	BMLEs	0,00 ± 0,00d	20,75 ± 0,50d	43,00 ± 2,16f	49,75 ± 2,50cd	48,00 ± 0,82g	68,00 ± 1,83d	52,75 ± 0,96c	3,75 ± 4,35de	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	TPAL	0,00 ± 0,00d	24,75 ± 0,50c	55,50 ± 1,29d	68,50 ± 1,29a	65,25 ± 2,06c	82,00 ± 1,63a	61,75 ± 3,30ab	8,00 ± 0,00cd	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VGRSE	0,00 ± 0,00d	23,00 ± 0,00cd	55,00 ± 0,82de	49,00 ± 1,15e	53,75 ± 0,50f	50,25 ± 3,50f	8,00 ± 2,45f	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>M. fructigena</i>	VFBG	0,00 ± 0,00d	30,50 ± 2,38b	29,00 ± 2,16g	6,75 ± 2,50f	9,25 ± 1,50h	8,00 ± 2,16h	5,75 ± 1,50f	4,25 ± 0,50de	2,00 ± 1,15a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>M. fructicola</i>	NFGM	4,25 ± 1,26a	35,00 ± 2,94a	54,75 ± 1,50d	52,25 ± 9,18bc	73,83 ± 0,00a	41,00 ± 1,41g	26,25 ± 2,63e	1,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

<sup>1</sup> Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna

### 5.8. Ekološke karakteristike izolata *Monilinia* spp.

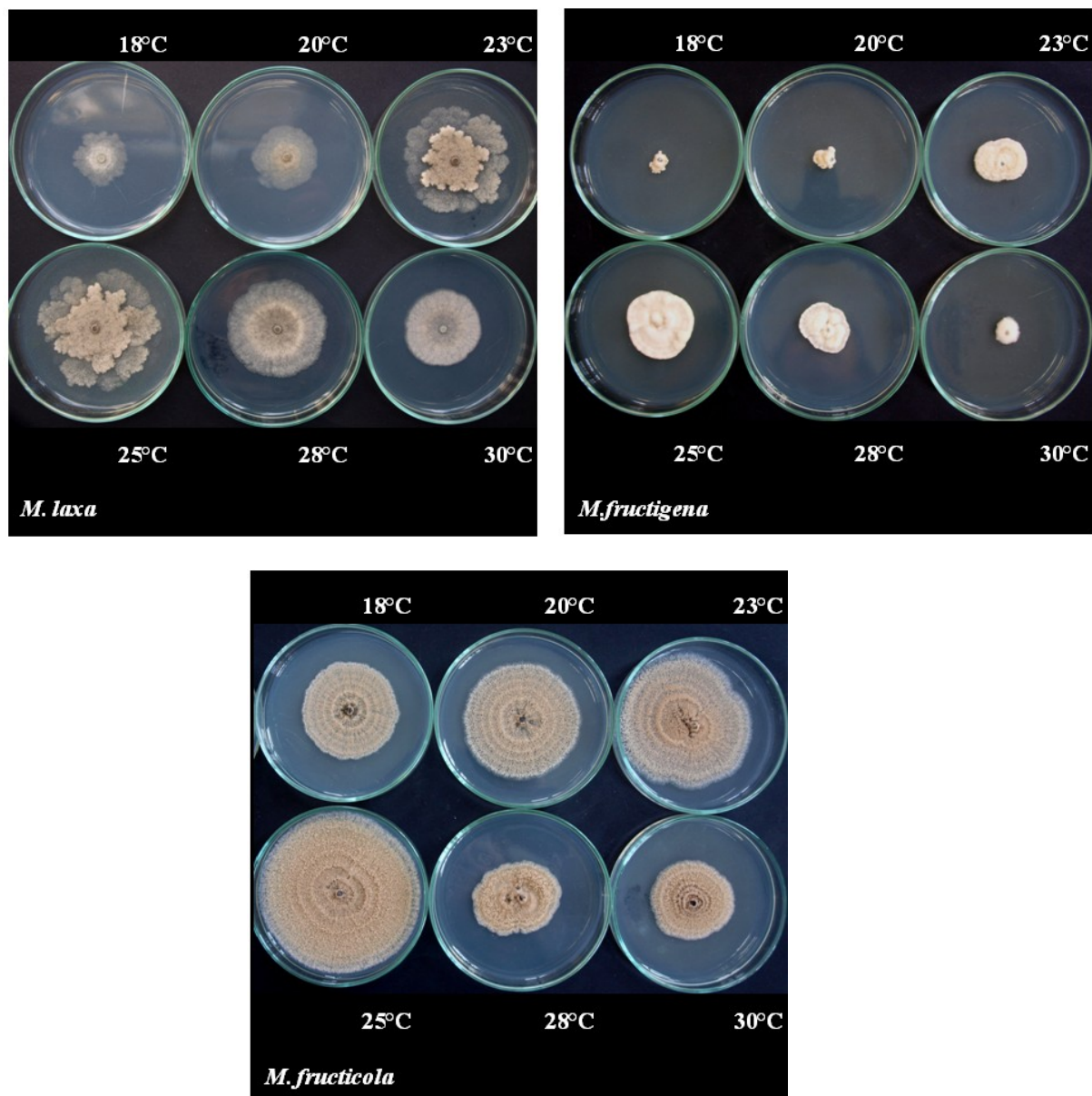
**Uticaj temperature.** Uticaj temperatura (18, 20, 23, 25, 28 i 30°C) na porast 16 odabranih izolata praćen je na već opisan način na PDA podlozi. Svi ispitivani izolati ispoljili su statistički značajnu razliku u brzini porasta kolonije na svim temperaturama ( $P < 0,01$ ), pri čemu je najveći broj ispitivanih izolata ispoljio najveći prosečan porast na temperaturi od 25°C, dok je manji broj izolata ispoljio optimalan porast na temperaturama od 23°C i 28°C (Grafikon 4, Tabela 12). Pored razlika u brzini kod izolata *M. laxa* ispoljene su razlike u morfološkim osobinama: na temperaturi 23 i 25°C kolonija je imala karakterističan oblik rozete, dok je na ostalim temperaturama kolonija imala ravnu ivicu. Sa druge strane, temperature inkubacije nisu uticale na izgled kolonije izolata *M. fructigena* i *M. fructicola* (Slika 21).

Izolati *M. laxa* najsporije su rasli na temperaturi od 18°C, dok su izolati *M. fructigena* i *M. fructicola* najsporije rasli na 30°C.



**Grafikon 4.** Uticaj različitih temperatura na porast micelije izolata *Monilinia* spp.

■ *M. laxa*      ■ *M. fructigena*      ■ *M. fructicola*



Slika 21. Porast izolata *Monilinia* spp. na PDA podlozi na različitim temperaturama

Tabela 12. Uticaj različitih temperatura na porast micelije izolata *Monilinia* spp.

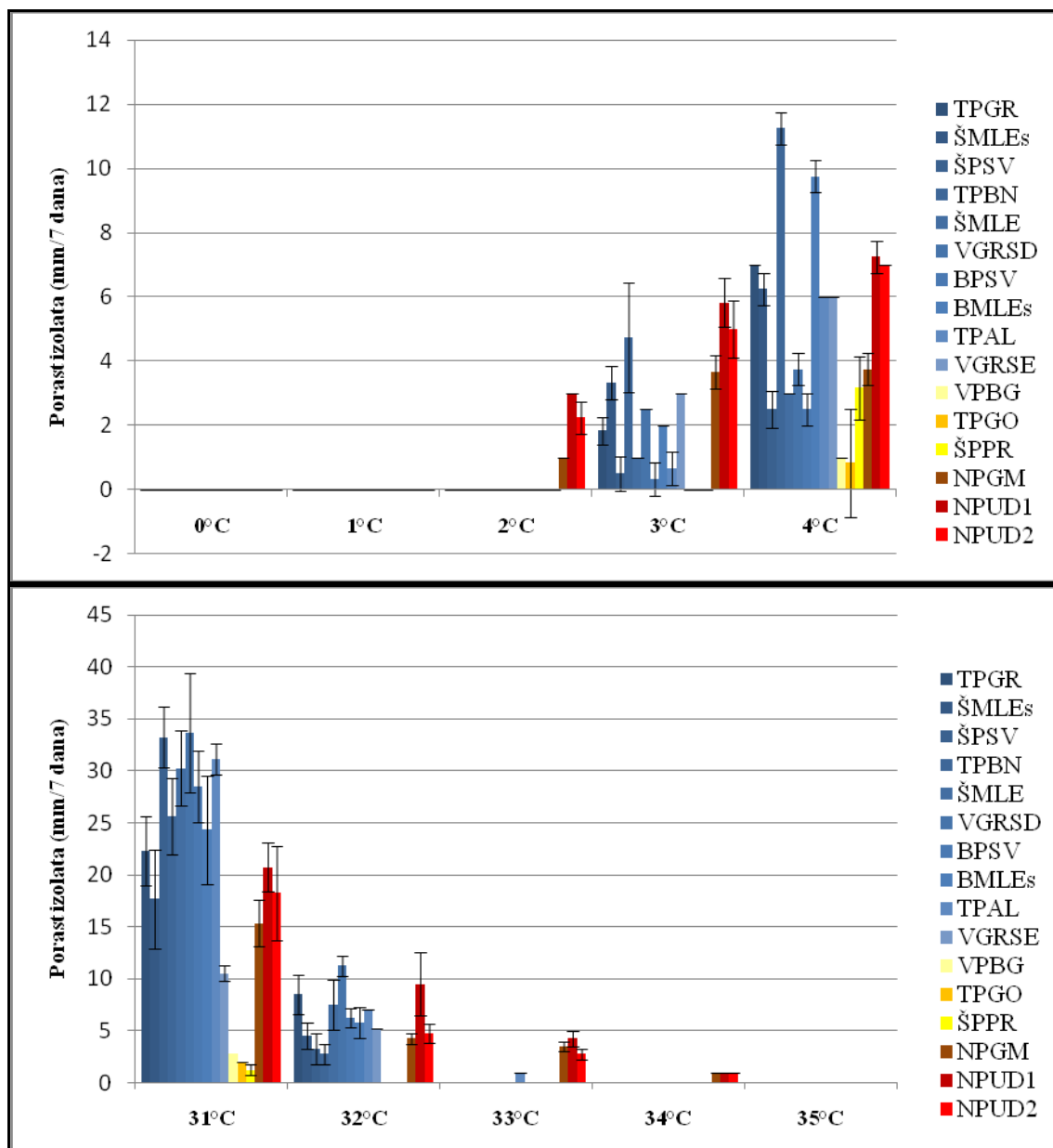
Vrsta	Izolot	Prosečan porast (mm/7 dana) <sup>1</sup>						
		18°C	20°C	23°C	25°C	28°C	30°C	
<i>M. laxa</i>	TPGR	27,83 ± 4,54d	25,50 ± 4,76fg	61,67 ± 3,72b	52,50 ± 6,47de	50,50 ± 2,07ab	47,17 ± 0,98a	
	ŠMLEs	21,33 ± 1,63ef	26,83 ± 3,31fg	37,83 ± 2,64f	41,00 ± 3,52g	43,83 ± 2,32cd	32,67 ± 1,03d	
	ŠPSV	25,00 ± 0,65de	33,67 ± 1,51de	39,17 ± 1,60ef	41,33 ± 1,86g	53,33 ± 10,05a	29,33 ± 0,52e	
	TPBN	21,33 ± 1,03ef	39,00 ± 1,26cd	47,17 ± 1,72d	47,50 ± 2,26ef	49,67 ± 7,74abc	35,50 ± 0,55c	
	ŠMLE	25,83 ± 2,32d	33,67 ± 2,94e	53,33 ± 1,86c	58,17 ± 3,19d	46,00 ± 5,10bcd	38,50 ± 0,55b	
	VGRSD	19,33 ± 1,63fg	22,50 ± 0,84g	62,17 ± 6,88b	65,00 ± 3,03c	53,67 ± 2,34a	45,17 ± 0,75a	
<i>M. fructigena</i>	BPSV	24,33 ± 2,80de	48,17 ± 3,66b	57,00 ± 2,45bc	59,00 ± 6,39d	46,83 ± 0,41bc	40,67 ± 1,75b	
	BMLEs	33,67 ± 6,41c	29,50 ± 3,62ef	45,33 ± 6,50de	54,50 ± 2,74d	40,33 ± 1,37de	39,83 ± 0,75b	
	TPAL	31,67 ± 3,50c	41,67 ± 5,75c	43,33 ± 13,09def	57,50 ± 2,26d	53,83 ± 3,76a	41,00 ± 2,61b	
	VGRSE	15,83 ± 1,60g	24,67 ± 1,37fg	39,33 ± 3,83ef	36,00 ± 8,94gh	49,83 ± 6,18abc	14,33 ± 3,14g	
	VPBG	4,67 ± 0,82i	12,17 ± 3,43hi	18,33 ± 0,52h	16,67 ± 1,86i	18,00 ± 1,67gh	5,83 ± 1,17i	
	TPGO	15,50 ± 0,84g	16,83 ± 5,23h	28,00 ± 3,63g	41,67 ± 5,05fg	21,50 ± 4,55g	7,67 ± 1,86hi	
<i>M. fructicola</i>	ŠPPR	9,17 ± 1,47h	10,33 ± 2,34i	23,33 ± 2,07gh	31,33 ± 3,50h	13,17 ± 1,33h	8,83 ± 1,72h	
	NPGM	39,00 ± 4,86b	48,67 ± 12,16b	73,67 ± 0,82a	73,83 ± 9,83b	21,33 ± 7,31g	22,67 ± 4,46f	
	NPUDI	48,00 ± 6,07a	59,33 ± 2,25a	74,83 ± 8,40a	82,83 ± 3,19a	28,50 ± 1,22f	24,00 ± 0,89f	
	NPUD2	50,00 ± 1,79a	55,83 ± 4,54a	78,67 ± 4,13a	76,67 ± 7,15b	35,33 ± 6,38e	23,17 ± 5,98f	

<sup>1</sup> Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna

**Uticaj ekstremnih temperatura.** Uticaj ekstremnih temperatura na porast 16 odabranih izolata praćen je inkubiranjem izolata zasejanih na PDA podlozi na temperaturama nižim od 4°C (od 0°C do 4°C) i višim od 30°C (od 30°C do 35°C) kako bi bile utvrđene granične temperature rasta odabranih izolata. Uočena je statistički značajna razlika u brzini porasta micelije odabranih izolata na različitim temperaturama ( $P < 0,01$ ).

Praćenjem porasta izolata na ekstremnim temperaturama uočeno je da su izolati *M. fructigena* najosetljiviji kako na niske, tako i na visoke temperature; granične temperature rasta ove vrste su 4°C i 31°C. Sa druge strane, izolati vrste *M. fructicola* su najotporniji na uticaj niskih i visokih temperature; granične temperature rasta ove vrste su 2°C i 34°C. Vrsta *M. laxa* ispoljila je umerenu osetljivost na uticaj ekstremnih temperatura. Rast ovih izolata zabeležen je na temperaturama višim od 2°C i nižim od 33°C (Grafikon 5, Tabela 13).





**Grafikon 5.** Uticaj niskih (gore) i visokih (dole) temperatura na porast micelije izolata *Monilinia* spp. ■ *M. laxa* ■ *M. fructigena* ■ *M. fructicola*

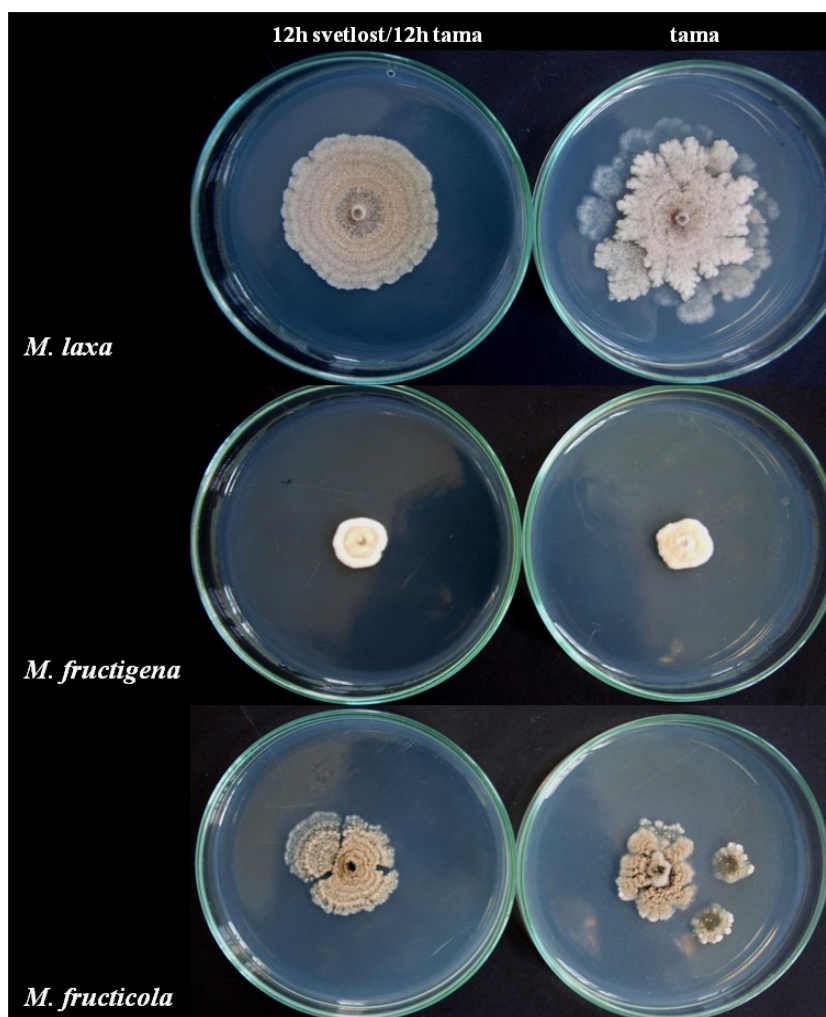
Tabela 13. Uticaj niskih i visokih temperatura na porast micelije izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolati	Prosečan porast (mm/7 dana) <sup>1</sup>											
		0°C	1°C	2°C	3°C	4°C	31°C	32°C	33°C	34°C	35°C		
<i>M. laxa</i>	TPGR	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	1,83 ± 0,41g	7,00 ± 0,00c	22,33 ± 3,31g	8,50 ± 1,91bc	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	ŠMLEs	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	3,33 ± 0,52cd	6,25 ± 0,50d	17,67 ± 4,76i	4,50 ± 1,25gh	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	ŠPSV	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	0,50 ± 0,55hij	2,50 ± 0,58g	33,25 ± 2,94a	3,25 ± 1,50hi	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	TPBN	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	4,75 ± 1,71b	11,25 ± 0,50a	25,67 ± 3,66e	2,75 ± 0,96i	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	ŠMLE	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	1,00 ± 0,00h	3,00 ± 0,00fg	30,25 ± 3,62c	7,50 ± 2,43cd	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	VGRSD	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	2,50 ± 0,00ef	3,75 ± 0,50e	33,67 ± 5,75a	11,25 ± 0,96a	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
<i>M. fructigena</i>	BPSV	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	0,33 ± 0,51ij	2,50 ± 0,50g	28,50 ± 3,43d	6,25 ± 0,96def	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	BMLEs	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	2,00 ± 0,00fg	9,75 ± 0,50b	24,33 ± 5,23f	5,75 ± 1,50efg	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	TPAL	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	0,67 ± 0,52hi	6,00 ± 0,00d	31,17 ± 1,51b	7,00 ± 0,00cde	1,00 ± 0,00d	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	VGRSE	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	3,00 ± 0,00de	6,00 ± 0,00d	10,50 ± 2,34k	5,25 ± 1,25fg	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	VPBG	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	0,00 ± 0,00j	1,00 ± 0,00h	2,75 ± 0,75l	0,00 ± 0,00j	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	TPGO	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	0,00 ± 0,00j	0,83 ± 1,69h	2,00 ± 0,00lm	0,00 ± 0,00j	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
<i>M. fructicola</i>	ŠPPR	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00d	0,00 ± 0,00j	3,17 ± 0,98ef	1,25 ± 0,50m	0,00 ± 0,00j	0,00 ± 0,00e	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00		
	NPGM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00c	3,67 ± 0,52c	3,75 ± 0,50e	15,33 ± 2,25j	4,25 ± 0,50ghi	3,50 ± 0,50b	1,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00		
	NPUDI	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00a	5,83 ± 0,75a	7,25 ± 0,50c	20,75 ± 2,34h	9,50 ± 3,00b	4,25 ± 0,78a	1,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00		
	NPUD2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,25 ± 0,50b	5,00 ± 0,89b	7,00 ± 0,00c	18,25 ± 4,54i	4,75 ± 0,96i	2,75 ± 0,52c	1,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00		

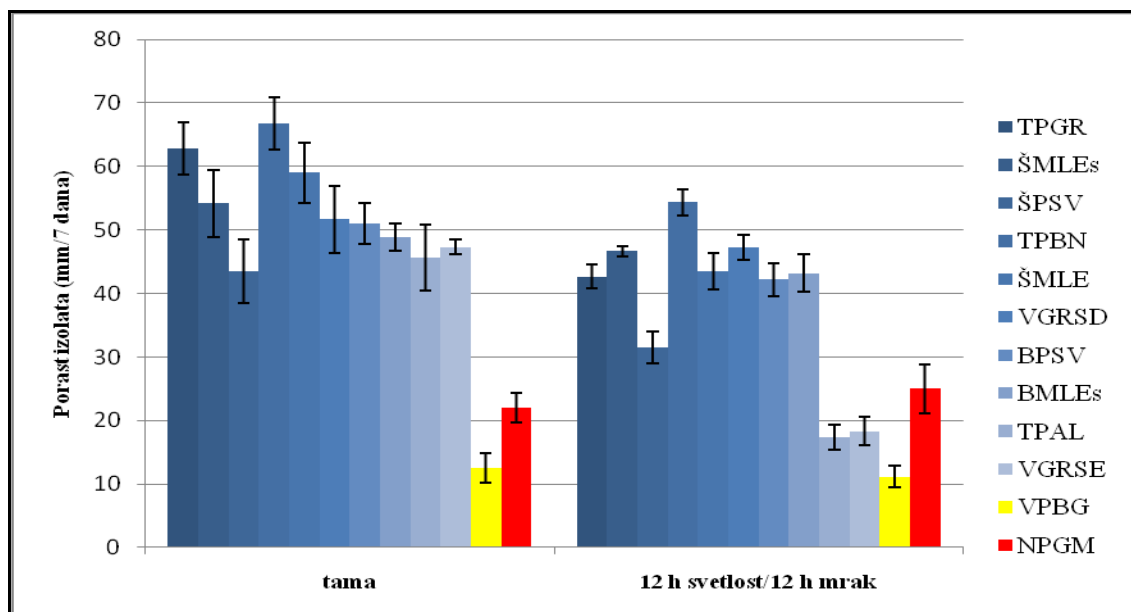
<sup>1</sup> Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna

**Utjecaj svetlosti.** Porast 12 ispitivanih izolata proučavan je u različitim uslovima osvetljenja na PDA podlozi. Proučavani izolati rasli su različitom brzinom u različitim uslovima osvetljenja: stalni mrak i svetlosni režim 12 h svetlost/12 h mrak (Slika 22, Grafikon 6, Tabela 14).

Nakon inkubacije od sedam dana izolati vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* najbrži prosečni porast imali su u mraku, jedino je izolat NPGM (predstavnik vrste *M. fructicola*) imao brži prosečan porast u svetlosnom režimu 12 h svetlost/12 h mrak. Zabeležena je statistički značajna razlika u prosečnom porastu izolata u mraku i u uslovima smene 12 h svetlost/12 h mrak ( $66,8 \pm 5,8$  mm) na nivou značajnosti 0,05.



Slika 22. Porast izolata *Monilinia* spp. pri različitim svetlosnim režimima



**Grafikon 6.** Uticaj različitog svetlosnog režima na porast micelije izolata *Monilinia* spp. ■ *M. laxa* ■ *M. fructigena* ■ *M. fructicola*

**Tabela 14.** Uticaj različitog svetlosnog režima na porast micelije izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolat	Prosečan porast (mm/7 dana) <sup>1</sup>	
		Tama	12 h svetlost/ 12 h mrak
<i>M. laxa</i>	TPGR	62,83 ± 4,12ab	42,67 ± 1,86c
	ŠMLEs	54,17 ± 5,27c	46,67 ± 0,82b
	ŠPSV	43,50 ± 5,01f	31,50 ± 2,43d
	TPBN	66,83 ± 4,12a	54,33 ± 2,07a
	ŠMLE	59,00 ± 4,69b	43,50 ± 2,81c
	VGRSD	51,67 ± 5,28cd	47,33 ± 1,97b
	BPSV	51,00 ± 3,29cd	42,17 ± 2,56c
	BMLEs	48,83 ± 2,14de	43,17 ± 2,93c
	TPAL	45,67 ± 5,24ef	17,33 ± 1,97f
	VGRSE	47,33 ± 1,21def	18,33 ± 2,16f
<i>M. fructigena</i>	VPBG	12,50 ± 2,26h	11,17 ± 1,72g
<i>M. fructicola</i>	NPGM	22,00 ± 2,28g	25,00 ± 3,90e

<sup>1</sup> Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna

### 5.9. Unakrsna patogenost izolata *Monilinia* spp.

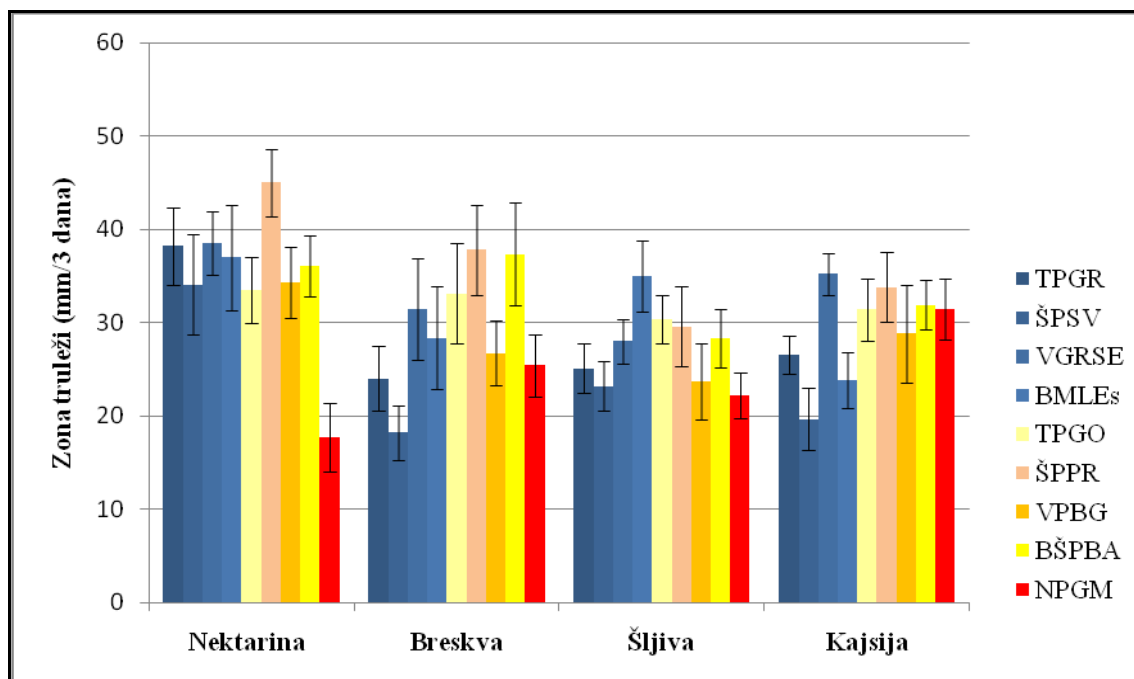
Virulentnost devet odabranih monosporijalnih izolata *Monilinia* spp. (četiri *M. laxa*, četiri *M. fructigena* i jedan *M. fructicola*) ispitana je veštačkom inokulacijom povređenih plodova breskve, nektarine, šljive, trešnje, višnje i kajsije (Slika 23). Ovi testovi pokazali su da postoji statistički značajna razlika u virulentnosti kako između izolata različitih vrsta, tako i između izolata iste vrste ( $P < 0,01$ ) (Grafikon 7, Tabela 15). Izuzetak predstavljaju eksperimenti izvedeni na plodovima višnje koji pokazali da ne postoji statistički značajna razliku u virulentnosti tri vrste roda *Monilinia* na ovim plodovima ( $P > 0,1$ ).

Na plodovima nektarine i breskve najveću patogenost ispoljio je izolat ŠPPR (*M. fructigena*), poreklom sa šljive, koji je nakon tri dana na nektarini prouzrokovao nekrotičnu zonu prečnika 45 mm, odnosno 37,78 mm na breskvi. Najmanju patogenost na plodovima nektarine ispoljio je izolat NPGM (*M. fructicola*) sa nektarine sa nekrotičnom zonom od 17,75 mm tokom tri dana, odnosno na plodovima breskve izolat ŠPSV (*M. laxa*) sa šljive sa zonom od 18,22 mm.

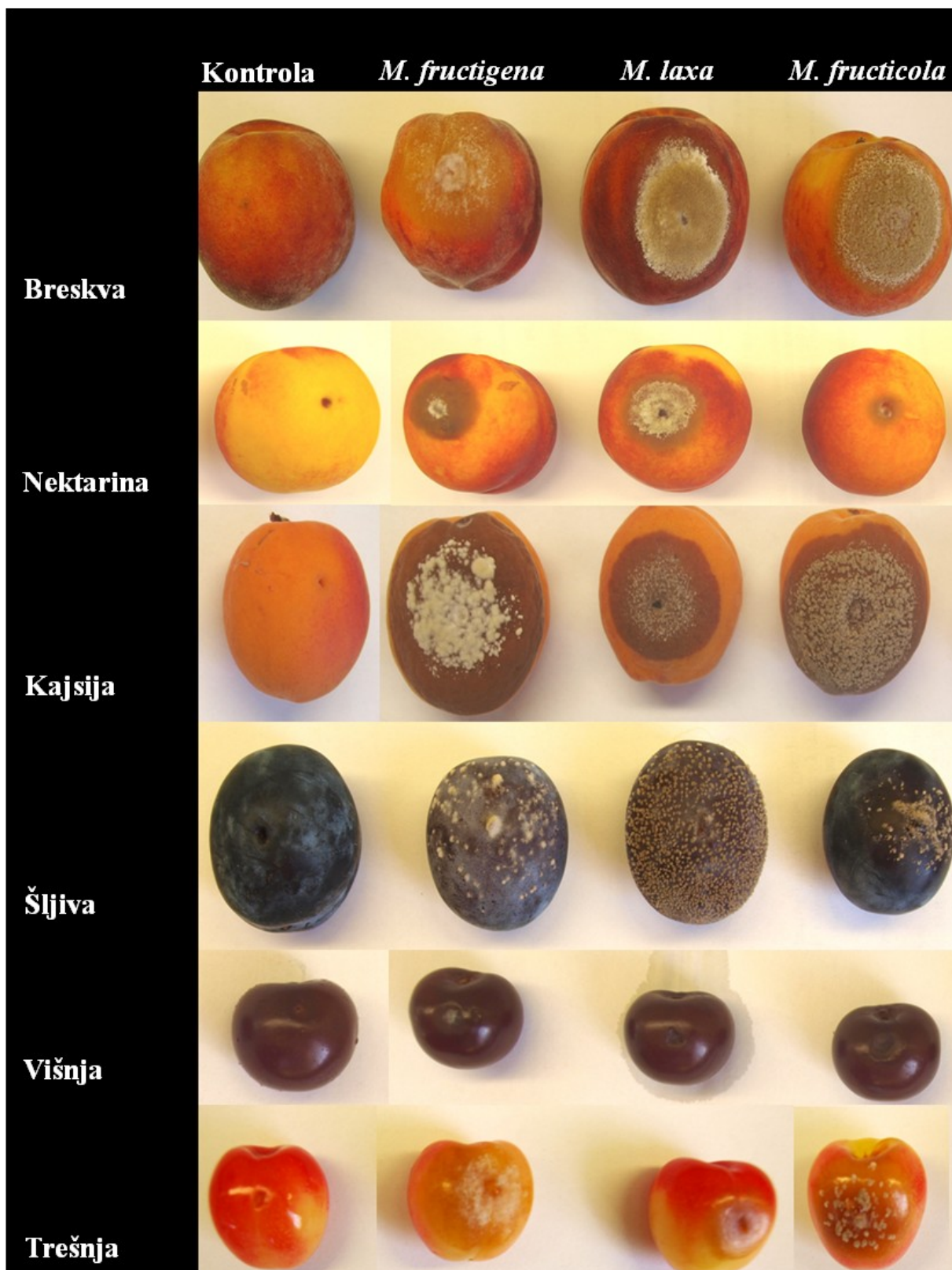
Na plodovima šljive najveću nekrotičnu zonu obrazovao je izolat BMLE (*M. laxa*) sa breskve, a najmanju NPGM (*M. fructicola*) sa nektarine.

Sa druge strane, na plodovima kajsije najmanju i najveću nekrotičnu zonu obrazovali su izolati iste vrste (*M. laxa*).

Na plodovima trešnje i višnje, izolat VPBG (*M. fructigena*) sa višnje ispoljio je najveću virulentnost, dok je izolat BMLE (*M. laxa*) sa breskve prouzrokovao najmanju zonu truleži na ovim plodovima.



**Grafikon 7.** Prikaz unakrsne patogenosti ispitivanih izolata *Monilinia* spp. na plodovima koštičavih voćaka. ■ *M. laxa* ■ *M. fructigena* ■ *M. fructicola*



Slika 23. Unakrsna patogenost izolata *Monilinia* spp. na plodovima koštičavih voćaka

**Tabela 15.** Unakrsna patogenost ispitivanih izolata *Monilinia* spp. na plodovima koštičavih voćaka

Test biljka	Prečnik nekrotične zone (mm/3 dana) <sup>1</sup>										
	<i>M. laxa</i>			<i>M. fructigena</i>				<i>M. fructicola</i>			
	TPGR	ŠPSV	VGRSE	BMLE	TPGO	ŠPPR	VPBG	BŠPBA	NPGM		
<b>Nektarina</b>	38,22 ± 4,18b	34,10 ± 5,32c	38,56 ± 3,39b	37,00 ± 5,64bc	33,50 ± 3,54c	45,00 ± 3,65a	34,30 ± 3,86c	36,10 ± 3,25bc	17,75 ± 3,69d		
<b>Breskva</b>	24,00 ± 3,46c	18,22 ± 2,91f	31,44 ± 5,41bc	28,33 ± 5,50cd	33,14 ± 5,37b	37,78 ± 4,79a	26,75 ± 3,41de	37,33 ± 5,54a	25,44 ± 3,32de		
<b>Šljiva</b>	25,10 ± 2,68c	23,20 ± 2,66c	28,00 ± 2,36b	35,00 ± 3,80a	30,30 ± 2,58b	29,60 ± 4,27b	23,70 ± 4,11c	28,3 ± 3,13b	22,20 ± 2,44c		
<b>Kajsija</b>	26,53 ± 2,06c	19,67 ± 3,29e	35,20 ± 2,30a	23,87 ± 2,97d	31,40 ± 3,35b	33,80 ± 3,71ab	28,80 ± 5,27c	31,87 ± 2,64b	31,47 ± 3,27b		
<b>Trešnja</b>	Nije određeno	Nije određeno	Nije određeno	10,21 ± 1,42c	Nije određeno	Nije određeno	18,07 ± 1,44a	Nije određeno	14,73 ± 0,88b		
<b>Višnja</b>	Nije određeno	Nije određeno	Nije određeno	1,80 ± 0,77a	Nije određeno	Nije određeno	2,33 ± 0,82a	Nije određeno	2,20 ± 0,41a		

<sup>1</sup> Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna



## 5.10. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija

Molekularna detekcija svih 246 dobijenih izolata *Monilinia* spp. obavljena je primenom PCR reakcija uz korišćenje prajmera: MO368-5, MO368-8R, MO368-10R i Laxa-R2 specifičnih za detekciju *Monilinia* spp. i upotrebom para univerzalnih prajmera ITS1/ITS4.

Molekularna identifikacija 18 odabranih izolata *Monilinia* spp. obavljena je, nakon sekvencioniranja ITS genomnog regiona i obrade dobijenih sekvenci, višestrukim uparivanjem sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti pomoću BLAST analize i softverskog paketa MEGA 5. Višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka pomoću CLUSTAL *W* programa, obavljena je potvrda identifikacije dobijenih sekvenci.

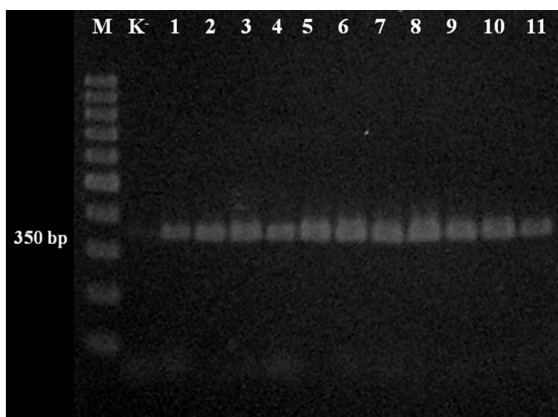
Molekularna karakterizacija 18 odabranih izolata obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla. Upoređivanje je vršeno sa 38 sekvenci vrsta roda *Monilinia* dostupnih u GenBank bazi podataka. Filogenetsko stablo rekonstruisano je korišćenjem Maximum Parsimony metode, integrisane unutar programa MEGA5 i bootstrap analize u 1000 ponavljanja.

Određeni su markeri za tri izolata *M. fructicola* poreklom iz Srbije. Upotrebom Multiplex PCR kit-a u samo jednoj reakciji umnoženo je pet različitih SSR markera. Poređenje dobijenih profila izolata poreklom iz Srbije sa profilima dobijenim u prethodnim istraživanjima **Jansch et al.** (2012) ukazalo je na put introdukciju vrste *M. fructicola* u našu zemlju.

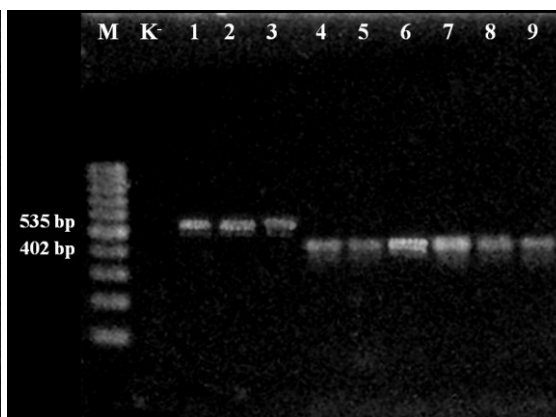
### 5.10.1. Molekularna detekcija primenom Multiplex PCR reakcije

Kao rezultat lančane reakcije polimeraze, korišćenjem prajmera MO368-5, MO368-8R, MO368-10R i Laxa-R2, po protokolu koji su opisali **Côté et al.** (2004), amplifikovani su fragmenti nukleinske kiseline očekivanih veličina. Kod 237 uzoraka došlo je do amplifikacije fragmenta veličine 351 bp, karakterističnog za izolate vrste *M. laxa* (Slika 24). Fragmenti veličine oko 402 bp amplifikovani su u slučaju šest uzoraka detektovanih kao *M. fructigena*, dok je kod tri izolata došlo do amplifikacije fragmenata

veliĉine 535 bp koji su detektovani kao vrsta *M. fructicola* (Slika 25). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole. Multiplex PCR detekcijom potvrđen je identitet svih prikupljenih izolata prethodno okarakterisanih na osnovu morfoloških karakteristika.



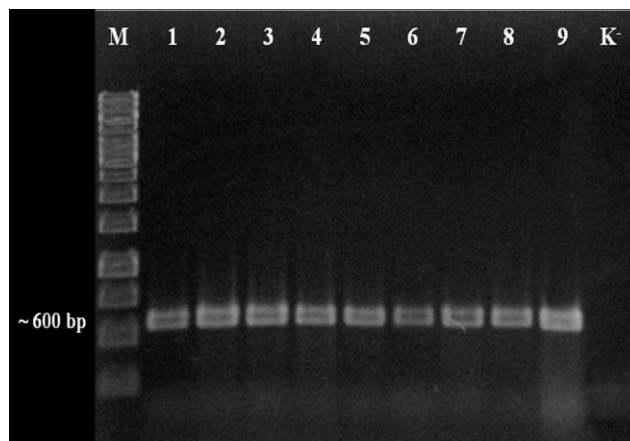
**Slika 24.** Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem prajmera MO368-5, MO368-8R, MO368-10R i Laxa-R2. Kolone: M-100 bp DNK marker; K<sup>-</sup> negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom); 1-izolat BPČO; 2-izolat BPZK; 3-izolat KPGG; 4-izolat KPGO; 5-izolat NPSP; 6-izolat NPVI; 7-izolat ŠPIV; 8-izolat TPLČ; 9-izolat TPRŠ; 10-izolat VPJR;



**Slika 25.** Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem prajmera MO368-5, MO368-8R, MO368-10R i Laxa-R2. Kolone: M-100 bp DNK marker; K<sup>-</sup> negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom); 1-izolat NPGM; 2-izolat NPUD1; 3-izolat NPUD2; 4-izolat VPBG; 5-izolat ŠPPR; 6-izolat BŠPBA; 7-izolat TPGO; 8-izolat ŠMPR; 9-izolat BŠPBA1.

### 5.10.2. Molekularna detekcija na osnovu amplifikacije ITS regiona

Sa ciljem potvrde identiteta odabranih izolata, korišćen je par univerzalnih prajmera ITS1 i ITS4 koje su dizajnirali **White et al.** (1990). Kao rezultat lanĉane reakcije polimeraze, korišćenjem ovih prajmera, utvrđeno je prisustvo amplifikovanih fragmenata DNK oĉekivane veliĉine 500-600 bp kod svih ispitivanih izolata (Slika 26). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole.



**Slika 26.** Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4. Kolone: M-1 Kbp DNK marker; 1-izolat BPČO; 2-izolat BPZK; 3-izolat KPGG; 4-izolat KPGO; 5-izolat NPSP; 6-izolat NPVI; 7-izolat ŠPIV; 8-izolat TPLČ; 9-izolat TPRŠ; K-negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom).

### 5.10.3. Molekularna identifikacija

Sa ciljem molekularne identifikacije, uspešno je sekvencioniran ITS rDNK genomni region ukupno 18 izolata podeljenih u tri grupe, okarakterisanih na morfološkom nivou i detektovanih primenom Multiplex PCR reakcije. Nakon sekvencioniranja dobijene konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi (Tabela 16). Identifikacija odabranih izolata izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti dobijenih sekvenci međusobno, kao i sa sekvencama drugih izolata ovog roda dostupnih u GenBank bazi podataka.

**Tabela 16.** Izolati *Monilinia* spp. identifikovani tokom istraživanja sa dodeljenim GenBank pristupnim brojevima

<b>Vrsta</b>	<b>Naziv izolata</b>	<b>Biljka domaćin</b>	<b>Gen Bank pristupni broj</b>
<i>M. laxa</i>	<b>BPCO</b>	Breskva	KC515383
	<b>BPZK</b>	Breskva	KC544793
	<b>KPGG</b>	Kajsija	KC544794
	<b>KPGO</b>	Kajsija	KC544795
	<b>NPSV</b>	Nektarina	KC544796
	<b>NPVI</b>	Nektarina	KC544797
	<b>SPIV</b>	Šljiva	KC544798
	<b>TPLC</b>	Trešnja	KC544800
	<b>TPRS</b>	Trešnja	KC544801
	<b>VPJR</b>	Višnja	KC544802
	<b>VPSV</b>	Višnja	KC544803
<i>M. fructigena</i>	<b>BSPBA</b>	Šljiva	KC544804
	<b>SPBA</b>	Šljiva	KC544805
	<b>SPPR</b>	Šljiva	KC544806
	<b>TPGO</b>	Trešnja	KC544807
<i>M. fructicola</i>	<b>NPUD1</b>	Nektarina	KC544808
	<b>NPUD2</b>	Nektarina	KC544809
	<b>NPGM</b>	Nektarina	JX127303

Međusobnim poređenjem 11 sekvenci *M. laxa* dobijenih u ovim istraživanjima (BPCO, BPZK, KPGG, KPGO, NPSP, NPVI, ŠPIV, TPLČ, TPRŠ, VPJR i VPSV) utvrđena je 100% međusobna sličnost 10 izolata, dok se sekvenca označena kao VPSV razlikuje u jednom nukleotidu i sličnost sa ostalim izolatima je 99,8%. Sa druge strane, međusobna identičnost izolata *M. fructigena* (BŠPBA, ŠPBA, ŠPPR i TPGO) i *M. fructicola* (NPGM, NPUD1 i NPUD2) bila je 100%. Između izolata *M. laxa* i *M. fructigena* uočena je razlika u devet nukleotida, odnosno sličnost od 97,9%; između *M. laxa* i *M. fructicola* tri nukleotida odnosno 99,3% identičnosti; između *M. fructigena* i *M. fructicola* 10 nukleotida razlike ili 97,9% identičnosti, što podržava razvrstavanje ovih izolata u različite vrste.

BLAST analiza 11 sekvenci *M. laxa* dobijenih u ovom istraživanju pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama pet izolata vrste *M. laxa* poreklom iz Španije (EF153013, EF153014, EF153015, EF153016 i EF153017). Analiza četiri sekvence *M. fructigena* (BŠPBA, ŠPBA, ŠPPR i TPGO) pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa 16 izolata *M. fructigena* poreklom iz različitih delova sveta: Švajcarske (HQ166347 i EU098121), Španije (EF207429, EF207428, EF207427,

EF207426, EF207425, F207424 i FJ754275), Francuske (AF150680, AF150679, AF150678 i AF150677), Norveške (Z73779 i Z73780) i Kine (HQ908791). BLAST analiza pokazala je da su sekvence izolata NPGM, NPUD1 i NPUD2 100% identične sekvencama osam izolata *M. fructicola* deponovanih u GenBank bazi podataka: iz Srbije (JN176564 sa uskladištenog ploda jabuke), Italije (FJ411109), Španije (EF207423, EF207422, EF207421, EF207420 i EF207419) i Kine (FJ515894).

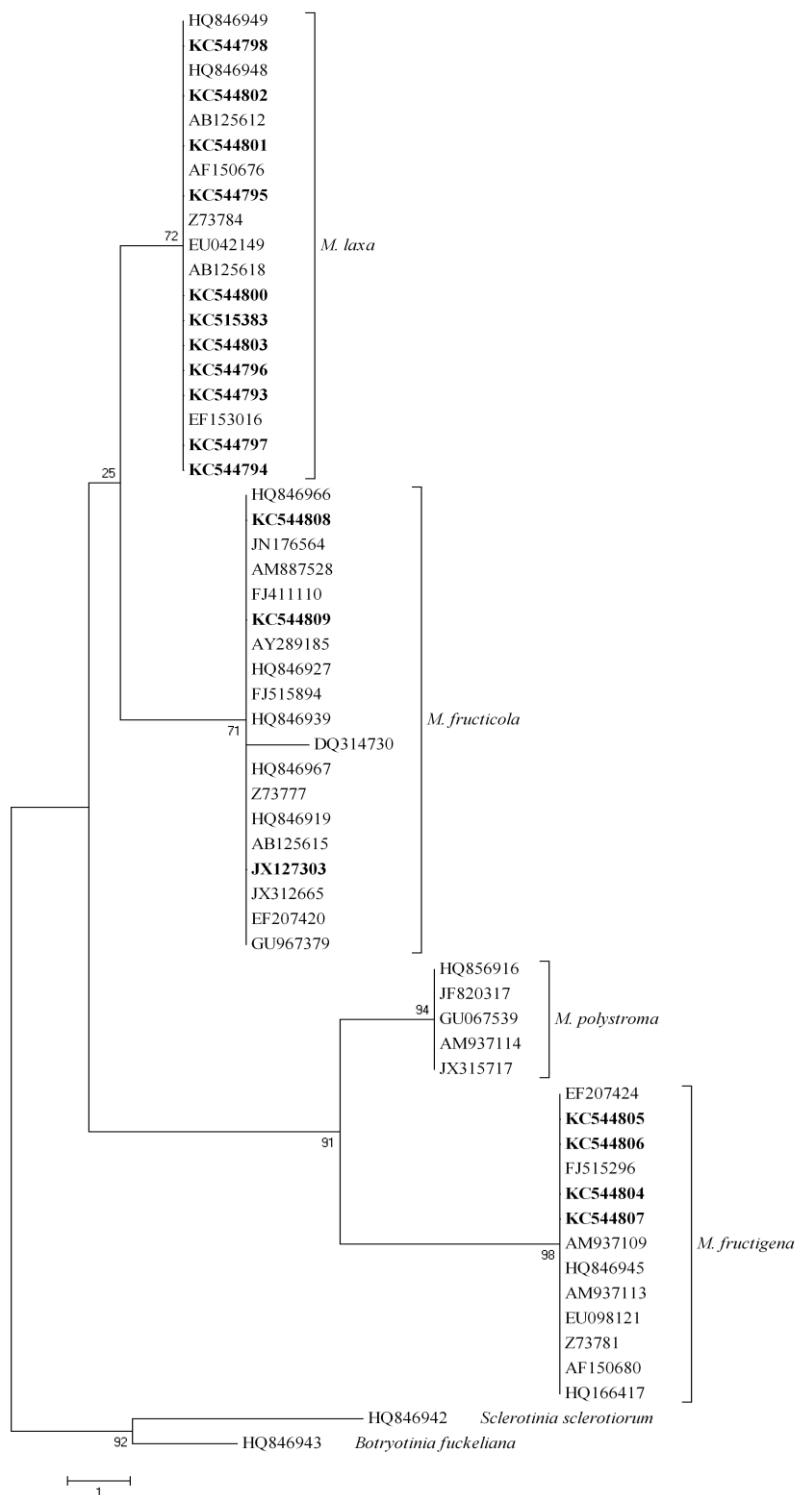
Na osnovu navedenih proračuna genetičke sličnosti odabranih sekvenci, prva grupa od 11 izolata (BPČO, BPZK, KPGG, KPGO, NPSP, NPVI, ŠPIV, TPLČ, TPRŠ, VPJR i VPSV) identifikovana je kao vrsta *M. laxa*, druga grupa (BŠPBA, ŠPBA, ŠPPR i TPGO) kao *M. fructigena*, i treća (NPGM, NPUD1 i NPUD2) kao *M. fructicola*. Dobijeni rezultati u potpunosti su saglasni sa rezultatima dobijenim na osnovu morfoloških karakteristika i molekularne detekcije.

#### 5.10.4. Molekularna karakterizacija

Molekularna karakterizacija ispitivanih izolata obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla korišćenjem delimičnih nukleotidnih sekvenci dobijenih amplifikacijom ITS rDNK genomskog regiona. U ova ispitivanja uključene su sekvence 18 izolata, 11 sekvenci identifikovanih kao *M. laxa* (BPČO, BPZK, KPGG, KPGO, NPSP, NPVI, ŠPIV, TPLČ, TPRŠ, VPJR i VPSV), četiri sekvence *M. fructigena* (BŠPBA, ŠPBA, ŠPPR i TPGO) i tri sekvence *M. fructicola* (NPGM, NPUD1 i NPUD2) poreklom iz Srbije. Dobijene sekvence uparene su sa 38 odabranih sekvenci vrsta roda *Monilinia* dostupnih u GenBank bazi podataka poreklom iz različitih delova sveta. Rekonstruisano je filogenetsko stabalo primenom Maximum Parsimony metode sa bootstrap podrškom u 1000 ponavljanja. Filogenetsko stablo je rutovano sa dve autgrupe, vrstama *Botryotinia fuckeliana* (HQ846943) i *Sclerotinia sclerotiorum* (HQ846942).

Analizom filogenetskog stabla uočena je podela na dva klastera koji se dalje dele na dve podgrupe. U okviru prve podgrupe prvog klastera grupisani su izolati *M. laxa* poreklom iz Amerike (SAD i Čile), Azije (Japan) i Evrope (Francuske, Norveške i Španije), kao i 11 izolata *M. laxa* dobijenih u ovim istraživanjima (BPČO, BPZK, KPGG, KPGO, NPSP, NPVI, ŠPIV, TPLČ, TPRŠ, VPJR i VPSV). Unutar druge

podgrupe prvog klastera nalaze se četiri izolata *M. fructicola* iz Srbije (tri dobijena u ovim istraživanjima - NPGM, NPUD1, NPUD2 i jedan izolat sa uskladištenih plodova jabuke-JN176564), kao i 15 izolata *M. fructicola* poreklom iz Japana, Novog Zelanda, SAD-a, Kanade, Kine, Španije, Norveške, Slovenije, Poljske, Francuske i Italije. U drugom klasteru grupisali su se: u okviru jedne podgrupe izolati *M. polystroma* poreklom iz Mađarske, Poljske, Srbije, Japana i Kine, a u okviru druge podgrupe četiri izolata *M. fructigena* iz Srbije (BŠPBA, ŠPBA, ŠPPR i TPGO) sa devet izolata *M. fructigena* iz evropskih zemalja (Švajcarske, Norveške, Belgije, Velike Britanije, Mađarske, Španije i Francuske) (Slika 27).



**Slika 27.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNK 56 izolata vrsta *Monilinia* spp. korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja. Izolati sa koštičavih voćaka iz Srbije su naznačeni

### 5.10.5. SSR marker analiza izolata *Monilinia fructicola* poreklom iz Srbije

U okviru ove disertacije određeni su mikrosatelitni SSR markeri za tri izolata *M. fructicola* poreklom iz Srbije. U ispitivanjima korišćeni su prajmeri koji umnožavaju alelne oblike različitih dužina izolata *M. fructicola* i to: CHML5 (umnožava jedan alelni oblik dužine 220 bp), CHMFc1 (umnožava tri alelna oblika dužine 169, 173 i 176 bp), CHMFc4 (umnožava dva alelna oblika dužine 216 i 223 bp) i CHMFc 5 (umnožava jedan alelni oblik od 160 bp). Kao marker koji detektuje najviše alelnih oblika izdvojio se CHMFc1 (sa identifikovanih 30 alelnih oblika različite dužine), dok je marker sa najmanje detektovanih alelnih oblika CHMF12 (sa jednim alelnim oblikom dužine 160 bp). Prajmeri CHML5, CHMFc4 i CHMFc 5 detektuju pet, četiri i pet različita alelna oblika.

Analiza SSR markera izolata *M. fructicola* poreklom iz Srbije pokazala je da se izolati razlikuju po dužini alela koje amplifikuje marker CHMFc4, da izolati poreklom sa jednog lokaliteta (NPUD 1 i NPUD2) imaju alelni oblik dužine 216 bp, dok izolat poreklom sa drugog lokaliteta (NPGM) ima alelni oblik dužine 223 bp (Tabela 17). Izolat NPGM ima identičan profil kao izolati *M. fructicola* iz Italije koji su specifični samo za to područje, dok izolati NPUD1 i NPUD2 imaju profil kao i izolati poreklom iz SAD koji su osim u SAD detektovani i u izolatima poreklom iz Italije.

**Tabela 17.** Prikaz dobijenih alelnih oblika (bp) umnoženih pomoću SSR markera i dobijeni profili haplotipova prema nomenklaturi **Jansch et al. (2012)**

Izolat	CHMFc5	CHMFc1	CHMFc4	CHML5	CHMFc12	Profil prema nomenklaturi Jansch et al. (2012)
<b>NPUD1</b>	86 bp	173 bp	216 bp	220 bp	160 bp	US50
<b>NPUD2</b>	86 bp	173 bp	216 bp	220 bp	160 bp	US50
<b>NPGM</b>	86 bp	173 bp	223 bp	220 bp	160 bp	ITA01

### 5.11. Utvrđivanje nivoa osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na fungicide

Ispitivanja osetljivosti na fungicide uključila su proučavanje delovanja sedam komercijalnih formulacija fungicida (tebukonazol, iprodion, hlorotalonil, boskalid, fluopiram, azoksistrobin i prochloraz) na porast 14 odabranih izolata *Monilinia* spp. Izolati su ispoljili različitu osetljivost na ispitivane fungicide.

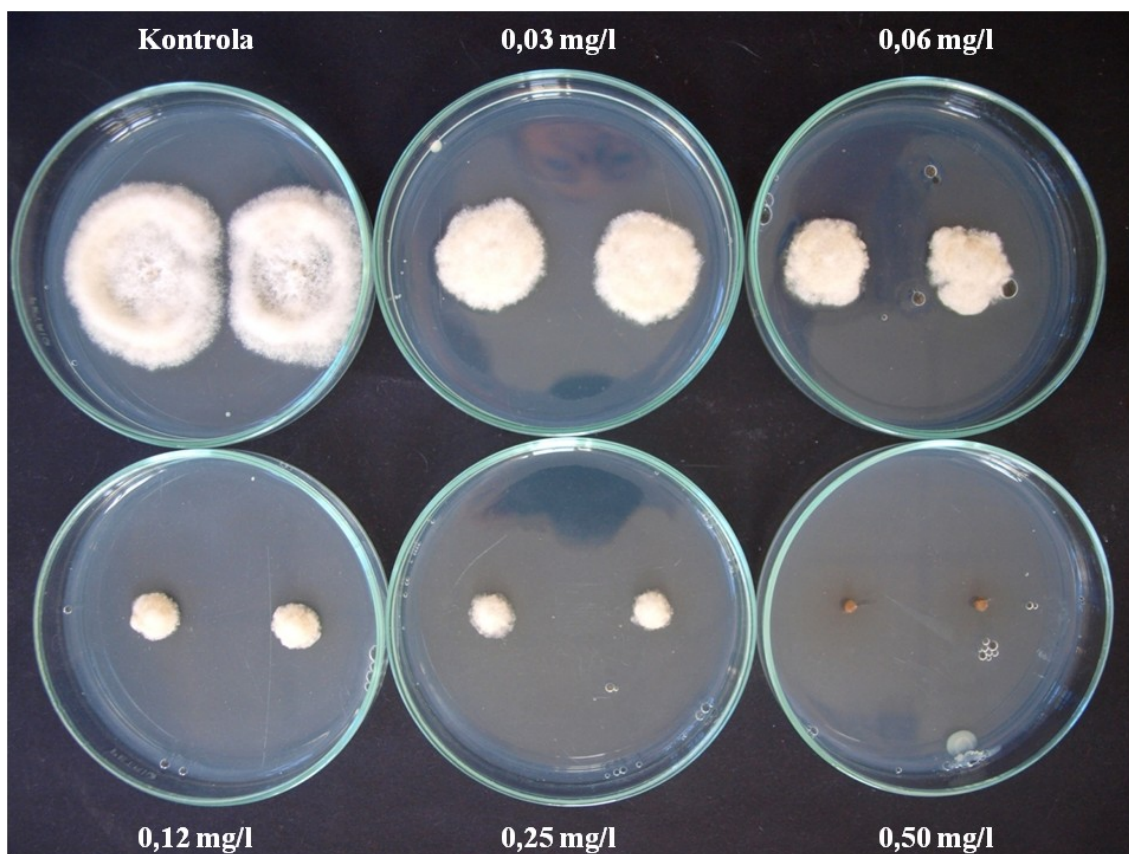


**Tebukonazol.** Vrednosti parametara osetljivosti ( $EC_{50}$  vrednosti i nagib regresione linije b) izolata *Monilinia* spp. na tebukonazol prikazane su u Tabeli 18. Izolati sve tri ispitivane vrste ispoljili su ujednačenu osetljivost na tebukonazol u niskim koncentracijama.  $EC_{50}$  vrednosti su bile u intervalu od 0,01 mg/l (izolat BMLEs, *M. laxa*) do 0,06 mg/l (izolat NPGM, *M. fructicola*) (Slika 28).

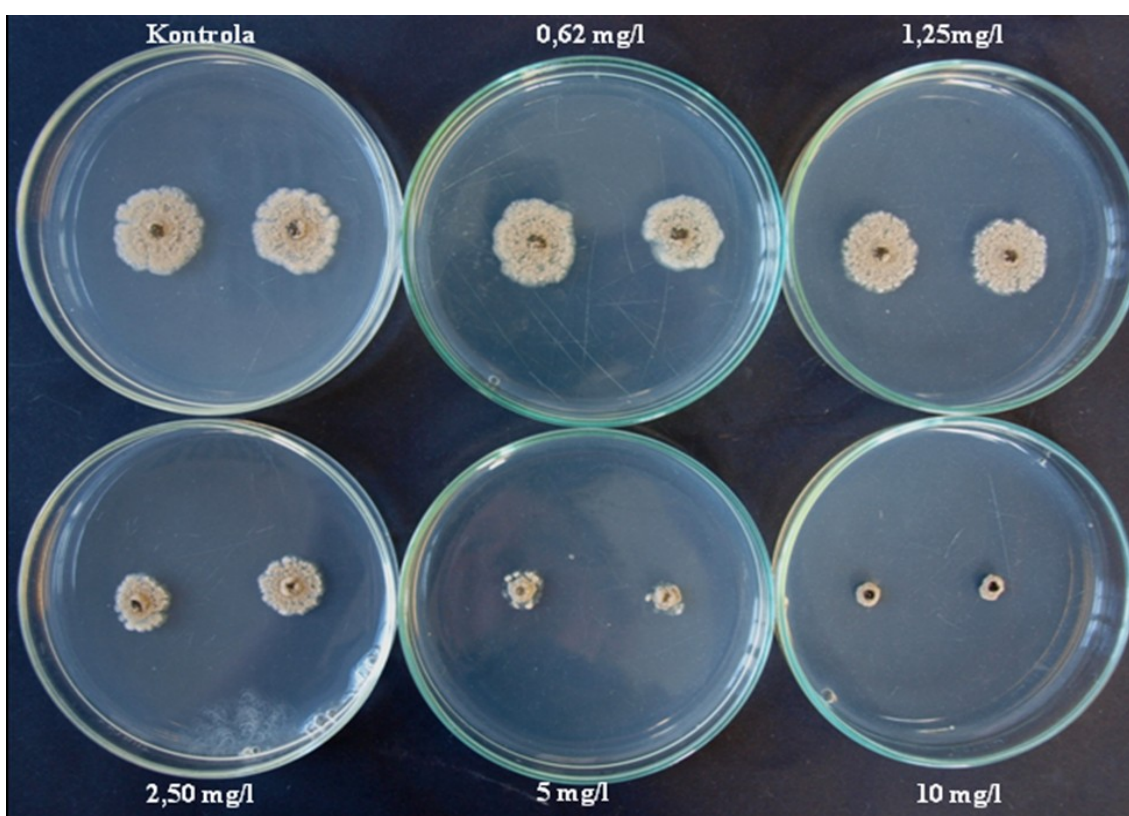
**Tabela 18.** Osetljivost izolata *Monilinia* spp. na tebukonazol

Vrsta	Izolat	$EC_{50}$ (mg/l)	b*
<i>M. laxa</i>	TPBN	0,02 (0,013-0,023)	1,11 ± 0,20
	TPAL	0,01 (0,007-0,015)	1,00 ± 0,20
	TPGR	0,01 (0,008-0,013)	1,33 ± 0,20
	VGRSD	0,02 (0,014-0,025)	1,05 ± 0,19
	NPFG	0,01 (0,009-0,015)	1,40 ± 0,020
	VPRA	0,02 (0,015-0,024)	1,67 ± 0,21
	ŠMLE	0,02 (0,013-0,003)	0,91 ± 0,19
	ŠLJSV	0,02 (0,014-0,022)	1,32 ± 0,32
	ŠMLEs	0,01 (0,008-0,016)	1,70 ± 0,33
	BPSV	0,02 (0,017-0,036)	0,90 ± 0,19
	BMLEs	0,01 (0,006-0,013)	1,06 ± 0,20
	BPBN	0,04 (0,027-0,063)	1,06 ± 0,20
<i>M. fructigena</i>	VPBG	0,05 (0,040-0,067)	1,37 ± 0,15
<i>M. fructicola</i>	NPGM	0,06 (0,049-0,078)	1,40 ± 0,14

\* nagib regresione linije



Slika. 28. *Monilinia fructigena*: Osetljivost izolata VPBG na tebukonazol



Slika 29. *Monilinia fructicola*: Osetljivost izolata NPGM na iprodion

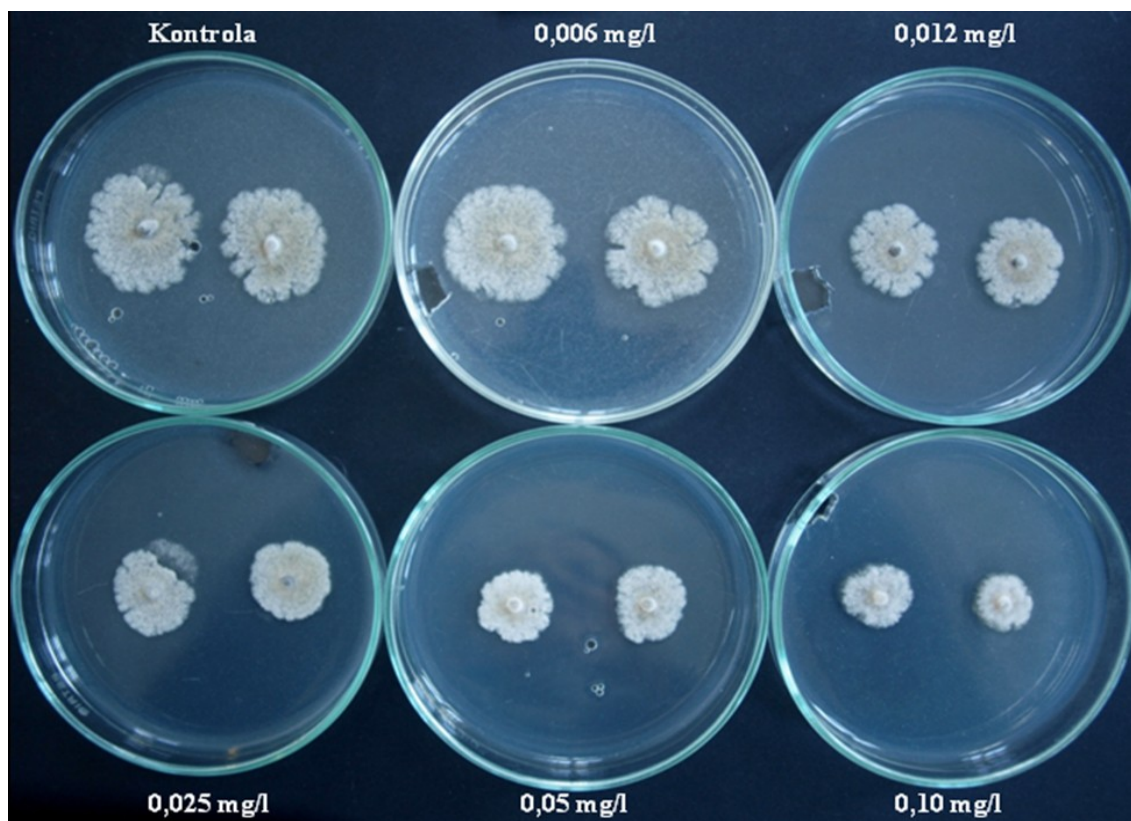
**Iprodion.** Vrednosti parametara osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na iprodion prikazane su u Tabeli 19. Najniža EC<sub>50</sub> vrednost od 0,13 mg/l zabeležena je za izolat TPAL (*M. laxa*). Sličnu osetljivost ispoljili su i ostali ispitivani izolati vrste *M. laxa*. Izolat vrste *M. fructigena* ispoljio je nešto niži stepen osetljivosti na iprodion (EC<sub>50</sub> vrednost 0,85 mg/l), dok je najmanje osetljiv bio predstavnik vrste *M. fructicola*, izolat NPGM poreklom sa nektarine, za koji je EC<sub>50</sub> vrednost iznosila 3,32 mg/l (Slika 29). Na osnovu nepreklapanja intervala poverenja za EC<sub>50</sub> vrednosti razlika u osetljivosti različitih vrsta roda *Monilinia* na iprodion bila je statistički značajna.

**Tabela 19.** Osetljivost izolata *Monilinia* spp. na iprodion

Vrsta	Izolat	EC <sub>50</sub> (mg/l)	b*
<i>M. laxa</i>	TPBN	0,14 (0,113-0,163)	1,46 ± 0,15
	TPAL	0,13 (0,110-0,158)	1,54 ± 0,15
	TPGR	0,17 (0,148-0,211)	1,64 ± 0,15
	VGRSD	0,14 (0,115-0,174)	1,33 ± 0,15
	NPFG	0,20 (0,118-0,509)	1,28 ± 0,15
	VPRA	0,20 (0,173-0,229)	2,23 ± 0,18
	ŠMLE	0,22 (0,185-0,257)	1,93 ± 0,17
	ŠLJSV	0,17 (0,141-0,201)	1,64 ± 0,15
	ŠMLEs	0,17 (0,147-0,203)	1,79 ± 0,16
	BPSV	0,16 (0,136-0,202)	1,45 ± 0,15
	BMLEs	0,17 (0,141-0,203)	1,58 ± 0,15
	BPBN	0,15 (0,126-0,185)	1,45 ± 0,15
<i>M. fructigena</i>	VPBG	0,85 (0,160-1,380)	1,01 ± 0,31
<i>M. fructicola</i>	NPGM	3,32 (2,730-4,120)	1,38 ± 0,15

\* nagib regresione linije

**Boskalid.** Vrednosti parametara osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na boskalid prikazane su u Tabeli 20. Izolati proučavanih vrsta ispoljili su velike razlike u osetljivosti na boskalid. Izolati vrste *M. laxa* ispoljili su ujednačenu osetljivost sa EC<sub>50</sub> vrednostima u intervalu od 0,04 mg/l za izolat ŠMLE do 0,09 mg/l za izolat BPBN (Slika 30). Sa druge strane, izolati vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola* ispoljili su statistički značajno nižu osetljivost na ovaj fungicid. Za izolat VPBG (*M. fructigena*) EC<sub>50</sub> vrednost iznosila je 250,36 mg/l, a za najmanje osetljiv izolat *M. fructicola*, NPGM, na ovaj fungicid bila je 464 mg/l.

Slika 30. *Monilinia laxa*: Osetljivost izolata TPGR na boskalidTabela 20. Osetljivost izolata *Monilinia* spp. na boskalid

Vrsta	Izolat	EC <sub>50</sub> (mg/l)	b*
<i>M. laxa</i>	TPBN	0,06 (0,047-0,095)	1,03 ± 0,15
	TPAL	0,05 (0,043-0,074)	1,24 ± 0,15
	TPGR	0,07 (0,053-0,117)	1,02 ± 0,15
	VGRSD	0,05 (0,041-0,076)	1,09 ± 0,15
	NPFG	0,06 (0,048-0,116)	0,88 ± 0,14
	VPRA	0,06 (0,044-0,103)	0,88 ± 0,14
	ŠMLE	0,04 (0,036-0,060)	1,23 ± 0,15
	ŠLJSV	0,05 (0,042-0,073)	1,23 ± 0,15
	ŠMLEs	0,05 (0,039-0,065)	1,28 ± 0,15
	BPSV	0,06 (0,047-0,082)	1,26 ± 0,15
	BMLEs	0,05 (0,041-0,083)	0,98 ± 0,14
	BPBN	0,09 (0,065-0,156)	1,05 ± 0,15
	<i>M. fructigena</i>	VPBG	250,36 (139,66- 565,22)
<i>M. fructicola</i>	NPGM	464 (no) <sup>1</sup>	0,78 ± 0,27

<sup>1</sup>no-nije određeno zbog heterogenosti odgovora u svim ponavljanjima

\* nagib regresione linije

**Hlorotalonil.** Vrednosti parametara osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na hlorotalonil prikazane su u Tabeli 21. Izolati *M. laxa* ispoljili su neznatne razlike u osetljivosti na hlorotalonil: dobijene EC<sub>50</sub> vrednosti bile su u rasponu od 0,12 mg/l za

izolat BPSV do 0,15 mg/l za izolat ŠLJSV. Slična osetljivost zabeležena je i za *M. fructigena* (EC<sub>50</sub> - 0,23 mg/l), dok je statistički značajno manje osetljiv bio izolat NPGM *M. fructicola* sa EC<sub>50</sub> vrednošću od 1,06 mg/l.

**Tabela 21.** Osetljivost izolata *Monilinia* spp. na hlorotalonil

Vrsta	Izolat	EC <sub>50</sub> (mg/l)	b*
<i>M. laxa</i>	TPBN	0,25 (0,205-0,324)	1,44 ± 0,20
	TPAL	0,26 (0,206-0,355)	1,26 ± 0,20
	TPGR	0,19 (0,159-0,233)	1,60 ± 0,20
	VGRSD	0,23 (0,187-0,304)	1,33 ± 0,20
	NPFG	0,23 (0,191-0,282)	1,65 ± 0,21
	VPRA	0,21 (0,183-0,247)	2,14 ± 0,22
	ŠMLE	0,19 (0,158-0,223)	1,80 ± 0,21
	ŠLJSV	0,19 (0,162-0,221)	2,51 ± 0,33
	ŠMLEs	0,25 (0,210-0,310)	1,71 ± 0,21
	BPSV	0,12 (0,096-0,149)	1,53 ± 0,20
	BMLEs	0,15 (0,117-0,184)	1,40 ± 0,20
	BPBN	0,18 (0,144-0,219)	1,46 ± 0,20
	<i>M. fructigena</i>	VPBG	0,23 (0,200-0,260)
<i>M. fructicola</i>	NPGM	1,06 (0,830-1,480)	1,20 ± 0,20

\* nagib regresione linije

**Fluopiram.** Osetljivost izolata *Monilinia* spp. na fluopiram prikazana je u Tabeli 22. Utvrđene su velike razlike u osetljivosti na fluopiram, kako među izolatima različitih vrsta, tako i među izolatima iste vrste. Najniža EC<sub>50</sub> vrednost od 0,11 mg/l zabeležena je za izolat VGRSD (*M. laxa*), dok je najviša EC<sub>50</sub> vrednost zabeležena za izolat *M. fructigena*, VPBG (5612,28 mg/l). Razlika u osetljivosti različitih vrsta roda *Monilinia* na fluopiram bila je statistički značajna.

Tabela 22. Osetljivost izolata *Monilinia* spp. na fluopiram

Vrsta	Izolat	EC <sub>50</sub> (mg/l)	b*
<i>M. laxa</i>	TPBN	0,25 (0,169-0,339)	0,74 ± 0,10
	TPAL	0,21 (0,122-0,321)	0,57 ± 0,10
	TPGR	0,21 (0,109-0,338)	0,50 ± 0,10
	VGRSD	0,11 (0,089-0,129)	1,90 ± 0,18
	NPFG	10,78 (4,04-92,88)	0,59 ± 0,12
	VPRA	2,99 (1,65-8,90)	0,65 ± 0,11
	ŠMLE	1,97 (1,03-7,67)	0,48 ± 0,10
	ŠLJSV	1,04 (0,67-2,13)	0,59 ± 0,10
	ŠMLEs	0,30 (0,222-0,399)	0,85 ± 0,11
	BPSV	0,39 (0,269-0,568)	0,66 ± 0,10
	BMLEs	1,23 (0,76-2,78)	0,57 ± 0,10
	BPBN	0,67 (0,468-1,060)	0,69 ± 0,10
	<i>M. fructigena</i>	VPBG	5612,28 (1093 - 8722)
<i>M. fructicola</i>	NPGM	386,56 (297,32-534,10)	1,01 ± 0,14

\* nagib regresione linije

**Prohloraz.** Izolati *Monilinia* spp. ispoljili su visoku osetljivost na prohloraz (Tabela 23). Najniža EC<sub>50</sub> vrednost zabeležena je za izolate ŠLJSV (*M. laxa*) i NPGM (*M. fructicola*) od 0,006 mg/l, dok je najnižu osetljivost ispoljio izolat VPBG (*M. fructigena*) sa EC<sub>50</sub> vrednošću od 0,023 mg/l.

Tabela 23. Osetljivost izolata *Monilinia* spp. na prohloraz

Vrsta	Izolat	EC <sub>50</sub> (mg/l)	b*
<i>M. laxa</i>	TPBN	0,010 (0,009-0,012)	2,16 ± 0,17
	TPAL	0,008 (0,007-0,009)	1,77 ± 0,16
	TPGR	0,008 (0,007-0,010)	1,64 ± 0,15
	VGRSD	0,013 (0,011-0,015)	2,01 ± 0,16
	NPFG	0,008 (0,007-0,010)	1,95 ± 0,16
	VPRA	0,011 (0,093-0,123)	2,13 ± 0,17
	ŠMLE	0,011 (0,009-0,013)	1,88 ± 0,17
	ŠPBN	0,008 (0,007-0,009)	1,82 ± 0,16
	ŠLJSV	0,006 (0,005-0,007)	2,09 ± 0,22
	ŠMLEs	0,007 (0,006-0,009)	1,72 ± 0,16
	BPSV	0,011 (0,009-0,013)	1,87 ± 0,16
	BMLEs	0,011 (0,009-0,012)	2,19 ± 0,17
	BPBN	0,011 (0,009-0,013)	1,45 ± 0,15
	<i>M. fructigena</i>	VPBG	0,023 (0,019-0,028)
<i>M. fructicola</i>	NPGM	0,006 (0,005-0,008)	1,63 ± 0,16

\* nagib regresione linije

**Azoksistrobin.** Ispitivanju osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na azoksistrobin prethodilo je ispitivanje osetljivosti izolata na SHAM sa ciljem određivanja najviše

koncentracije koja ne utiče inhibitorno na porast izolata. Kao radna koncentracija SHAM-a za mešanje sa azoksistrobinom za sve ispitivane izolate korišćena je koncentracija od 0,1 mg/l.

Parametri osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na azoksistrobin prikazani su u Tabeli 24. Svi ispitivani izolati bili su osetljivi na azoksistrobin u prisustvu SHAM-a. Najniža EC<sub>50</sub> vrednost od 0,51 mg/l zabeležena je za izolat ŠLJSV (*M. laxa*), dok je najviša EC<sub>50</sub> vrednost utvrđena za izolat NPGM, *M. fructicola* (8,83 mg/l).

**Tabela 24.** Osetljivost izolata *Monilinia* spp. na azoksistrobin

Vrsta	Izolat	EC <sub>50</sub> (mg/l)	b*
<i>M. laxa</i>	TPBN	0,98 (0,545-1,810)	0,47 ± 0,05
	TPAL	1,12 (0,512-2,920)	0,36 ± 0,04
	TPGR	0,78 (0,473-1,340)	0,51 ± 0,04
	VGRSD	1,01 (0,596-1,770)	0,51 ± 0,06
	NPFG	2,38 (1,340-4,840)	0,48 ± 0,06
	VPRA	0,69 (0,410-1,230)	0,48 ± 0,04
	ŠMLE	1,55 (0,890-2,920)	0,49 ± 0,06
	ŠLJSV	0,51 (0,320-0,800)	0,62 ± 0,06
	ŠMLEs	0,95 (0,500-2,000)	0,39 ± 0,04
	BPSV	3,35 (1,790-7,330)	0,45 ± 0,04
	BMLEs	1,36 (0,310-18,800)	0,40 ± 0,04
	BPBN	1,44 (0,610- 2,220)	0,29 ± 0,04
<i>M. fructigena</i>	VPBG	5,87 (4,430-8,390)	1,08 ± 0,12
<i>M. fructicola</i>	NPGM	8,83 (5,880-12,980)	0,69 ± 0,09

\* nagib regresione linije

### 5.12. Određivanje minimalne fungistatične i minimalne letalne koncentracije fungicida na izolate *Monilinia* spp.

Minimalne fungistatične i minimalne letalne koncentracije proučavanih fungicida za tri odabrana izolata *Monilinia* spp., predstavnika sve tri vrste, prikazane su u Tabeli 25. Sva tri izolata bila su veoma osetljiva na tebukonazol i prochloraz koji su pri vrlo niskim koncentracijama (od 0,5 do 2 mg/l) ispoljili letalni efekat. U ovom eksperimentu najosetljiviji je bio izolat TPGR, predstavnik vrste *M. laxa*. Za hlorotalonil, boskalid, fluopiram i azoksistrobin zabeležene su minimalne letalne koncentracije veće od 1000 mg/l za predstavnike sve tri vrste roda *Monilinia*.

**Tabela 25.** Prikaz minimalnih fungistatičnih (MFC) i minimalnih letalnih (MLC) koncentracija fungicida na odabrane izolate *Monilinia* spp.

	<i>M. laxa</i>		<i>M. fructigena</i>		<i>M. fructicola</i>	
	MFC*	MLC*	MFC	MLC	MFC	MLC
<b>Tebukonazol</b>	0,25	0,5	1	1	1	1
<b>Iprodion</b>	5	10	50	>1000	20	500
<b>Hlorotalonil</b>	5	>1000	7,5	>1000	>1000	>1000
<b>Boskalid</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>Fluopiram</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>Prothoraz</b>	0,5	0,5	0,5	1	0,5	2
<b>Azoksistrobin</b>	25	>1000	500	>1000	>1000	>1000

\* mg/l

### 5.13. Utvrđivanje antifungalnog uticaja etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp.

U okviru utvrđivanja antifungalnog uticaja etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp. u početnim fazama istraživanja ispitan je *in vitro* efekat gasovite faze 56 etarskih ulja i određen je minimalan period ekspozicije za šest odabranih ulja. Na osnovu dobijenih rezultata odabrana su dva etarska ulja, ulje timijana i origana za koje je razvijena formulacija i ispitan *in vitro* i *in vivo* efekat formulisanih preparata na odabrane izolate, predstavnike tri vrste roda *Monilinia*.

#### 5.13.1. *In vitro* efekat gasovite faze etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp.

U Tabeli 26 prikazani su rezultati ispitivanja *in vitro* efekta gasovite faze 56 etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp. Od proučavanih etarskih ulja, 32 ulja nisu potpuno zaustavila porast micelije izolata pri najvišoj korišćenoj koncentraciji od 0,16 µl/ml vazduha. Za 24 ulja utvrđene su MFC i MLC vrednosti u intervalu 0,02-0,16 µl/ml vazduha. Najveću toksičnost za izolate sve tri vrste ispoljilo je sedam ulja - različita ulja origana, ulje timijana i limunove trave, sa vrednošću MLC 0,02-0,04 µl/ml vazduha. Za ulja označena kao Origano B i Origano E zabeležena je najniža vrednost MLC od 0,02 µl/ml vazduha za sve tri vrste roda *Monilinia*. Izolati različitih vrsta roda *Monilinia* nisu ispoljili razliku u osetljivosti na gasovitu fazu etarskih ulja.



Tabela 26. *In vitro* efekat gasovite faze etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp.

Etarska ulja	<i>M. laxa</i>			<i>M. fructigena</i>			<i>M. fructicola</i>		
	MFC	MLC	MLC	MFC	MLC	MLC	MFC	MLC	MLC
Geranijum A	0,04	0,16	0,16	0,04	>0,16	>0,16	0,04	>0,16	>0,16
Geranijum B	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Kamilica	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Anis A	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Anis B	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Turpentin	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Bosiljak	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Nana	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Limunova trava	0,04	0,04	0,04	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Cimet A	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Cimet B	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Beli bor	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Karanfilić	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Kleka A	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Kleka B	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Pomorandža	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Eukaliptus	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Ruzmarin	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Ruta montana</i>	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Lovor	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Čajno drvo A	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Čajno drvo B	0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Leptospermum scoparium</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Kim	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Koriander	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Kamfor	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Sandal	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Kari	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Etarska ulja	MFC	MLC	MLC	MFC	MLC	MLC	MFC	MLC	MLC
Mirodija A	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Mirodija B	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Mirodija C	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Mirodija D	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Origano A	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04
Origano B	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Origano C	0,02	0,04	0,04	0,02	0,04	0,04	0,02	0,04	0,04
Origano D	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02	0,04	0,02
Origano F	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Morač A	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Morač B	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Morač C	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Morač D	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Morač E	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16	0,16	>0,16	>0,16
Lavanda A	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Lavanda B	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Lavanda C	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Lavanda D	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Lavanda E	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Lavanda F	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Žalfija A	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Žalfija B	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Žalfija C	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Žalfija D	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Žalfija E	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Žalfija F	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Salvia sclarea</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
Timijan	0,02	0,04	0,04	0,02	0,04	0,04	0,02	0,04	0,04

### 5.13.2. Određivanje minimalnog perioda ekspozicije

Na osnovu rezultata prikazanih u prethodnom poglavlju, šest etarskih ulja (četiri ulja origana, ulje timijana i ulje limunove trave) za koja su određene najniže vrednosti MLC odabrano je za utvrđivanje minimalnog perioda ekspozicije za postizanje letalnog efekta (MPE) (Tabela 27). Za sva ispitivana ulja pri najvišoj koncentraciji od 0,08  $\mu\text{l/ml}$  vazduha MPE bio je jedan dan. Međutim, za najnižu ispitivanu koncentraciju od 0,02  $\mu\text{l/ml}$  vazduha MPE od jednog dana zabeležen je samo za ulje Origano E za izolat *M. fructigena*, dok je za ostale vrste taj period iznosio četiri dana. Za vrste *M. laxa* i *M. fructicola* minimalan period ekspozicije od dva dana pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 0,02  $\mu\text{l/ml}$  vazduha zabeležen je za ulje Origano D.

**Tabela 27.** Prikaz rezultata utvrđivanja minimalnog perioda ekspozicije (MPE) izolata *Monilinia* spp. za različita etarska ulja

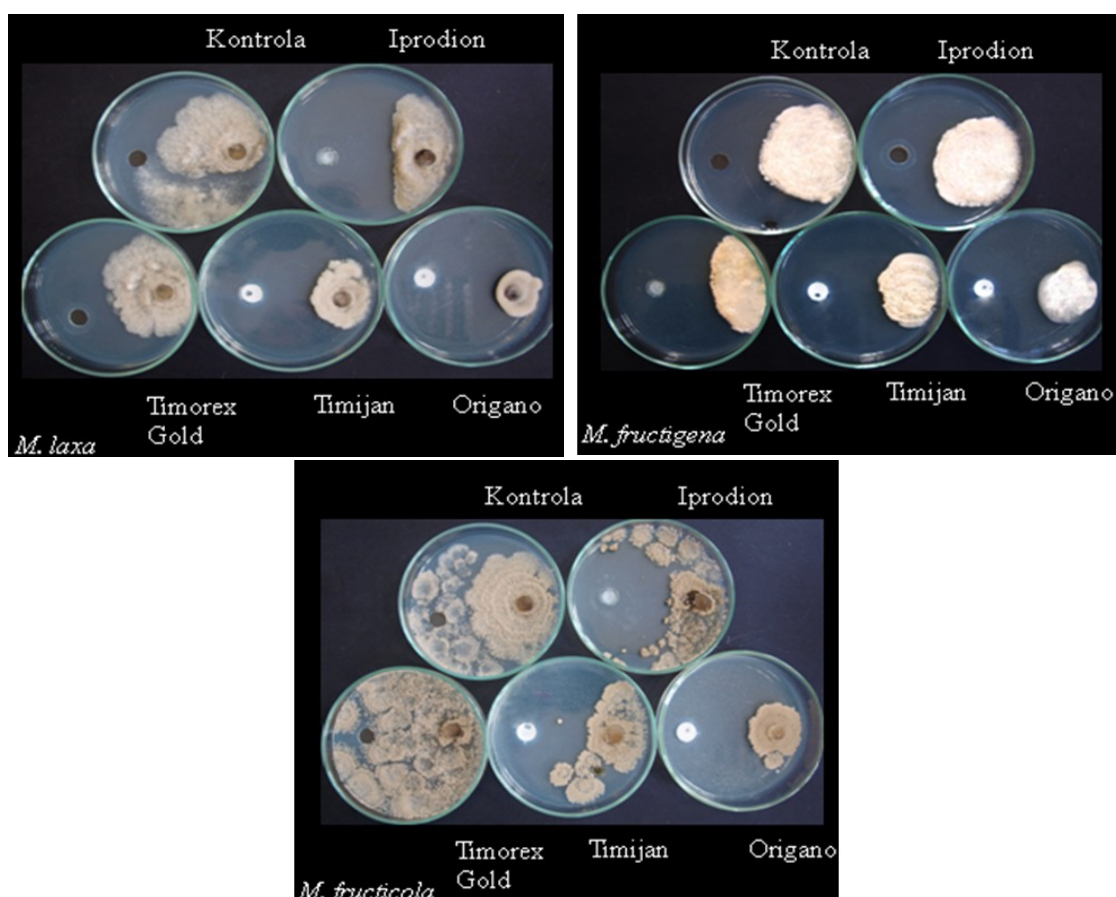
Koncentracija ( $\mu\text{l/ml}$ vazduha)	Minimalni period ekspozicije (dani)								
	<i>M. laxa</i>			<i>M. fructigena</i>			<i>M. fructicola</i>		
	0,08	0,04	0,02	0,08	0,04	0,02	0,08	0,04	0,02
<b>Origano A</b>	1	3	3	1	3	3	1	3	4
<b>Origano C</b>	1	1	>7	1	1	4	1	2	>7
<b>Origano D</b>	1	2	2	1	2	>7	1	2	2
<b>Origano E</b>	1	1	4	1	1	1	1	1	4
<b>Timijan</b>	1	2	4	1	2	>7	1	2	>7
<b>Limunova trava</b>	1	3	>7	1	3	>7	1	3	>7

### 5.13.3. Proces formulacije etarskih ulja origana i timijana

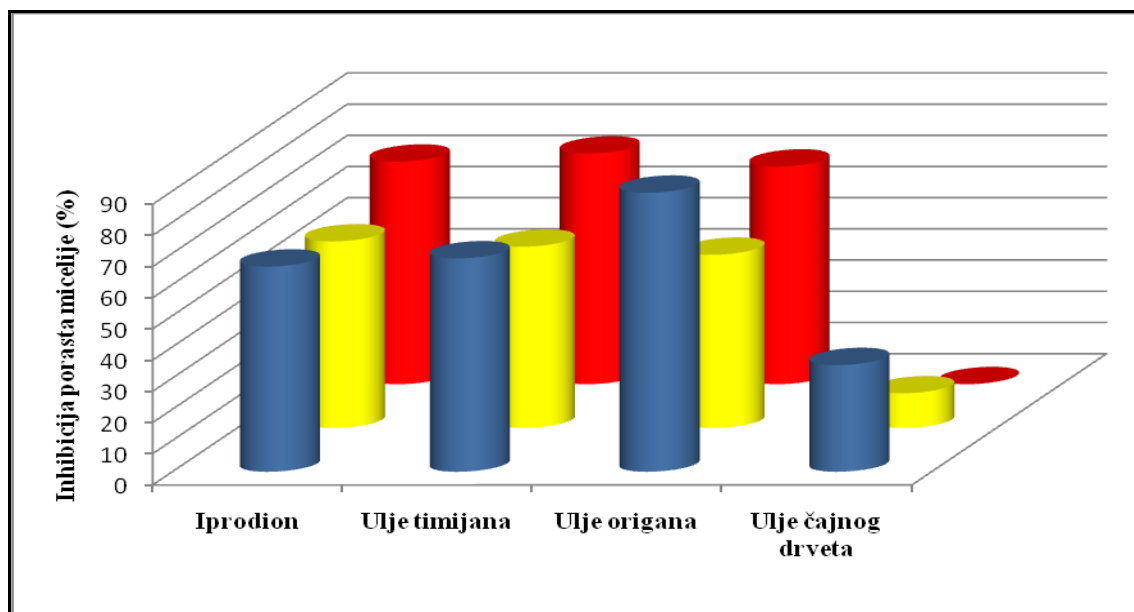
Rezultati ispitivanja *in vitro* efekta gasovite faze etarskih ulja i određivanja MFC, MLC i MPE pokazali su da ulja origana i timijana ispoljavaju snažnu antimikrobu aktivnost prema izolatima *Monilinia* spp. i odličan potencijal da postanu aktivna materija formulisanog preparata. Za ova istraživanja odabrano je po jedno ulje timijana i origana.

#### 5.13.4. *In vitro* efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate *Monilinia* spp.

*In vitro* efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana u poređenju sa standardnim fungicidom na bazi iprodiona i komercijalnim preparatom na bazi etarskog ulja čajnog drveta prikazan je na Grafikonu 8. Formulisana ulja timijana i origana ispoljila su statistički značajno bolji efekat u odnosu na komercijalno dostupan biofungicid ( $P < 0,01$ ). U poređenju sa standardnim fungicidom, formulisani preparati ispoljili su podjednako dobar efekat inhibicije porasta micelije sva tri odabrana izolata, sve tri ispitivane vrste roda *Monilinia*. Procenat inhibicije porasta izolata primenom formulisanog preparata na bazi timijana bio je u intervalu od 58 do 73%, a formulisanog preparata na bazi ulja origana od 55 do 89%, dok je procenat inhibicije porasta pri primeni komercijalnog preparata Timorex Gold bio od 0 do 34% (Slika 31).



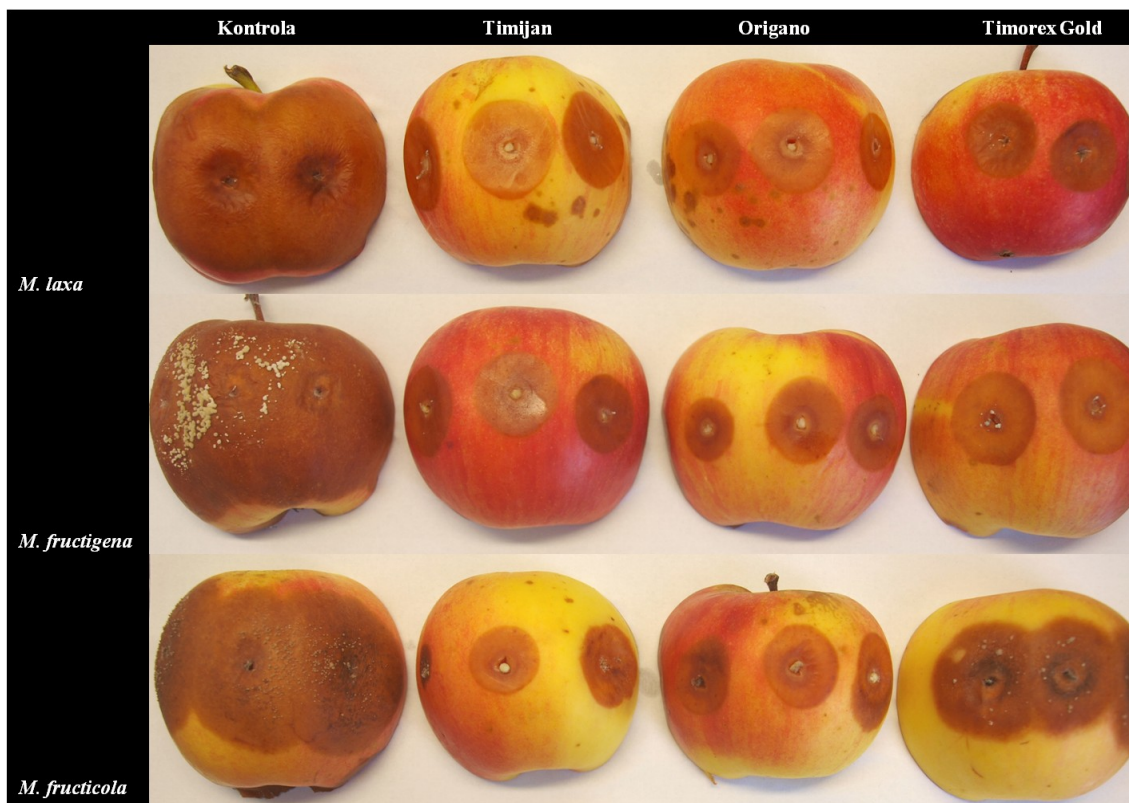
**Slika 31.** *In vitro* efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate *Monilinia* spp.



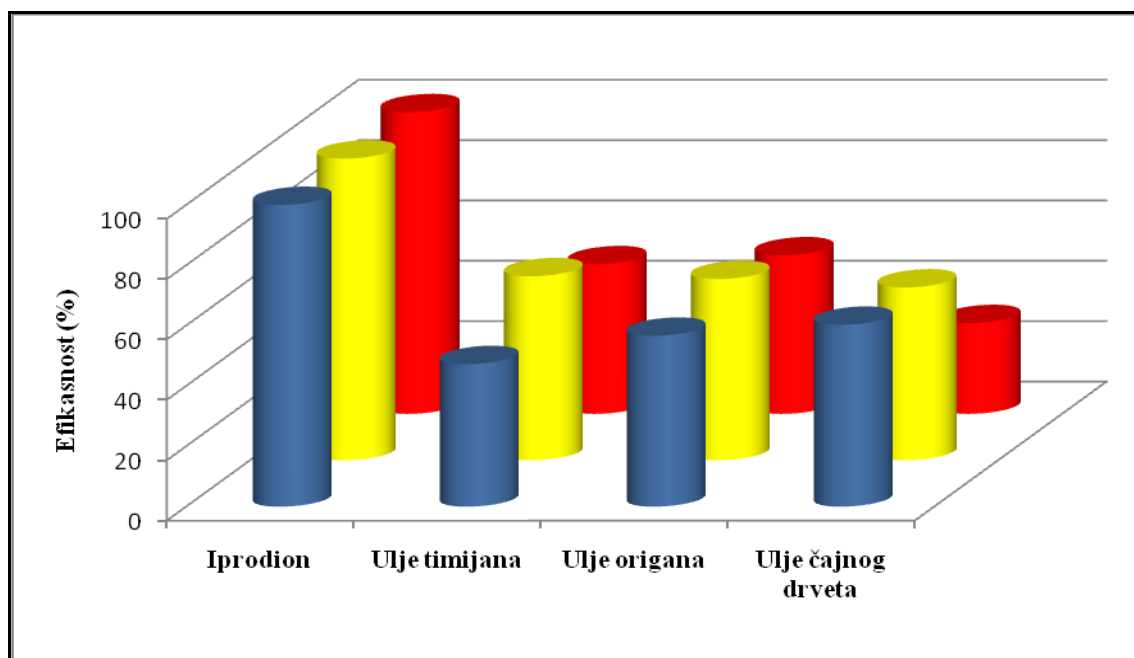
**Grafikon 8.** *In vitro* efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate *Monilinia* spp. ■ *M. laxa* ■ *M. fructigena* ■ *M. fructicola*

#### 5.13.5. *In vivo* efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate *Monilinia* spp.

Rezultati ispitivanja efekta formulisanih etarskih ulja origana i timijana u *in vivo* uslovima prikazani su na Grafikonu 9. Testovi su pokazali da postoji statistički značajna razlika između primenjenih tretmana ( $P < 0,01$ ), da ispitivane formulacije ostvaruju zaštitu plodova jabuke od vrsta roda *Monilinia* na istom nivou kao i komercijalni preparat Timorex Gold, a znatno slabiju od standardnog preparata na bazi iprodiona. U *in vivo* testovima procenti inhibicije pri primeni različitih preparata bili su u intervalu od 47 do 61% za formulisano ulje timijana, od 52 do 60% za formulisano ulje origana i od 30 do 60% za preparat Timorex Gold (Slika 32).



Slika 32. *In vivo* efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate *Monilinia* spp.



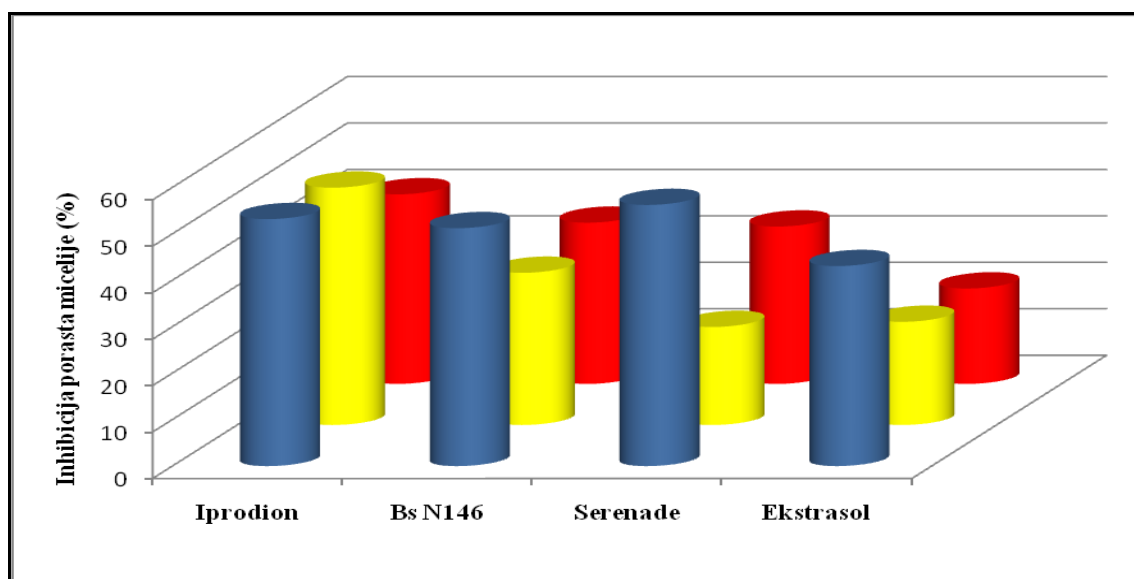
Grafikon 9. *In vivo* efekat formulisanih etarskih ulja origana i timijana na izolate *Monilinia* spp. ■ *M. laxa* ■ *M. fructigena* ■ *M. fructicola*

#### 5.14. Utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp.

U okviru utvrđivanja uticaja bakterije *B. subtilis* ispitan je *in vitro* i *in vivo* uticaj različitih sojeva bakterije na tri izolata, predstavnika vrsta roda *Monilinia*. Takođe, razvijena je formulacija preparata na bazi *B. subtilis* N146 i ispitan je efekat formulisanog preparata u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

##### 5.14.1. *In vitro* utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp.

Rezultati ispitivanja uticaja različitih sojeva bakterije *B. subtilis* na izolate *Monilinia* spp. u *in vitro* uslovima prikazani su na Grafikonu 10. Uočena je statistički značajna razlika u procentu inhibicije porasta izolata nastala kao posledica različitih tretmana ( $P < 0,01$ ). Najveći procenat inhibicije dobijen je primenom suspenzije *B. subtilis* N146, osim u slučaju izolata *M. laxa* gde je najveću inhibiciju porasta izazvao *B. subtilis* iz preparata Serenade. Procenti inhibicije porasta izolata bili su u intervalu od 33 do 51% za *B. subtilis* N146, od 21 do 56% za *B. subtilis* iz preparata Serenade i od 21 do 43% za *B. subtilis* iz preparata Ekstrasol (Slika 33).



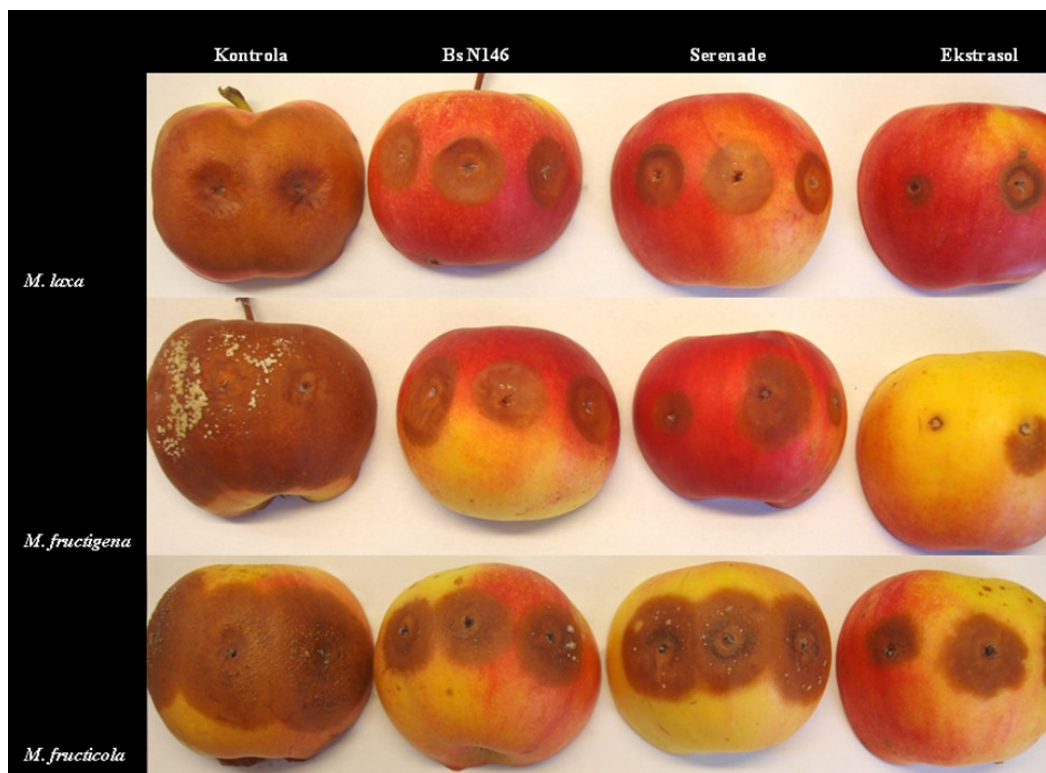
**Grafikon 10.** *In vitro* utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp. ■ *M. laxa* ■ *M. fructigena* ■ *M. fructicola*



**Slika 33.** *In vitro* uticaj različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp.

#### 5.14.2. *In vivo* utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp.

Rezultati *in vivo* eksperimenata pokazali su da suspenzija *B. subtilis* N146 i obe suspenzije iz komercijalnih preparata statistički značajno smanjuju razvoj truleži inokuliranih plodova jabuke u odnosu na netretiranu kontrolu ( $P < 0,01$ ), kao i da se bolji efekat zaštite postiže u slučaju kada se inokulacija vrši neposredno nakon tretmana (I varijanta) (Slika 34, Grafikon 11). Efekat zaštite slabiji je u slučaju inokulacije plodova 24 h nakon tretmana za sve primenjivane tretmane, osim za standardni fungicid (Slika 35).

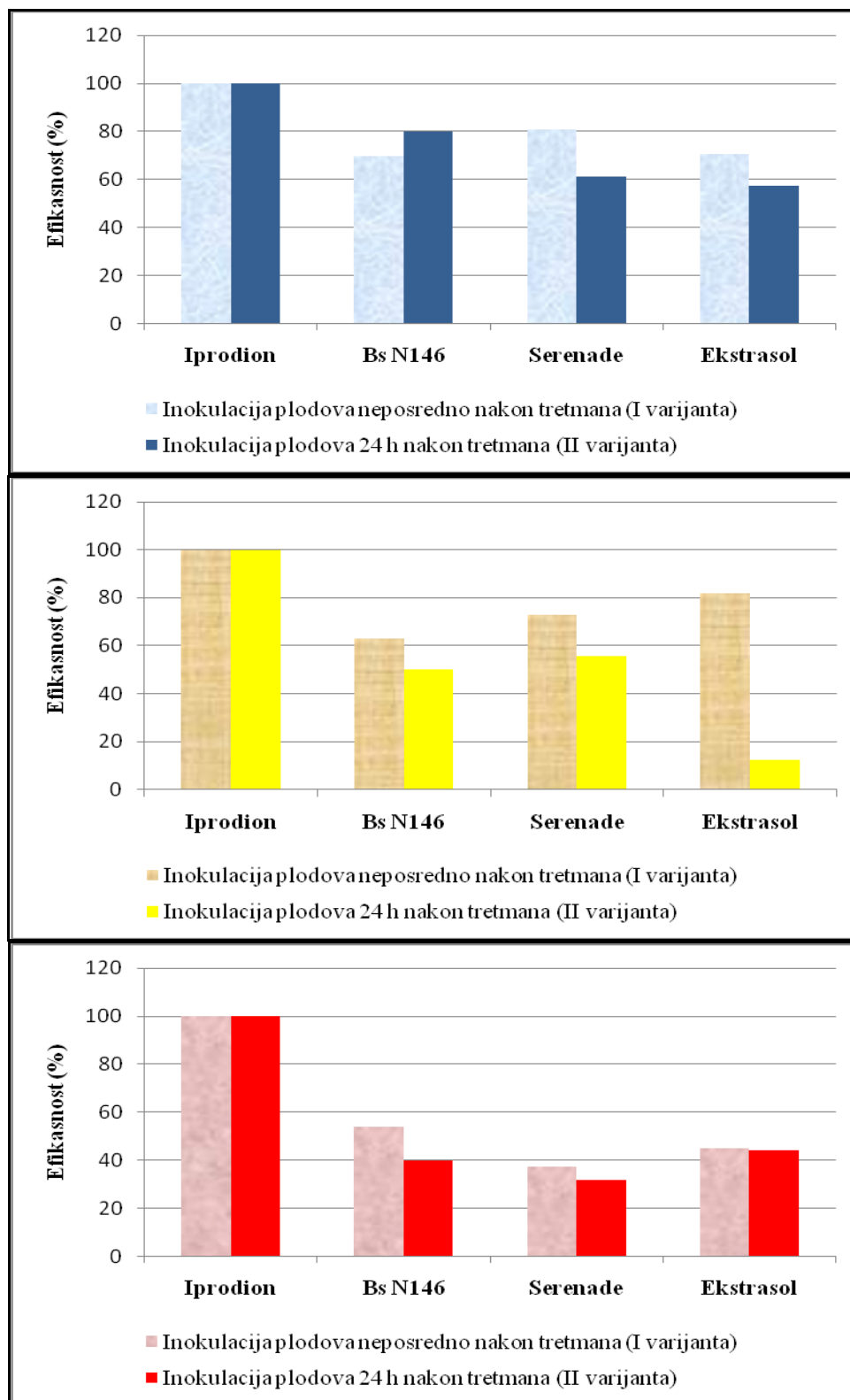


**Slika 34.** *In vivo* utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp. Inokulacija plodova neposredno nakon tretmana (I varijanta)



**Slika 35.** *In vivo* utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp. Inokulacija plodova 24 h nakon tretmana (II varijanta)





**Grafikon 11.** *In vivo* utvrđivanje uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp.

■ *M. laxa*    ■ *M. fructigena*    ■ *M. fructicola*

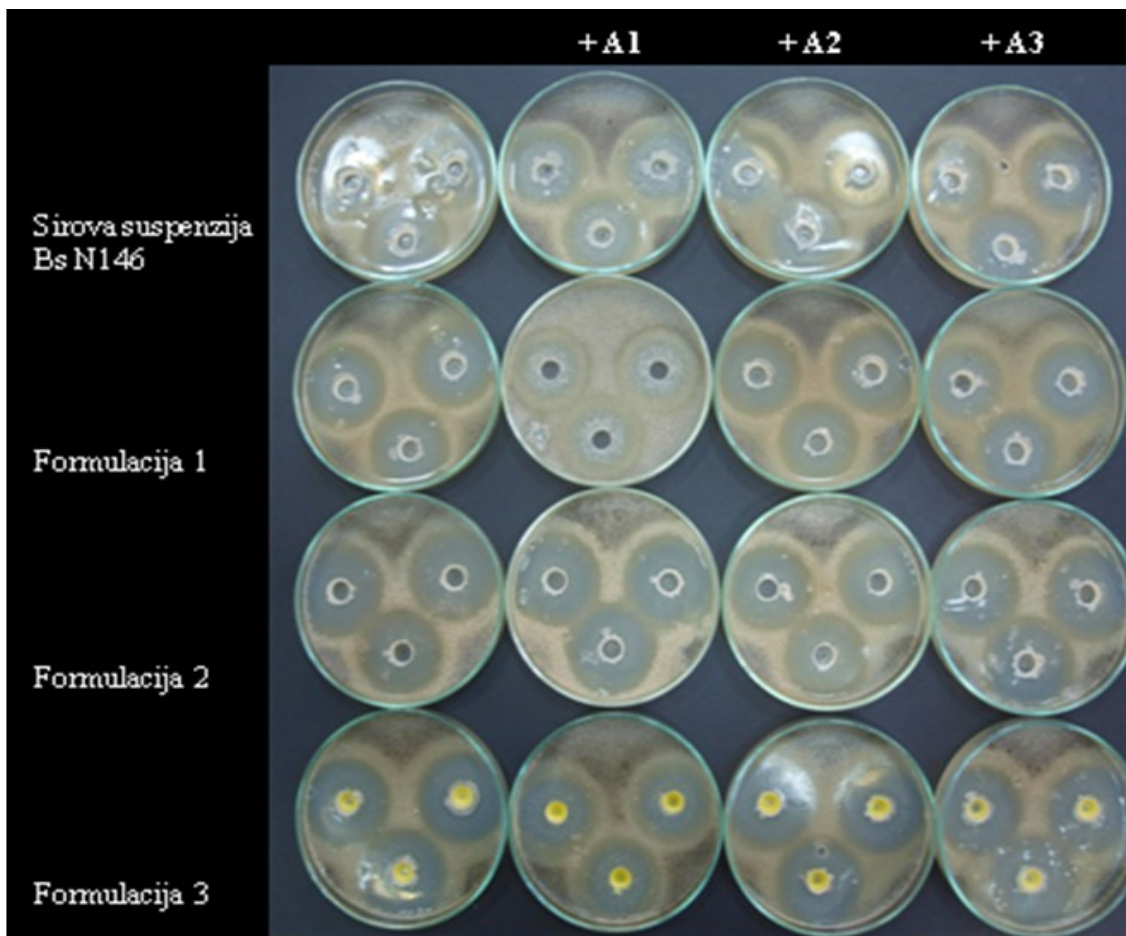
### 5.14.3. Ispitivanje efekata formulacija *Bacillus subtilis* na *Monilinia* spp. *in vitro*

Efekat tri različite formulacije *B. subtilis* N146 u kombinaciji sa različitim aduvantima preliminarno je testiran na izolatu vrste *M. fructicola*. Rezultati ovog testa prikazani su u Tabeli 28. Uočena je statistički značajna razlika u širini zone inhibicije porasta izolata nastala kao posledica različitih tretmana ( $P < 0,01$ ). Najšira zona inhibicije dobijena je primenom sirove suspenzije *B. subtilis* N146, dok je od razvijenih formulacija najbolji efekat ispoljila formulacija 3 koja je odabrana za dalja testiranja (Slika 36).

**Tabela 28.** Efekati formulacija *Bacillus subtilis* na *Monilinia fructicola* *in vitro*

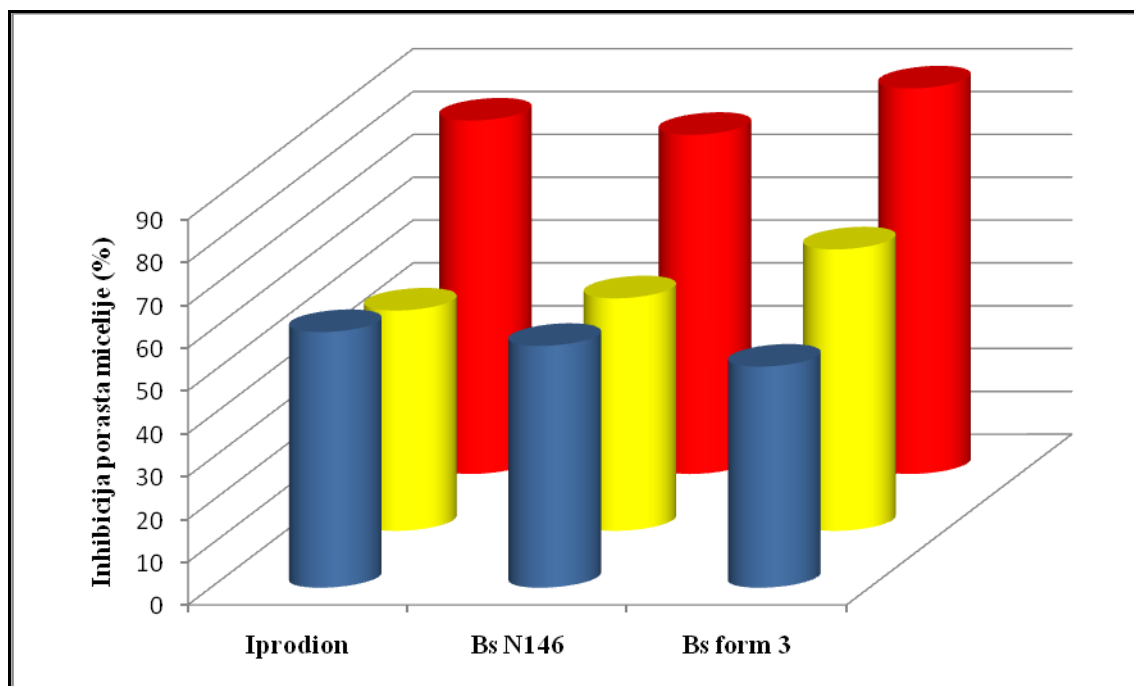
Tretman	Prečnik inhibitorne zone (mm) <sup>1</sup>
Formulacija 1	33.7 ± 1.5 fg
Formulacija 1 + A1	25.6 ± 0.9 i
Formulacija 1+ A2	33.0 ± 1.2 gh
Formulacija 1+ A3	33.2 ± 1.3 g
Formulacija 2	36.3 ± 1.2 bcde
Formulacija 2 + A1	36.7 ± 1.1 bc
Formulacija 2+ A2	37.3 ± 1.5 b
Formulacija 2+ A3	36.1 ± 0.7 bcde
Formulacija 3	36.6 ± 1.1 bcd
Formulacija 3 + A1	31.7 ± 1.4 h
Formulacija 3+ A2	35.0 ± 2.5 def
Formulacija 3+ A3	34.8 ± 3.1 ef
Sirova suspenzija <i>B. subtilis</i>	39.6 ± 0.9 a
Sirova suspenzija <i>B. subtilis</i> + A1	35.3 ± 1 cde
Sirova suspenzija <i>B. subtilis</i> + A2	36.8 ± 1.1 bc
Sirova suspenzija <i>B. subtilis</i> + A3	36.8 ± 0.8 bc

<sup>1</sup> Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna



**Slika 36.** Efekti formulacija *Bacillus subtilis* N146 na *Monilinia fructicola* *in vitro*

Uticaj formulacije 3 na porast izolata *Monilinia* spp. prikazan je na Grafikonu 12. U slučaju primene ove formulacije na izolate *M. fructigena* i *M. laxa* došlo je do određenog poboljšanja aktivnosti formulacije u poređenju sa sirovom suspenzijom *B. subtilis* N146, dok je u slučaju izolata *M. laxa* došlo do smanjenja aktivnosti formulacije 3. *In vitro* ispitivanja efekata formulacije 3 na *Monilinia* spp. potvrdila su visok potencijal ovog biopreparata za suzbijanje vrsta roda *Monilinia*.

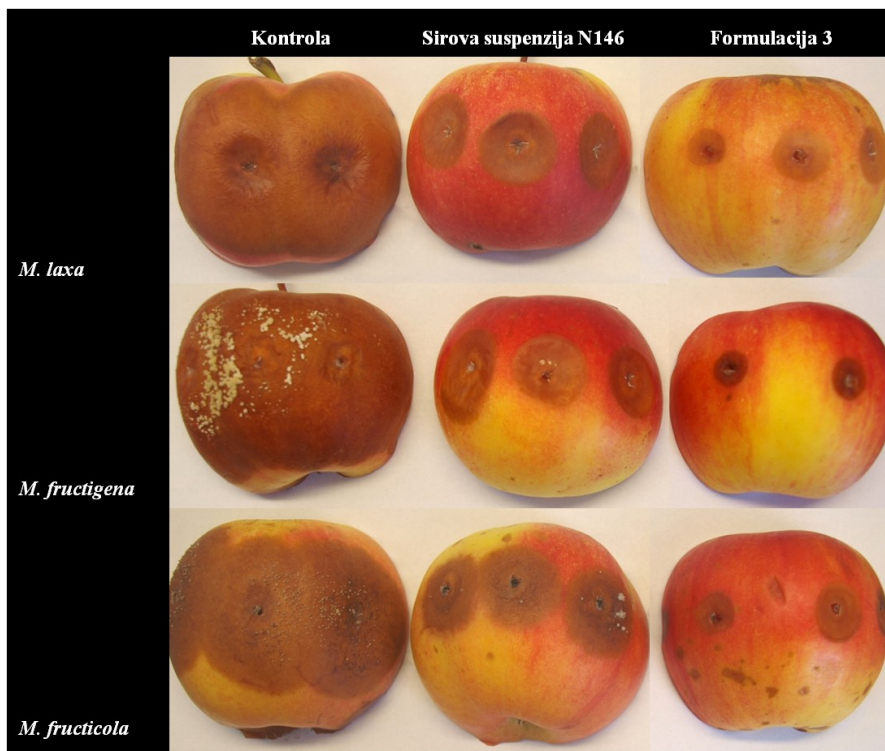


**Grafikon 12.** Efekat formulacija *Bacillus subtilis* na *Monilinia* spp. *in vitro*

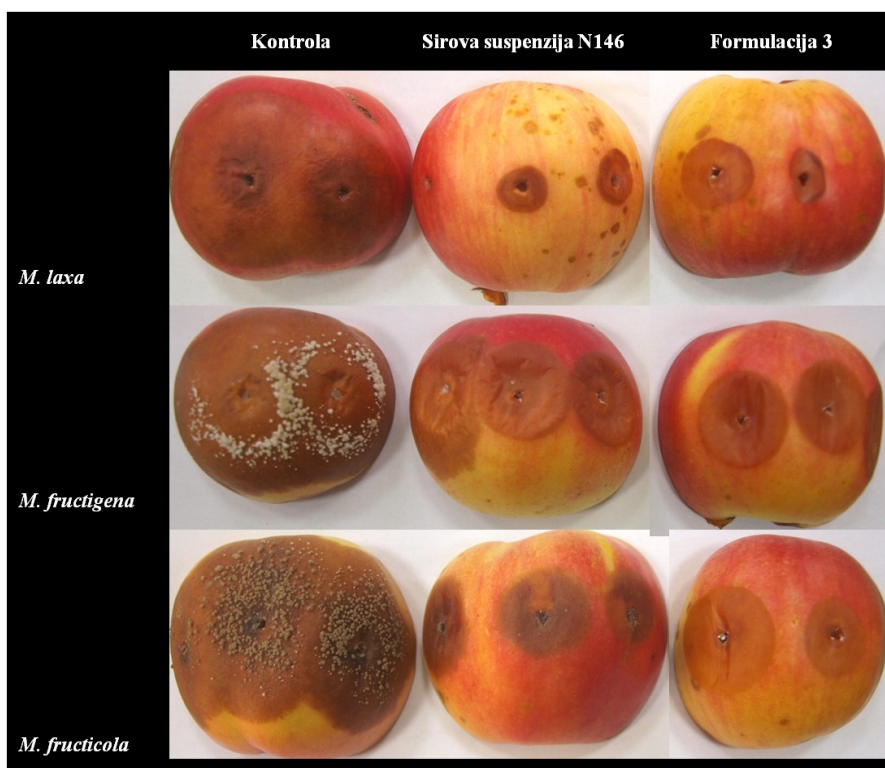
■ *M. laxa*    ■ *M. fructigena*    ■ *M. fructicola*

#### 5.14.4. Ispitivanje efikasnosti formulisanih preparata na bazi *Bacillus subtilis* u suzbijanju *Monilinia* spp. *in vivo*

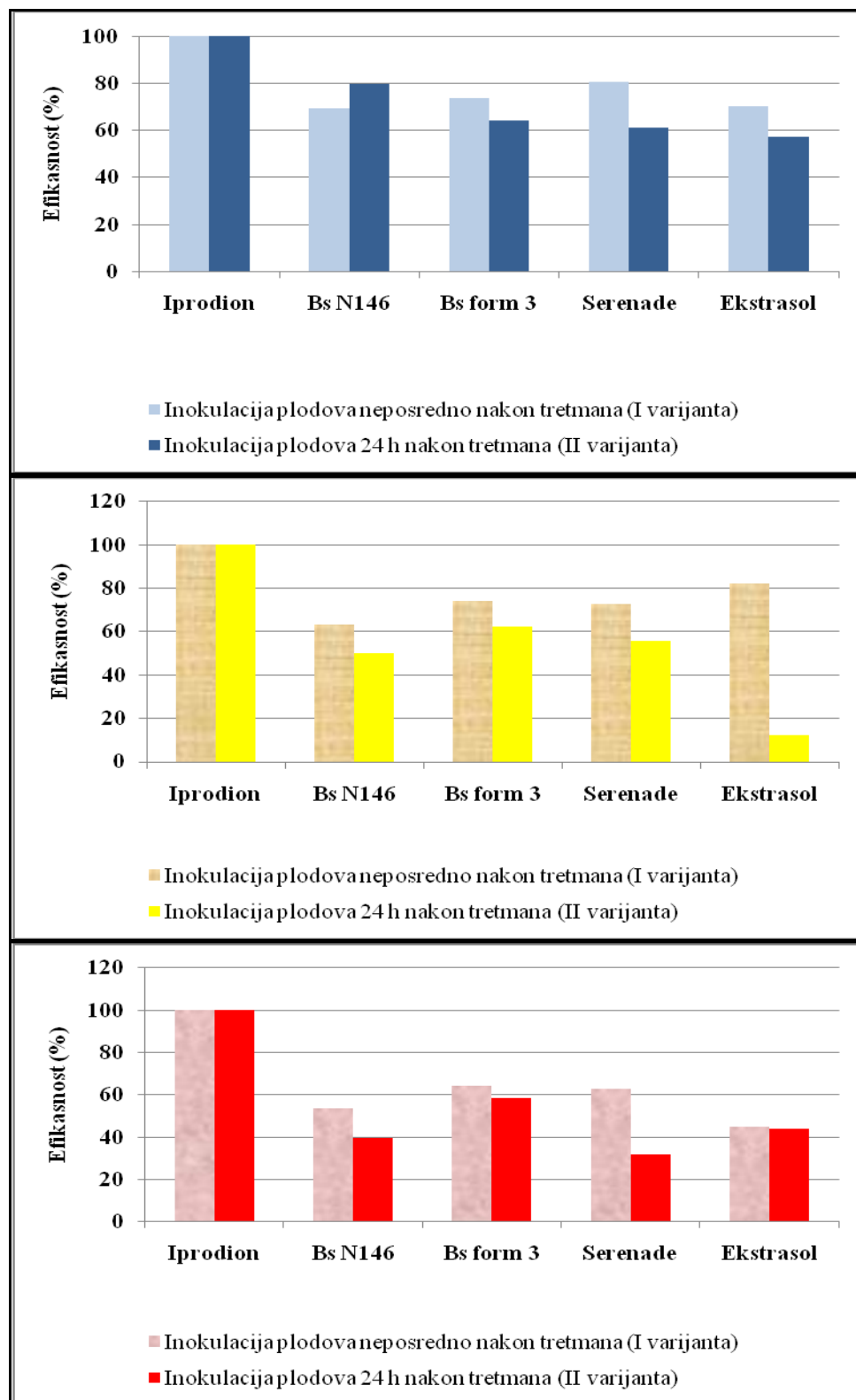
U testove ispitivanja efikasnosti formulisanih preparata na bazi *B. subtilis* uključena je formulacija 3, standardni fungicid iprodion i komercijalno dostupni preparati Serenade i Ekstrasol. Rezultati *in vivo* eksperimenta pokazali su da i sirova suspenzija *B. subtilis* i formulacija 3 statistički značajno smanjuju razvoj truleži inokuliranih plodova jabuke u odnosu na netretiranu kontrolu ( $P < 0,01$ ). Dodatno, formulacija 3 bila je efikasnija od sirove suspenzije *B. subtilis* (Slika 37). Ipak, zabeležen je slabiji efekat zaštite u slučaju inokulacije plodova 24 h nakon tretmana za sve primenjivane tretmane, osim za standardni fungicid (Grafikon 13, Slika 38).



**Slika 37.** Efikasnosti formulisanih preparata na bazi *Bacillus subtilis* u suzbijanju *Monilinia* spp. *in vivo*. Inokulacija plodova neposredno nakon tretmana (I varijanta)



**Slika 38.** Efikasnosti formulisanih preparata na bazi *Bacillus subtilis* u suzbijanju *Monilinia* spp. *in vivo*. Inokulacija plodova 24 h nakon tretmana (II varijanta)



**Grafikon 13.** Efikasnosti formuliranih preparata na bazi *Bacillus subtilis* u suzbijanju *Monilinia* spp. *in vivo*

■ *M. laxa*    ■ *M. fructigena*    ■ *M. fructicola*

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. *Monilinia* spp. - geografska distribucija i značaj patogena

Proizvodnju koštičavog voća ugrožava veliki broj biljnih patogena među kojima posebno mesto zauzimaju vrste roda *Monilinia*. S obzirom na velike štete koje prouzrokuju patogeni ovog roda, u svetu postoji veliki broj istraživanja koja se odnose na biologiju patogena, simptome oboljenja, ekološke, morfološke i molekularne odlike, kao i mere suzbijanja ovih patogena. Sa druge strane, u našoj zemlji primetan je nedostatak podataka o prisustvu i rasprostranjenosti vrsta roda *Monilinia* na koštičavim voćkama, kao i o osetljivosti ovih vrsta na fungicide. U dostupnoj domaćoj literaturi uglavnom se mogu naći podaci o štetama koje su ove vrste prouzrokovale u različitim godinama, najčešće tokom godina sa izuzetno povoljnim uslovima za pojavu i širenje *Monilinia* spp. (**Radman**, 1967; **Arsenijević i Rudinski**, 1969; **Kišpatića i sar.**, 1976; **Perišić i sar.**, 1976; **Balaž**, 2000).

S obzirom da podaci u literaturi govore o velikim promenama u strukturi populacije vrsta roda *Monilinia* kako na američkom, tako i na evropskom kontinentu, proučavanje diverziteta vrsta roda *Monilinia* u Srbiji je od izuzetnog značaja. U istraživanjima **Michailides et al.** (1987) detaljno je opisana promena u strukturi populacije u SAD u periodu od oko četrdeset godina. *M. laxa* bila je dominantan prouzrokovatelj mrke truleži plodova koštičavih voćaka u SAD do osamdesetih godina prošlog veka kada je struktura populacije značajno izmenjena. Istraživanja sprovedena nakon perioda od 15 godina ukazala su na široku rasprostranjenost vrsta *M. fructicola* i *M. laxa*. U preko 60% zasada detektovane su obe vrste, a zasadi u kojima je detektovana samo *M. fructicola* bili su brojniji u odnosu na one gde je detektovana samo *M. laxa*. Danas je *M. fructicola* dominantan patogen u SAD. Sa druge strane, od 1920. godine *M. laxa* je dobro poznat patogen koštičavih voćaka u Kini. U periodu od 1994. do 1996. godine *M. laxa* i *M. fructigena* bile su najvažniji prouzrokovatelji mrke truleži plodova koštičavih voćaka u Kini (**Zhu et al.**, 2011). Međutim, 2003. godine prvi put je detektovana *M. fructicola* na ovom području i od tada se struktura populacije vrsta roda *Monilinia* znatno promenila (**Zhu et al.**, 2011). Danas je *M. fructicola* najvažniji prouzrokovatelj mrke truleži plodova koštičavih voćaka u Kini (**Fan et al.**, 2010; **Zhu et**

al., 2011). Invanzivna pojava vrste *M. fructicola* na tom području, kao i velika genetička varijabilnost izolata *M. fructicola* iz Kine navela je mnoge istraživače na zaključak da je ova vrsta dospela u ove krajeve mnogo pre nego što je prvi put detektovana (Fan et al., 2010). Prema istraživanjima Muñoz et al. (2008) i Villarino et al. (2012) dominantna vrsta roda *Monilinia* u Španiji je *M. laxa* (procenjena učestalost je 80%), pored koje je široko rasprostranjena, ali u manjem procentu *M. fructigena*. Međutim, u ograničenim arealima, detektovano je i prisustvo *M. fructicola* (De Cal et al., 2009a) koja je brzo postala najfrekventnija vrsta roda *Monilinia* na uskladištenim plodovima koštičavih voćaka (Villarino et al., 2012). *M. laxa* i *M. fructigena* dominantni su prouzrokovajući mrke truleži plodova i u Grčkoj (Malandrakis et al., 2012), Mađarskoj (Petróczy et al., 2012) i Srbiji (Vasiljević, 1955; Stojanović i Kostić, 1957; Hrustić et al., 2013b).

Poslednjih desetak godina *M. fructicola* detektovana je u mnogim zemljama Evrope: prvo u Francuskoj (EPPO, 2002a), a zatim u Mađarskoj (Petróczy and Palkovics, 2006), Češkoj Republici (Duchoslavová et al., 2007), Italiji (Pellegrino et al., 2009), Španiji (De Cal et al., 2009a), Švajcarskoj (Bosshard et al., 2006; Hilber-Bodmer, 2010), Sloveniji (Munda and Viršček Marn, 2010), Slovačkoj (Ondejková et al., 2010), Nemačkoj (Grabke et al., 2011), Poljskoj (Poniatowska et al., 2013) ali i u našoj zemlji (Vasić et al., 2012; Hrustić et al., 2013). Analiza strukture populacije izolata *M. fructicola* poreklom iz Evrope ukazala je na dva nezavisna prodora ovog patogena na evropski kontinent. Istraživanja pokazuju da većina izolata *M. fructicola* iz Evrope (Španije, Francuske i Švajcarske) vode poreklo iz Kalifornije, dok je poreklo italijanskih populacija *M. fructicola* delom iz Kalifornije, a delom iz istočnih delova SAD (Jansch et al., 2012). U nekim evropskim zemljama, *M. fructicola* detektovana je samo na plodovima u prometu poreklom od domaćih proizvođača (Munda and Viršček Marn, 2010; Hrustić et al., 2013) ili iz uvoza (Bosshard et al., 2006; Petróczy and Palkovics, 2006; Ondejková et al., 2010; Petróczy et al., 2012). U Mađarskoj je utvrđena samo na plodovima iz uvoza iz Italije i Španije (Petróczy and Palkovics, 2006; Petróczy et al., 2012). Prvobitni nalaz iz Švajcarske takođe je bio na plodovima iz uvoza iz SAD (Bosshard et al., 2006), ali je nekoliko godina kasnije prisustvo ovog patogena potvrđeno i u zasadima (Hilber-Bodmer, 2010). U Slovačkoj detektovano je



prisustvo izolata *M. fructicola* poreklom sa plodova breskve i nektarine iz Španije i Grčke, ali je prisustvo dokazano i u zasadu šljive (**Ondejková et al.**, 2010).

Navedeni podaci govore o opasnosti širenja *M. fructicola* u zemljama evropskog kontinenta i o značajnoj ulozi međunarodne trgovine biljnim materijalom u širenju patogena. Posebno upozorenje predstavljaju osobine po kojima se *M. fructicola* razlikuje od ostalih vrsta roda *Monilinia*. Za razliku od *M. laxa* i *M. fructigena*, *M. fructicola* prouzrokuje latentne infekcije koje olakšavaju širenje patogena (**Michailides et al.**, 2007). Zatim, *M. fructicola* znatno obilnije stvara spore i ima duže kličine cevčice (**Villarino et al.**, 2010) koje omogućavaju efikasnije širenje patogena. Takođe, češće formira teleomorfni stadijum koji doprinosi kako stvaranju veće količine inokuluma, tako i povećanju genetičke varijabilnosti (**Batra and Harada**, 1986). Osim toga postoje navodi da je *M. fructicola* sposobna da ostvari infekciju plodova kroz nepovređeno tkivo, za razliku od drugih vrsta ovog roda koje zarazu plodova ostvaruju samo preko povreda (**Szódi et al.**, 2012).

U Srbiji je prisustvo *M. fructicola* na koštičavom voću prvi put ustanovljeno 2012. godine. U istraživanjima u okviru ove disertacije patogen nije detektovan u zasadu, ali dva nezavisna uzorka prikupljena sa lokalnih zelenih pijaca od domaćih proizvođača ukazuju na nedvosmisleno prisustvo ovog patogena u Srbiji. Do sličnih zapažanja došli su i **Vasić et al.** (2012) koji su utvrdili prisustvo *M. fructicola* na uskladištenim plodovima jabuke.

Tokom trogodišnjeg perioda intenzivnog pregleda 119 lokaliteta na teritoriji Srbije prikupljen je 321 uzorak obolelih biljnih delova plodova, sasušanih grančica i cvetova iz kojih je izdvojeno 246 monosporijalnih izolata sa potvrđenom patogenošću koji pripadaju rodu *Monilinia*.

## 6.2. Identifikacija patogena primenom konvencionalnih metoda

Identifikacija izolata *Monilinia* spp. do nivoa vrste izvršena je na osnovu konvencionalnih osobina i to: morfoloških, patogenih, odgajivačkih i ekoloških karakteristika.

### 6.2.1. Morfološke karakteristike izolata *Monilinia* spp.

S obzirom da slične simptome prouzrokuju sve tri vrste roda *Monilinia* i da na osnovu simptoma nije moguće pouzdano utvrditi o kojoj vrsti roda *Monilinia* je reč (**Michailides et al.**, 2007), za pouzdanu dijagnozu i identifikaciju prouzrokovača, neophodna je izolacija patogena, proučavanje patogenosti, morfoloških, odgajivačkih i ekoloških karakteristika, a potom potvrda rezultata molekularnim metodama (**Byrde and Willetts**, 1977; **De Cal and Melgarejo**, 1999; **Hughes et al.**, 2000; **Hughes**, 2003; **Côté et al.**, 2004).

Izolacijom fitopatogenih gljiva iz zaraženih biljaka koštičavih voćaka, prikupljenih u okviru ovih istraživanja, uočeno je jasno grupisanje dobijenih izolata u tri grupe na osnovu razlika u morfološkim karakteristikama. Prvu grupu čini 237 izolata koji na PDA podlozi imaju svetlo smeđu do sivu koloniju oblika rozete, režnjevutih ivica, bez prisustva spora. U drugu grupu svrstano je šest izolata krem-žute boje, ravnih ivica, sa prisutnim retkim sporama, dok treću grupu čine tri izolata koji obilno sporulišu, formiraju koncentrični prsten spora i imaju ravnu ivicu kolonije smeđe do sive boje. Prva grupa izolata je na osnovu morfoloških osobina (boja kolonije, odlike ruba i oblik kolonije, sporulacija, prisustvo koncentričnog prstena, kvalitativna brzina porasta i prisustvo crne marginalne linije) identifikovana kao vrsta *M. laxa*, druga kao *M. fructigena* i treća kao *M. fructicola*. U svakoj grupi prisutan je veći broj izolata između kojih nisu uočene razlike u morfološkim osobinama. Dobijeni rezultati u okviru ove disertacije saglasni su sa navodima **Lane** (2002): da se izolati *M. fructicola* i *M. laxa* (sivkasta kolonija) mogu odvojiti od izolata *M. fructigena* (žuta ili krem-bela boja kolonije) na osnovu boje kolonije; da brzina porasta kolonije predstavlja varijabilan karakter koji se ne može upotrebiti za razdvajanje vrsta ovog roda; da izolati *M. fructicola* obilno sporulišu na PDA podlozi, *M. fructigena* retko, a *M. laxa* ne sporuliše; da se izolati *M. laxa* mogu odvojiti od izolata *M. fructigena* i *M. fructicola* na osnovu režnjevite ivice kolonije i samog oblika rozete. Sa druge strane, u nekim istraživanjima pokazano je da identifikacija na osnovu morfoloških karakteristika može biti pogrešna (**De Cal and Melgarejo**, 1999). **Muñoz et al.** (2008) u svojim istraživanjima pronašli su izolate *M. fructigena* koji su imali veoma slične karakteristike koloniji *M. laxa* i pokazali da lako može doći do pogrešne identifikacije vrsta roda *Monilinia*. Naime,

identifikacija na osnovu morfoloških karakteristika potvrđena je primenom molekularnih metoda kod samo 72% proučavanih izolata. Istraživanja **Petróczy et al.** (2012) takođe pokazuju da neki izolati *M. fructigena* mogu obrazovati koloniju smeđe boje, režnjevutih ivica, tipičnu za izolate vrste *M. laxa* ili *M. fructicola*, kao i da izolati *M. laxa* mogu imati koloniju žute boje, karakterističnu za vrstu *M. fructigena*. Međutim, sve tri grupe autora nisu istovremeno koristile sve morfološke karaktere koje je neophodno proučiti za pouzdanu identifikaciju, što bi mogao biti razlog pogrešne identifikacije.

Svi izolati *Monilinia* spp. ispitivani u okviru ove disertacije obrazovali su hijalinske, jednoćelijske konidije limunastog do ovalnog oblika, pri čemu su izolati vrste *M. fructigena* formirali u proseku najkrupnije konidije (19,25-23,50 x 11,92-13,50 µm), dok su izolati *M. laxa* obrazovali najsitnije konidije (11,25-15,42 x 8,25-11,07 µm). Dobijeni rezultati saglasni su sa rezultatima **Hu et al.** (2011a) po kojima *M. laxa* ima konidije prosečno najmanjih dimenzija i rezultatima **Poniatowska et al.** (2013) gde su izolati *M. fructicola* formirali konidije prosečno najvećih dimenzija (24 x 13 µm). Najobilnije formiranje konidija na PDA podlozi zabeleženo je kod izolata *M. fructicola* ( $0,27 \times 10^5$ ) što je saglasno sa rezultatima **Poniatowska et al.** (2013).

Istraživanja su pokazala postojanje značajnih razlika u načinu klijanja konidija i dužine kličine cevčice pre prvog grananja (**van Leeuwen and van Kesteren**, 1998; **De Cal and Melgarejo**, 1999).

U okviru istraživanja u ovoj disertaciji izolat *M. laxa* formirao je na WA podlozi kličine cevčice prosečne dužine 40 µm pre prvog grananja, izolat *M. fructigena* formirao je konidije koje kličaju u nekoliko kličinih cevčica prosečne dužine 197 µm, dok je izolat *M. fructicola* formirao prosečno najduže kličine cevčice (365 µm). U istraživanjima **van Leeuwen and van Kesteren** (1998) prosečna dužina kličinih cevčica pre prvog grananja za izolate vrste *M. fructicola* bila je 465-851 µm, za izolate *M. laxa* 161-466 µm, dok su izolati *M. fructigena* obrazovali kličine cevčice srednje dužine od 307 do 806 µm i više kličinih cevčica po jednoj konidiji. Istraživanja **De Cal and Melgarejo** (1999) takođe su potvrdila da dužina kličine cevi pre prvog grananja može biti značajan karakter za razdvajanje vrsta roda *Monilinia*. *M. laxa* formira najkraće kličine cevi koje se granaju na manje od 60 µm od konidije, dok se kličine cevi koje formiraju *M. fructigena* i *M. fructicola* granaju na mnogo većoj udaljenosti (većoj

od 220  $\mu\text{m}$ ). **Hu et al.** (2011a) navode da konidije vrsta *M. laxa* i *M. fructicola* kličaju u jednu kličinu cevčicu, dok izolati *M. fructigena* formiraju više kličinih cevčica na jednoj konidiji, što je utvrđeno i u istraživanjima obavljenim sa izolatima sve tri vrste iz Srbije.

Sve morfološke (makroskopske i mikroskopske) osobine dobijenih izolata poreklom iz Srbije u skladu su sa već opisanim karakteristikama vrsta roda *Monilinia* koje su dali **van Leeuwen and van Kesteren** (1998), **Lane** (2002), **Côté et al.** (2004), **Hu et al.** (2011a), **Zhu et al.** (2011) i **Poniatowska et al.** (2013).

### 6.2.2. Odgajivačke i ekološke karakteristike izolata *Monilinia* spp.

U ovim istraživanjima na temperaturi od 24°C izolati su ispoljili statistički značajnu razliku u brzini rasta kolonije. Prosečno najveći dnevni porast (10,55 mm/dan) imao je izolat *M. fructicola*, dok je izolat vrste *M. fructigena* rastao najsporije (2,38 mm/dan) na PDA podlozi. U istraživanjima **van Leeuwen and van Kesteren** (1998) i **Poniatowska et al.** (2013) izolati *M. fructicola* takođe su imali najveći prosečni porast na PDA podlozi. Prosečan porast izolata *M. fructigena* bio je 3,7 mm/dan (**van Leeuwen et al.**, 2002b), *M. fructicola* 13 mm/dan (**Van Leeuwen and van Kesteren**, 1998), a *M. laxa* oko polovine porasta izolata *M. fructicola* (**EPPO**, 2003). U istraživanjima **Petróczy et al.** (2012) izolati *M. fructicola* imali su prosečan porast od 10,87 mm/dan, prosečan porast izolata *M. fructigena* bio je 6,44 mm/dan, dok je porast izolata *M. laxa* bio 6,65 mm/dan.

U ovim istraživanjima utvrđivanja uticaja hranljivih podloga na porast izolata pokazano je da izolati *M. laxa* i *M. fructigena* prosečno najbrže rastu na MA hranljivoj podlozi, dok je za vrstu *M. fructicola* optimalan porast zabeležen na PDA podlozi. Pored razlika u brzini porasta ispoljene su značajne razlike u morfološkim osobinama izolata na hranljivim podlogama. Na PDA, MA i V8A podlozi svi ispitivani izolati imali su kompaktnu miceliju, dok je na WA i CzA podlozi micelija izolata bila retka i prozračna. **Hu et al.** (2011a) zabeležili su statistički značajno brži porast izolata svih vrsta na V8 podlozi u poređenju sa porastom na PDA podlozi.

Optimalan porast izolata *Monilinia* spp., u ovim istraživanjima, zabeležen je na temperaturama od 23 do 28°C, dok su se granične temperature rasta bile u intervalu od 2-4°C i od 31-34°C. Praćenjem porasta izolata na ekstremnim temperaturama uočeno je

da su izolati *M. fructigena* najosetljiviji kako na niske, tako i na visoke temperature. Osim razlika u brzini rasta izolata na različitim temperaturama, kod izolata *M. laxa* isopljene su razlike u morfološkim osobinama: na temperaturi 23 i 25°C kolonija je imala karakterističan oblik rozete, dok je na ostalim temperaturama kolonija imala ravnu ivicu. Sa druge strane, temperature nisu uticale na izgled kolonije izolata *M. fructigena* i *M. fructicola*. U *in vitro* istraživanjima **Jansch et al.** (2012) *M. fructicola* ne raste na temperaturama nižim od 8°C. Takođe, u ovim istraživanjima utvrđeno je da izolati vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* ima najbrži prosečni porast u mraku, dok izolat *M. fructicola* najbrži porast ima u svetlosnom režimu 12 h svetlost/12 h mrak.

### 6.2.3. Patogene karakteristike izolata *Monilinia* spp.

Testovi unakrsne patogenosti devet odabranih izolata *Monilinia* spp. pokazali su da postoji statistički značajna razlika u virulentnosti kako između izolata različitih vrsta, tako i između izolata iste vrste. Na plodovima nektarine i breskve najveću patogenost ispoljio je izolat *M. fructigena* poreklom sa šljive, dok je najmanju patogenost na plodovima nektarine ispoljio izolat *M. fructicola* sa nektarine, odnosno na plodovima breskve izolat *M. laxa* sa šljive. Na plodovima šljive najveću nekrotičnu zonu obrazovao je izolat *M. laxa* sa breskve, a najmanju izolat *M. fructicola* sa nektarine. Sa druge strane, na plodovima kajsije najmanju i najveću nekrotičnu zonu obrazovali su izolati iste vrste *M. laxa*. Izolat *M. fructigena* sa višnje ispoljio je najveću virulentnost na plodovima trešnje i višnje, dok je izolat *M. laxa* sa breskve prouzrokovao najmanju zonu truleži na ovim plodovima. Poreklo izolata nije uticalo na ispoljavanje stepena patogenosti na plodovima biljaka domaćina. Međutim, ove razlike između vrsta nisu zabeležene u testovima patogenosti koje su izveli **Zhu et al.** (2011). Simptomi mrke truleži na inokulisanim plodovima razvili su se nakon inkubacije od dva do četiri dana na temperaturi od 24°C. Prečnik zone truleži na inokulisanim plodovima nektarine bio je 23,0 do 24,5 mm/dan u zavisnosti od izolata, dok je na plodovima kajsije prečnik zahvaćena zone bio 28,6 do 33,9 mm/dan. Testovi patogenosti **Poniatowska et al.** (2013) pokazali su da *M. fructigena* i *M. laxa* prouzrokuju trulež koja brzo zahvata ceo plod za razliku od izolata *M. fructicola* koji imaju znatno sporiji stepen razvoja truleži. **Muñoz et al.** (2008) uočili su da izolati *M. fructigena* prouzrokuju veći prečnik truleži

plodova u poređenju sa prečnikom truleži koji prouzrokuju izolati *M. laxa*. Sa druge strane, **Villarino et al.** (2010) zabeležili su da *M. fructicola* ispoljava veći stepen virulentnosti u zasadu breskve u poređenju sa vrstama *M. laxa* i *M. fructigena*. Kao moguće objašnjenje navode veću sposobnost stvaranja konidija i formiranje dužih kličinih cevčica *M. fructicola*. Ova grupa autora smatra da su upravo ove osobine ključne za ekspanziju *M. fructicola* i potiskivanje ostalih vrsta roda *Monilinia*.

Na povređenim plodovima koštičavih voćaka svih 246 dobijenih monosporijalnih izolata *Monilinia* spp., nakon tri dana od inokulacije, prouzrokovalo je trulež smeđe boje karakterističnu za *Monilinia* spp. Nakon reizolacije sa inokulisanih plodova dobijeni su reizolati koji po izgledu kolonije i morfologiji reproduktivnih tvorevina u potpunosti odgovaraju izvornim izolatima čime je potvrđena patogenost izolata i ispunjeni Kohovi postulati za sve dobijene izolate u okviru ovih istraživanja.

U testovima patogenosti u okviru ove disertacije sve ispitivane vrste roda *Monilinia* bile su sposobne da ostvare infekciju preko nepovređene kutikule ploda koštičavih voćaka. Međutim, o načinima prodora patogena u plodove voćaka i mogućnosti ostvarenja infekcije u literaturi postoje oprečna mišljenja. **Gibert et al.** (2009) i **Szódi et al.** (2012) smatraju da *M. laxa* može ostvariti zarazu plodova samo preko povreda, **Vico i Jurick** (2012) navode da *M. fructigena* može da prodre direktno kroz nepovređenu kutikula pomoću enzima kutinaze, ali takođe prodire i kroz rane i povrede. Rezultati **Szódi et al.** (2012) pokazuju da je *M. fructicola* sposobna da ostvari infekciju plodova kroz nepovređeno tkivo, dok **Holb** (2006) i **Xu and Robinson** (2000) navode da je prodor *M. fructicola* moguć samo kroz povrede na plodovima.

#### 6.2.4. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija

Molekularnom metodom Multiplex PCR korišćenjem prajmera i protokola koji su opisali **Côté et al.** (2004) amplifikovani su fragmenti ITS rDNK odgovarajuće veličine i potvrđena je identifikacija izolata na osnovu morfoloških karakteristika. Kod 237 uzoraka došlo je do amplifikacije fragmenta veličine 351 bp, tako da je ta grupa izolata detektovana kao *M. laxa*. Fragmenti veličine oko 402 bp amplifikovani su u slučaju šest uzoraka detektovanih kao *M. fructigena*, dok je kod tri izolata došlo do amplifikacije fragmenata veličine 535 bp karakterističnih za vrstu *M. fructicola*.

Koristeći pomenuti protokol **Poniatowska et al.** (2013) u svojim istraživanjima od 670 ispitivanih izolata, 64,63% su detektovani kao vrsta *M. fructigena*, 31,64% kao *M. laxa*, 2,98% kao *M. polystroma* i 0,75% kao *M. fructicola*.

Radi potvrde identifikacije urađeno je sekvencioniranje ITS rDNK genskog regiona izolata *Monilinia* spp. primenom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4. Identifikacija odabranih izolata izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti dobijenih sekvenci međusobno, kao i sa sekvencama drugih izolata ovog roda dostupnih u GenBank bazi podataka. Poređenjem dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka utvrđeno je 100% nukleotidne identičnosti sekvenci uzoraka identifikovanih kao *M. laxa* sa pet deponovanih sekvenci izolata *M. laxa* poreklom iz Španije (EF153013, EF153014, EF153015, EF153016 i EF153017), uzoraka *M. fructigena* sa 16 deponovanih sekvenci izolata *M. fructigena* poreklom iz različitih delova sveta (HQ166347, EU098121, EF207429, EF207428, EF207427, EF207426, EF207425, F207424, FJ754275, AF150680, AF150679, AF150678, AF150677, Z73779, Z73780 i HQ908791) i uzoraka *M. fructicola* sa osam deponovanih sekvenci izolata *M. fructicola* poreklom iz različitih delova sveta (JN176564, FJ411109, EF207423, EF207422, EF207421, EF207420, EF207419 i FJ515894). Osim toga, međusobnim poređenjem sekvenci ITS regiona dobijenih u ovom istraživanju utvrđena je 100% nukleotidna identičnost izolata identifikovanih kao *M. laxa*, osim kod sekvence izolata VPSV, poreklom sa višnje uzorkovanog u Slankamenačkim Vinogradima koja se razlikuje u jednom nukleotidu (99,8% sličnosti). Između izolata *M. laxa* i *M. fructigena* uočena je identičnosti od 97,9%; između *M. laxa* i *M. fructicola* izolata 99,3% identičnost; između *M. fructigena* i *M. fructicola* 97,9% identičnosti. **Hu et al.** (2011a) takođe su ukazali na veliku nukleotidnu sličnost izolata *Monilinia* spp. **Poniatowska et al.** (2013) su na osnovu sekvenci ITS regiona izvršili molekularnu identifikaciju kojom je potvrđen identitet proučavanih izolata.

Molekularna karakterizacija obavljena je uparivanjem 18 sekvenci ITS rDNK genomnog regiona *Monilinia* spp. dobijenih u ovim istraživanjima sa 38 odabranih sekvenci vrsta roda *Monilinia* dostupnim u GenBank bazi podataka i rekonstrukcijom filogenetskog stabla. Analizom filogenetskog stabla uočena je podela na dva klastera koji se dalje dele na dve podgrupe i bliska veza između izolata vrste *M. fructicola* i *M. laxa* sa jedne, i *M. fructigena* i *M. polystroma* sa druge strane. Slično rezultatima u ovim

istraživanjima, korišćenjem univerzalnog para prajmera ITS1/ITS 4 **Zhu et al.** (2011) dobili su amplifikone veličine 537 do 538 bp od kojih je 421 informativan nukleotid upotrebljen za dalju analizu. Filogenetska analiza ITS sekvenci 39 izolata iz Kine i 57 izolata iz drugih delova sveta razdvojila je sve izolate u šest grupa, pri čemu je došlo do jasnog razdvajanja izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* poreklom iz Kine i poreklom iz drugih delova sveta. **Hu et al.** (2011a) su pored nukleotidne identičnosti između izolata *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. laxa* koristili ITS genomni region za filogenetsku analizu koja je pokazala jasno razdvajanje na grupe koje odgovaraju različitim vrstama ovog roda, ali sa niskim bootstrap vrednostima. U istraživanjima **Poniatowska et al.** (2013) filogenetska analiza 25 ITS sekvenci poreklom iz Poljske i sekvenci dostupnih u GenBank bazi podataka pokazala je grupisanje sekvenci u dva klastera koja se dele u dve podgrupe. U okviru prvog klastera jasno su se razdvojile grupe izolata koje pripadaju vrsti *M. polystroma* i *M. fructigena*, a u okviru drugog klastera *M. laxa* i *M. fructicola*. Ova istraživanja potvrdila su blisku vezu između izolata vrsta *M. fructicola* i *M. laxa* sa jedne, i *M. fructigena* i *M. polystroma* sa druge strane.

SSR markeri koje su razvili **Jansch et al.** (2012) pružili su uvid u genetičku strukturu i diverzitet novointrodotivane vrste *M. fructicola* na teritoriji Evrope. Analiza SSR markera velikog broja izolata poreklom iz više evropskih zemalja i iz SAD ukazuje na poreklo ispitivanih izolata, odnosno pokazuje da je vrsta *M. fructicola* na teritoriju Evrope dospela iz dva nezavisna pravca iz SAD - iz Kalifornije i iz istočnog dela SAD. Većina izolata *M. fructicola* izolovanih u Evropi (Španija, Francuska i Švajcarska) vodi poreklo iz Kalifornije, a pojedini izolati iz Evrope imaju specifične profile detektovane samo u tim zemljama. Analiza SSR markera izolata poreklom iz Srbije pokazala je da izolati detektovani u našoj zemlji na dva nezavisna lokaliteta imaju različito poreklo, iz Italije i SAD, s tim da je profil US50 osim u SAD detektovan i kod izolata iz Italije. Ovakva slika ukazuje na veliku verovatnoću da je do introdukcije *M. fructicola* u našu zemlju došlo kroz dve nezavisne introdukcije, po svemu sudeći razdvojene u vremenu i prostoru.



### 6.3. Rasprostranjenost vrsta roda *Monilinia* u Srbiji

Na osnovu proučenih morfoloških, odgajivačkih, ekoloških, patogenih i molekularnih karakteristika izolata dobijenih u okviru ovih istraživanja utvrđeno je da prva grupa od 237 izolata pripada fitopatogenoj gljivi *M. laxa*, druga grupa od šest izolata vrsti *M. fructigena*, dok je treća grupa od tri izolata identifikovana kao *M. fructicola*, koja je karantinski patogen za Srbiju. Dominantan prouzrokovatelj mrke truleži plodova i sušenja cvetova, grana i grančica koštičavog voća i nadaleko prevalentna u Srbiji je *M. laxa* (96,34%), dok je zastupljenost ostalih vrsta ovog roda znatno manja – *M. fructigena* (2,44%) i *M. fructicola* (1,22%), pri čemu prisustvo karantinskog patogena *M. fructicola* nije detektovano u zasadima. Slično našim rezultatima, utvrđeno je da je *M. laxa* dominantan patogen u mnogim zemljama Evrope, uključujući Mađarsku (Petróczy et al., 2012), Španiju (Muñoz et al., 2008; Villarino et al., 2012) i Grčku (Malandrakis et al., 2012).

Uprkos veoma obimnom prikupljanju uzoraka koji je uključio 119 lokaliteta i šest biljaka domaćina prisustvo *M. polystroma* na koštičavim voćkama u Srbiji nije dokazano, ali istraživanja će biti nastavljena i u narednom periodu.

### 6.4. Osetljivost izolata *Monilinia* spp. na fungicide

U istraživanjima sprovedenim u okviru ove disertacije, ispitivani fungicidi ispoljili su različit nivo toksičnosti na proučavane izolate vrsta roda *Monilinia*.

Svi ispitivani izolati, predstavnici sve tri vrste roda *Monilinia*, bili su ujednačeno osetljivi na tebukonazol u niskim koncentracijama. Dobijene  $EC_{50}$  vrednosti bile su u intervalu od 0,01 (izolat BMLEs, *M. laxa*) do 0,06 mg/l (NPGM, *M. fructicola*). Dobijeni rezultati saglasni su sa rezultatima Yoshimura et al. (2004) koji su utvrdili visoku osetljivost izolata *M. fructicola* na tebukonazol ( $EC_{50}$  0,0059-0,0607  $\mu$ g/ml). Takođe, Stević i Vukša (2006) ispitujući parametre osetljivosti izolata *M. laxa* utvrdili su  $EC_{50}$  za tebukonazol 14-41  $\mu$ g/kg. Međutim, treba uzeti u obzir istraživanja May-De Mio et al. (2011) koja su pokazala promene u osetljivosti populacija *M. fructicola* na tebukonazol; izolati *M. fructicola* prikupljeni tokom perioda 2000-2004. godine imali su znatno niže  $EC_{50}$  vrednosti (0,01-0,27  $\mu$ g/ml) od izolata prikupljenih tokom 2005-2008.

godine (0,01->100 µg/ml). Upravo zbog ovakve registrovane promene u populaciji *Monilinia* spp. od izuzetnog značaja je nastaviti redovan monitoring sa ciljem detekcije smanjene osetljivosti na ovaj fungicid.

Sa druge strane, zabeležena je razlika u osetljivosti izolata različitih vrsta na iprodion. Svi ispitivani izolati vrste *M. laxa* ispoljili su sličnu osetljivost na iprodion sa EC<sub>50</sub> vrednostima u intervalu od 0,13-0,22 mg/l. Za izolat vrste *M. fructigena* EC<sub>50</sub> vrednost bila je 0,85 mg/l, dok je najmanja osetljivost utvrđena za izolat *M. fructicola* (EC<sub>50</sub> 3,32 mg/l). Izolat *M. fructicola* korišćen u našim istraživanjima pokazao je znatno manju osetljivost u poređenju sa izolatima korišćenim u istraživanjima **Yoshimura et al.** (2004) koji su utvrdili EC<sub>50</sub> vrednosti u intervalu od 0,01 do 0,65 µg/ml, kao i u istraživanjima **Lim et al.** (2001) gde su EC<sub>50</sub> vrednosti bile 0,021-399 µg/ml.

Izolati sve tri vrste ispoljili su neznatne razlike u osetljivosti na hlorotalonil. Dobijene EC<sub>50</sub> vrednosti bile su u rasponu od 0,12 mg/l za izolat BPSV (*M. laxa*) do 1,06 mg/l za izolat NPGM (*M. fructicola*).

Ispitivani izolati različitih vrsta *Monilinia* spp. ispoljili su velike razlike u osetljivosti na boskalid. Izolati vrste *M. laxa* bili su ujednačeno osetljivi (EC<sub>50</sub> 0,04 mg/l - 0,09 mg/l), dok su izolati vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola* ispoljili znatno manju osetljivost na ovaj fungicid sa EC<sub>50</sub> vrednostima 250,36 mg/l i 464 mg/l. **Spiegel and Stammer** (2006) ispitujući osetljivost izolata *M. laxa* i *M. fructigena* na boskalid, utvrdili su da nema razlike u osetljivosti između izolata različitog geografskog porekla i preporučili su diskriminacionu koncentraciju od 2,5 ppm za detekciju rezistentnih izolata *Monilinia* spp. **Amiri et al.** (2010) utvrdili su osetljivost izolata *M. fructicola* na boskalid, EC<sub>50</sub> vrednosti bile su od 0,82 do 2,85 mg/l, ali i velike promene u osetljivosti između izolata izolovanih tokom dve različite godine. Osetljivost izolata bila je pet puta manja u odnosu na osetljivost izolata izolovanih dve godine ranije.

U istraživanjima u okviru ove disertacije zapažene su i velike razlike u osetljivosti na fluopiram kako među izolatima različitih vrsta, tako i među izolatima iste vrste. Najniža EC<sub>50</sub> vrednost od 0,11 mg/l zabeležena je za izolat VGRSD (*M. laxa*), dok je najveća EC<sub>50</sub> vrednost zabeležena za izolat VPBG (*M. fructigena*) (5612,28 mg/l).

Sa druge strane, **Hu et al.** (2011b) ispitivali su osetljivost izolata *M. fructicola* na boskalid i fluopiram i utvrdili da PDA podloga u koju je inkorporiran fungicid nije

pogodna za ispitivanje osetljivosti.  $EC_{50}$  vrednosti bile su više od 100  $\mu\text{g/ml}$  za pojedine izolate što nije saglasno sa rezultatima drugih autora kod kojih je utvrđena  $EC_{50}$  vrednost bila niža od 10  $\mu\text{g/ml}$  (Amiri et al., 2010). Kada su za ispitivanje osetljivosti izolata *M. fructicola* na boskalid i fluopiram upotrebili druge hranljive podloge dobili su potpuno drugačije rezultate;  $EC_{50}$  vrednosti na MM podlozi (minimal medium) za boskalid bila je 0,013-2,10  $\mu\text{g/ml}$ , a za fluopiram 0,059-15,6  $\mu\text{g/ml}$  (Hu et al., 2011b). U ovim istraživanjima za ispitivanje osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na boskalid i fluopiram korišćena je PDA podloga i nije zapažena heterogenost odgovora. Na osnovu rezultata u sklopu ove disertacije, kao i na osnovu rezultata Amiri et al. (2010) PDA podloga pogodna je za ispitivanje osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na boskalid i fluopiram s tim što je veoma je važno poštovati obavezu navođenja podloge na kojoj je testiranje izvedeno.

Izolati sve tri vrste ispoljili su visoku osetljivost na prohloraz; najniža  $EC_{50}$  vrednost zabeležena je za izolate ŠLJSV (*M. laxa*) i NPGM (*M. fructicola*) od 0,006 mg/l, dok je najnižu osetljivost ispoljio izolat VPBG (*M. fructigena*) sa  $EC_{50}$  vrednošću od 0,023 mg/l.

Svi ispitivani izolati pokazali su osetljivost na azoksistrobin u prisustvu SHAM-a; najniža  $EC_{50}$  vrednost od 0,51 mg/l zabeležena je za izolat ŠLJSV (*M. laxa*), dok je najveća  $EC_{50}$  vrednost zabeležena za izolat NPGM (*M. fructicola*) (8,83 mg/l). Amiri et al. (2010) takođe su ispitivali osetljivost različitih izolata *M. fructicola* na azoksistrobin u prisustvu SHAM-a i utvrdili  $EC_{50}$  vrednost koje su bile u intervalu od 0,09-0,27 mg/l. Isti autori utvrdili su tri puta nižu osetljivost na azoksistrobin u testovima rađenim 2008. godine u poređenju sa testovima rađenim 2006. godine.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja osetljivosti različitih izolata *Monilinia* spp. na fungicide različitih mehanizama delovanja može se zaključiti da su svi ispitivani izolati ispoljili visoku osetljivost na tebukonazol, hlorotalonil, prohloraz, iprodion i azoksitrobin, dok su razlike u osetljivosti izolata različitih vrsta na fluopiram i boskalid bile vrlo izražene. Takođe, može se zaključiti da su izolati vrste *M. laxa* najosetljiviji na sve ispitivane fungicide, dok je izolat *M. fructicola* najmanje osetljiv na sve ispitivane fungicide osim na fluopiram i prohloraz za koje se kao najmanje osetljiv pokazao izolat *M. fructigena*. Dalja istraživanja bi trebalo da pokažu da li se osetljivost na boskalid i fluopiram može koristiti kao dodatni marker za identifikaciju vrsta. U testu određivanja

minimalne letalne koncentracije utvrđeno je da su predstavnici sve tri vrste roda *Monilinia* veoma osetljivi na tebukonazol i prochloraz i da ovi fungicidi pri vrlo niskim koncentracijama (od 0,5 do 2 mg/l) deluju letalno na sve proučavane izolate. Najmanje toksični bili su boskalid i fluopiram koji ni pri koncentracijama višim od 1000 mg/l nisu potpuno inhibirali porast ispitivanih izolata.

### 6.5. Biološke mere borbe

Hemijsko suzbijanje osnovna je mera zaštite koštičavih voćaka od *Monilinia* spp. Međutim, primena pesticida često je ograničena zbog sve strožih zahteva u pogledu ostataka u poljoprivrednim proizvodima. Da bi se zadovoljili standardi proizvodnje bezbedne hrane brojna istraživanja usmerena su na pronalaženje alternative ili dopune sintetičkim pesticidima (**Bouchra et al.**, 2003). Primena mikroorganizama i njihovih metabolita, kao i supstanci prirodnog porekla, predstavlja prihvatljivo rešenje kako sa aspekta bezbednosti hrane, tako i sa aspekta zaštite životne sredine (**Elad et al.**, 1993; **Chao and Young**, 2000; **Roberts and Lohrke**, 2003). Biofungicidi pomažu u smanjenju upotrebe hemijskih sredstava, što u današnje vreme predstavlja veliku prednost i jedan od najvažnijih razloga njihove primene. Osim toga, biofungicidi smanjuju rizik od pojave fitotoksičnosti za biljke-domaćine kao i rizik razvoja rezistentnosti patogena.

Međutim, primena bioloških agenasa komplikovanija je od primene hemijskih jedinjenja, a spektar delovanja znatno je uži od spektra delovanja hemijskih jedinjenja. Za razliku od hemijskih jedinjenja koja deluju veoma brzo, populaciji biološkog agensa neophodno je vreme da dostigne potrebnu brojnost za postizanje vidljivih efekata. Osim toga, rok upotrebe biofungicida je kratak ukoliko se ne čuvaju pravilno. U većini slučajeva biološka sredstva su i skuplja od hemijskih (**Vico i Jurick**, 2012). Zatim, brojni faktori utiču na ispoljavanje biološkog dejstva antagonističkih mikroorganizama. Potrebno je da postoji interakcija između biljke domaćina, patogena, bioagensa i uslova spoljašnje sredine (**Raaijmaker et al.**, 1995). Takođe, brojna ispitivanja potvrđuju da postoji značajna razlika u delovanju antagonista u laboratorijskim ispitivanjima i delovanju kada se oni primenjuju *in vivo*, što je pokazano i u našim istraživanjima. Razlika je uslovljena količinom metabolita koju mikroorganizmi produkuju, a koji su

upravo i odgovorni za suzbijanje prouzrokovala bolesti. U poljskim uslovima produkcija metabolita znatno je niža, jer zavisi od brojnih fizičkih i hemijskih procesa koji se odvijaju u spoljašnjoj sredini (Engelkes et al., 1997). Pored navedenih, u literaturi se navode i drugi činioci koji utiču na stepen dejstva organizama koji se koriste kao bioagensi: temperatura, pH vrednost, sadržaj organske materije, organska đubriva i drugi (Duffy and Défago, 1997).

Uprkos brojnim poteškoćama u primeni preparata biološkog porekla, trenutno postoji više od 40 komercijalnih proizvoda koji se prodaju kao biofungicidi širom sveta (Vico i Jurick, 2012).

### 6.5.1. Antifungalni efekat etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp.

Ispitivanja *in vitro* efekta gasovite faze etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp. u okviru ovih istraživanja pokazala su da od 56 testiranih etarskih ulja samo sedam prouzrokuje potpunu inhibiciju porasta micelije sva tri testirana izolata pri koncentraciji od 0,04  $\mu\text{l/ml}$  vazduha i višoj. Najbolji efekat zabeležen je za pet ulja origana različitog porekla, ulje timijana i ulje limunove trave. Rezultati ovih istraživanja u saglasnosti su sa brojnim istraživanjima koja pokazuju da pare etarskih ulja origana, timijana, majorana, lavande, ruzmarina, žalfije, nane, lavande, bosiljka, kima, anisa i eukaliptusa inhibiraju porast različitih fitopatogenih gljiva (Isman, 2000; Daferera et al., 2003; Tanović et al., 2004; Arslan and Devis, 2010; Karamanoli et al., 2011), kao i sa našim prethodnim istraživanjima u kojima su ulja origana i ulje timijana ispoljila najjaču antifungalnu aktivnost (Hrustić i sar., 2011; Grahovac et al., 2012). U istraživanjima Liu et al. (2002) etarsko ulje timijana u niskim koncentracijama (2-4 mg/l) značajno je smanjilo razvoj mrke truleži koja se razvija na plodovima tokom skladištenja.

Za ulja koja su ispoljila najbolji efekat u ovim istraživanjima utvrđen je minimalni period ekspozicije za postizanje letalnog efekta pri datoj koncentraciji. Rezultati su pokazali da za sva ispitivana ulja pri najvećoj koncentraciji od 0,08  $\mu\text{l/ml}$  vazduha minimalni period ekspozicije je jedan dan, dok je za najnižu ispitivanu koncentraciju od 0,02  $\mu\text{l/ml}$  vazduha minimalni period ekspozicije od jednog dana zabeležen samo za ulje Origano E za izolat *M. fructigena*. Za vrste *M. laxa* i *M.*

*fruticola* minimalan period ekspozicije od dva dana pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 0,02 µl/ml vazduha zabeležen je za ulje Origano D.

Rezultati ispitivanja *in vitro* efekta gasovite faze etarskih ulja i određivanja MIC, MLC i MPC pokazali su da ulja origana i timijana ispoljavaju snažnu antimikrobnu aktivnost i da postoji opravdanost pokušaja formulisanja preparata na bazi ovih supstanci.

Ispitivanja *in vitro* efekata formulisanih etarskih ulja origana i timijana pokazala su da formulisana ulja ispoljavaju bolji efekat u odnosu na komercijalno dostupni preparat Timorex Gold i podjednako dobar efekat inhibicije porasta micelije u poređenju sa standardnim fungicidom, dok su *in vivo* testovi pokazali da ispitivane formulacije ostvaruju zaštitu plodova jabuke od vrsta roda *Monilinia* na istom nivou kao i komercijalni preparat Timorex Gold, a slabiju od standardnog preparata na bazi iprodiona.

#### 6.5.2. Uticaja različitih sojeva bakterije *Bacillus subtilis* na izolate *Monilinia* spp.

Najproučavanija vrsta bakterija koja se koristi za biološku zaštitu od fitopatogenih gljiva je *B. subtilis* (Asaka and Shoda, 1996; Brannen and Kenney, 1997; Krebs et al., 1998; Lin et al., 2001; Heins et al., 2002; Pinchuk et al., 2002), bakterija poznata duži niz godina po svojoj antimikrobnoj aktivnosti. *B. subtilis* koristi se kao aktivna supstanca nekoliko preparata koji su registrovani u svetu (Tomlin, 2009). Mnogi autori ukazali su na mogućnost upotrebe *B. subtilis* za suzbijanje vrsta roda *Monilinia*. Istraživanja Yáñez-Mendizábal et al. (2012) pokazala su da soj CPA-8 *B. subtilis* u poređenju sa komercijalno dostupnim preparatom Serenade na bazi *B. subtilis* soj QST-713 ima veći potencijal za suzbijanje prouzrokovača mrke truleži plodova. Pusey et al. (1984) i Altindag et al. (2006), ukazali su, takođe, na mogućnost primene *B. subtilis* u suzbijanja vrsta roda *Monilinia*. Sa druge strane, istraživanja Tanović i sar. (2005; 2010a) ističu nezadovoljavajuću efikasnost bifungicida na bazi *B. subtilis* u suzbijanju *B. cinerea* u poljskim uslovima, mada su rezultati laboratorijskih oglada bili obećavajući.

Rezultati ispitivanja uticaja različitih sojeva bakterije *B. subtilis* na izolate *Monilinia* spp. u *in vitro* uslovima, u okviru ove disertacije, pokazala su da *B. subtilis*

N146 ima veliki potencijal za suzbijanje vrsta roda *Monilinia*. Dodatno, rezultati *in vivo* eksperimenata potvrdili su da suspenzija *B. subtilis* N146 i obe suspenzije iz komercijalnih preparata statistički značajno smanjuju razvoj truleži inokulisanih plodova jabuke u odnosu na netretiranu kontrolu, kao i da se bolji efekat zaštite postiže u slučaju kada se inokulacija vrši neposredno nakon tretmana.

S obzirom da je *B. subtilis* N146 pokazao veliki potencijal za suzbijanje *Monilinia* spp. formulisani su biopreparati i utvrđen je njihov potencijal za suzbijanje vrsta roda *Monilinia*. Testiranja su pokazala da formulacija 3, formulisana kao suspo-emulzija ispoljava najjači inhibitorni efekat na sve tri vrste roda *Monilinia*.

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu obavljenih trogodišnjih istraživanja dobijeni su rezultati iz kojih se mogu izvesti sledeći zaključci:

\* Izolacijom patogena iz uzoraka obolelih biljnih delova koštičavih voćaka sa 119 lokaliteta u Srbiji i proučavanjem morfoloških (makroskopskih i mikroskopskih), patogenih, odgajivačkih i ekoloških karakteristika 246 izolata, utvrđeno je da je dominantan prouzrokovatelj mrke truleži plodova i sušenja cvetova, grana i grančica koštičavih voćaka u Srbiji *M. laxa* (96,34%), dok je zastupljenost ostalih vrsta ovog roda znatno manja – *M. fructigena* (2,44%) i *M. fructicola* (1,22%).

\* Prisustvo *M. fructicola* na koštičavim voćkama u Srbiji detektovano je po prvi put 2012. godine. Patogen nije pronađen u zasadu, ali dva nezavisna uzorka prikupljena sa lokalnih zelenih pijaca od domaćih proizvođača nedvosmisleno dokazuju prisustvo ovog patogena na teritoriji naše zemlje.

\* Tri vrste roda *Monilinia* mogu se razdvojiti na osnovu istovremene primene grupe morfoloških karaktera uključujući: izgled, oblik i boju kolonije, prisustvo spora i koncentričnog prstena spora u kulturi, brzinu porasta micelije, kao i veličinu konidija, načina klijanja konidija i dužinu kličine cevčice pre prvog grananja.

\* Svih 246 dobijenih monosporijalnih izolata *Monilinia* spp. je nakon tri dana od inokulacije ploda biljke domaćina prouzrokovalo trulež smeđe boje; sa inokulisanih plodova je obavljena reizolacija i dobijeni reizolati su po izgledu kolonije i morfologiji reproduktivnih tvorevina u potpunosti odgovarali izvornim izolatima čime je potvrđena patogenost izolata i ispunjeni Kohovi postulati.

\* Izolati *M. laxa* formiraju na PDA podlozi kolonije svetlo smeđe do sive boje oblika rozete, režnjevutih ivica, bez prisustva spora. Izolati *M. fructigena* obrazuju kolonije krem-žute boje, ravnih ivica, sa prisutnim retkim sporama, dok je kolonija izolata *M. fructicola* smeđe do sive boje sa izraženom sporulacijom i koncentričnim prstenovima spora, ravnih ivica.

\* Konidije izolata vrste *M. laxa* bile su dimenzija 11,25-15,42 x 8,25-11,07 µm i klijale su na WA podlozi i formirale kličine cevčice prosečne dužine 40 µm (20-70 µm) pre prvog grananja. Konidije koje su formirali izolati *M. fructigena* bile su u proseku najvećih dimenzija (19,25-23,50 x 11,92-13,50 µm) iz kojih je nastajalo



nekoliko kličinih cevčica prosečne dužine 197  $\mu\text{m}$  pre prvog grananja, dok su spore izolata *M. fructicola* bile prosečnih dimenzija 16,00-16,92 x 9,87-10,75  $\mu\text{m}$  i klijale su u kličine cevčice najveće dužine (prosečno 365  $\mu\text{m}$  pre grananja).

\* Najveći prosečni dnevni porast na PDA podlozi imao je izolat *M. fructicola*, dok je izolat vrste *M. fructigena* najsporije rastao. Praćenjem porasta izolata *Monilinia* spp. na pet različitih hranljivih podloga utvrđeno je da su izolati *M. laxa* i *M. fructigena* prosečno najveći porast ispoljili na MA podlozi, dok je za vrstu *M. fructicola* optimalan porast zabeležen na PDA podlozi. Svi ispitivani izolati rasli su na svim temperaturama uključenim u ispitivanje različitom brzinom, pri čemu je najveći broj ispitivanih izolata optimalan porast ispoljio na temperaturama od 23 do 28°C, dok su granične temperature porasta bile u intervalima od 2-4°C minimum i od 31-34°C maksimum.

\* Test unakrsne patogenosti odabranih izolata *Monilinia* spp. veštačkom inokulacijom povređenih plodova koštičavih voćaka pokazao je da svi ispitivani izolati bez obzira na poreklo prouzrokuju simptome na povređenim plodovima koštičavih voćaka, ali i da postoji velika razlika u virulentnosti kako između izolata različitih vrsta, tako i između izolata iste vrste.

\* Testovi patogenosti pokazali su da sve tri ispitivane vrste roda *Monilinia* mogu ostvariti infekciju plodova svih šest vrsta koštičavih voćaka kako kroz povrede, tako i kroz nepovređenu kutikulu ploda.

\* Multiplex PCR metoda, koja je prilagođena i primenjena u ovim istraživanjima za brzu identifikaciju vrsta roda *Monilinia*, bila je dovoljno specifična i pouzdana za izolate poreklom iz Srbije, čime se kvalifikovala za primenu u vidu protokola za brzu i pouzdanu molekularnu metodu detekcije. Kao rezultat multiplex PCR metode, korišćenjem prajmera MO368-5, MO368-8R, MO368-10R i Laxa-R2, amplifikovani su fragmenti nukleinske kiseline očekivane veličine: kod izolata *M. laxa* došlo je do amplifikacije fragmenta veličine 351 bp, fragmenti veličine oko 402 bp amplifikovani su kod izolata detektovanih kao *M. fructigena*, dok je do amplifikacije fragmenata veličine od 535 bp došlo kod izolata koji su detektovani kao vrsta *M. fructicola*.

\* Identitet izolata potvrđen je analizom sekvenci ITS rDNK genomnog regiona ispitanih izolata. Analiza 11 sekvenci *M. laxa* dobijenih u ovom istraživanju

pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama pet izolata vrste *M. laxa* poreklom iz Španije. Analiza četiri sekvence *M. fructigena* dobijenih u ovom istraživanju pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa 16 izolata *M. fructigena* poreklom iz različitih delova sveta, dok su sekvence izolata *M. fructicola* poreklom iz Srbije 100% identične sekvencama osam izolata *M. fructicola* deponovanih u GenBank bazi podataka.

\* Rekonstrukcija filogenetskog stabla na osnovu ITS regiona rDNK pružila je uvid u evolutivnu međupovezanost izolata *Monilinia* spp i ukazala na blisku vezu između izolata vrste *M. fructicola* i *M. laxa* sa jedne, i *M. fructigena* i *M. polystroma* sa druge strane.

\* SSR analiza pokazala je da se izolati *M. fructicola* poreklom iz Srbije razlikuju po dužini alela amplifikovanog jednim od primenjenih prajmera što je ukazalo da se izolati *M. fructicola* poreklom iz Srbije mogu podeliti u dve grupe i pripadaju različitim haplotipovima, poreklom iz Italije. Time je ustanovljeno da mogući put introdukcije ove vrste u Srbiju vodi iz Italije, i da je do introdukcije došlo najmanje dva puta.

\* Ispitivanja osetljivosti izolata *Monilinia* spp. na fungicide pokazala su da su izolati sve tri vrste najosetljiviji na prochloraz i tebukonazol, a da je visoka osetljivost utvrđena i na iprodion, hlorotalonil i azoksistrobin. Sa druge strane, uočena je jasna razlika između različitih vrsta roda *Monilinia* u osetljivosti na boskalid i fluopiram.

\* Izolati vrste *M. laxa* ispoljili su najveću osetljivost na sve ispitivane fungicide, dok je izolat *M. fructicola* najmanje osetljiv na sve ispitivane fungicide osim na fluopiram i prochloraz na koje je najmanje osetljiv bio izolat *M. fructigena*.

\* Testovi određivanja minimalne fungistatične i letalne koncentracije potvrdili su visoku osetljivost izolata na tebukonazol i prochloraz, dok hlorotalonil, boskalid, fluopiram i azoksistrobin ni pri koncentracijama većim od 1000 mg/l ne deluju letalno na ispitivane izolate.

\* Ispitivanja *in vitro* efekta gasovite faze etarskih ulja na izolate *Monilinia* spp. pokazala su da od 56 testiranih etarskih ulja samo sedam (pet ulja origana, ulje timijana i limunove trave) potpuno inhibira porast micelije izolata sve tri testirane vrste pri koncentraciji od 0,04 µl/ml vazduha i višoj. Pri koncentraciji primene ovih ulja od

0,08 µl/ml vazduha minimalan period ekspozicije kojim se postiže letalni efekat iznosi jedan dan.

\* Ispitivanja *in vitro* efekta formulisanih etarskih ulja origana i timijana pokazala su da formulisana ulja ispoljavaju bolji efekat u odnosu na komercijalno dostupan preparat ulja čajnog drveta i podjednako dobar efekat inhibicije porasta micelije u poređenju sa standardnim fungicidom iprodionom. Međutim, u testu *in vivo* ispitivane formulacije ostvaruju slabiju zaštitu plodova jabuke od vrsta roda *Monilinia* od iprodiona. Efekat formulisanih ulja je bio na istom nivou kao i komercijalni preparat čajnog drveta.

\* Rezultati ispitivanja uticaja različitih sojeva bakterije *B. subtilis* iz komercijalno dostupnih preparata i soja N146 na izolate *Monilinia* spp. u *in vitro* uslovima pokazuju da *B. subtilis* soj N146 ispoljava najjači antagonizam, dok rezultati *in vivo* eksperimenata potvrđuju da suspenzija *B. subtilis* N146 i dve suspenzije iz komercijalnih preparata statistički značajno smanjuju razvoj truleži inokulisanih plodova jabuke u odnosu na netretiranu kontrolu, kao i da se bolji efekat zaštite postiže u slučaju kada se inokulacija vrši neposredno nakon tretmana.

\* *In vitro* ispitivanja efekata formulacije 3 razvijene u ovom radu na *Monilinia* spp. potvrdila su visok potencijal ovog biopreparata za suzbijanje vrsta roda *Monilinia*. Rezultati su pokazali da i sirova suspenzija *B. subtilis* i formulacija 3 statistički značajno smanjuju razvoj truleži inokulisanih plodova jabuke u odnosu na netretiranu kontrolu. Dodatno, formulacija 3 bila je efikasnija od sirove suspenzije *B. subtilis*. Ipak, zabeležen je slabiji efekat zaštite u slučaju inokulacije plodova 24 h nakon tretmana za sve primenjivane tretmane, osim za standardni fungicid.

## 8. LITERATURA

- Adaskaveg, J.E., Förester, H. (2010): New developments in postharvest fungicide registrations for edible horticultural crops and use strategies. In: Prusky, D., Gullino, M.L. (eds). Postharvest pathology, Springer, pp. 107-119.
- Altindag, M., Sahin, M., Esitken, A., Ercisli, S., Guleryuz, M., Donmez, M.F., Sahin, F. (2006): Biological control of brown rot (*Monilinia laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholdria*, and *Pseudomonas* application under *in vitro* and *in vivo* conditions. Biological Control, 38: 369-372.
- Alvarez-Castellanos, P.P., Bishop, C.D., Pascual-Villalobas, M.J. (2001): Antifungal activity of the essential oil of flower head of garlant chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. Phytochemistry, 57: 99-102.
- Amiri, A., Scherm, H., Brannen, P.M., Schnabel, G. (2008): Laboratory evaluation of three rapid, agar-based assays to assess fungicide sensitivity in *Monilinia fructicola*. Plant Disease, 92: 415-420.
- Amiri, A., Brannen, P.M., Schnabel, G. (2010): Reduced sensitivity of *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. Plant Disease, 94: 737-743.
- Anonymous (2008): Diagnostic protocol for *Monilinia fructigena* (apple brown rot). [http://www.daff.gov.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0016/1061332/diag-protocol-apple-brown.pdf](http://www.daff.gov.au/_data/assets/pdf_file/0016/1061332/diag-protocol-apple-brown.pdf). datum pristupa: 15.04.2011.
- Anonymous (2011): Pesticidi u prometu u Srbiji. Biljni lekar, 39: 279-316.
- Arsenijević, M., Rudinski, I. (1969): Fungicidna vrednost Bakarnog kreča 25 i Cineba S-65 u suzbijanju *Monilia* sp. na višnjama. Agrohemija, 5-6: 189-191.
- Asaka, O., Shoda, M. (1996): Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology, 62: 4081-4085.
- Avenot, H.F., Sellam, A., Karaoglanidis, G., Michailides, T.J. (2008): Characterization of mutations in the iron - sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. Phytopathology, 98: 736-742.
- Avenot, H.F., Michailides, T.J. (2010): Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. Crop Protection, 29: 643-651.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils—A review. Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.

- Baker, R. et al. (2011): European Food Safety Authority. Online publication. EFSA Journal, 9: 2119. [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal). datum pristupa: 11.04.2012.
- Balaž, J. (2000): *Monilia* spp. kao parazit voćaka. Biljni lekar, 2-3: 155-162.
- Batra, L.R. (1979): First authenticated North American record of *Monilinia fructigena*, with notes on related species. Mycotaxon, 8: 476-484.
- Batra, L.R., Harada, Y. (1986): A field record of apothecia of *Monilinia fructigena* in Japan and its significance. Mycologia, 78: 913-917.
- Batra, L.R. (1991): World species of *Monilinia* (Fungi): their ecology, biosystematics and control. Mycologia Memoir No. 16.
- Beever, R.E., Brien, H.M.R. (1983): A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. New Zealand Journal of Agricultural Research, 26: 391-400.
- Biggs, A.R., Northover, J. (1988): Early and late-season susceptibility of peach fruits to *Monilinia fructicola*. Plant Disease, 72: 1070-1074.
- Borve, J., Stensvand, A. (2003): Use of a plastic rain shield reduces fruit decay and need for fungicides in sweet cherry. Plant Disease, 87: 523-528.
- Bosshard, E., Hilber-Bodmer, M., Scharer, H.J., Bunter, M., Duffy, B. (2006): First report of the quarantine brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on imported stone fruits in Switzerland. Plant Disease, 90: 1554.
- Brannen, P.M., Kenney, D.S. (1997): Kodiak – a successful biological control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19: 169-171.
- Brunner PC, Frey JE, 2004. Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Insecta, Thysanoptera). Molecular Ecology Notes 4, 599–601.
- Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L.M.I., Hmamouchi, M. (2003): Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers. Journal of Ethnopharmacology, 89: 165-169.
- Buchenauer, H. (1987): Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds. In: Lyr, H. (ed). Modern Selective Fungicides: properties, applications, mechanism of action. Gustav Fisher Verlag. Jena, Germany, pp. 205-232.
- Burnett, A.L., Lalancette, N., McFarland, K.A. (2010): Effect of QoI fungicides on colonization and sporulation of *Monilinia fructicola* on peach fruit and blossom blight cankers. Plant Disease, 94: 1000-1008.

- Byrde, R.J.W., Willettes, H.J. (1977): The brown rot fungi of fruit: their biology and control. Pergamon Press, Oxford.
- CABI, (2004): *Monilinia fructigena* (brown rot). Crop Protection Compendium. CAB International, Wallingford, UK.
- Carstens, E., van Niekerk, J.M., Laubscher, W., Fourie, P.H. (2010): Resolving the status of *Monilinia* spp. in South African stone fruit orchards. *Journal of Plant Pathology*, 92: 35-41.
- Casals, C., Viñas, I., Torres, R., Griera, C., Usall, J. (2010a): Effect of temperature and water activity on *in vitro* germination of *Monilinia* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 47-54.
- Casals, C., Teixidó, N., Viñas, I., Llauradó, S., Usall, J. (2010b): Control of *Monilinia* spp. on stone fruit by curing treatments Part I. The effect of temperature, exposure time and relative humidity on curing efficacy. *Postharvest Biology and Technology*, 56: 19-25.
- Chand-Goyal, T., Spotts, R.A. (1996): Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. *Biological Control*, 6: 253-259.
- Chao, S.C., Young, D.J. (2000): Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 630-649.
- Chen, F.P., Fan, J.R., Zhou, T., Liu, X.L., Liu, J.L., Schnabel, G. (2012): Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants. *Plant Disease*, 96: 416-422.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters L., Vlietinck, A.J. (2002): Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 213-220.
- Côté, M.J., Tardif, M.C., Meldrum, A.J. (2004): Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease*, 88: 1219-1225.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (2003): The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22: 39-44.
- Davidse, L.C. (1987): Biochemical aspects of benzimidazole fungicides-action and resistance. In: Lyr H. (ed.). *Modern selective fungicides*. Longman Scient. Technical, New York, pp. 53-59.

- Davidse, L.C., Ishii, H. (1995): Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In: Lyr, H. (ed.). *Modern Selective Fungicides – Properties, Applications, Mechanisms of Action*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, pp. 305-322.
- De Cal, A., M-Sagasta, E., Melgarejo, P. (1988): Antifungal substances produced by *Penicillium frequentans* and their relationship to the biocontrol of *Monilinia laxa*. *Phytopathology*, 78: 888-893.
- De Cal, A., Melgarejo, P. (1999): Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. *Plant Disease*, 83: 62-65.
- De Cal, A., Gell, I., Usall, J., Vinas, I., Melgarejo, P. (2009a): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in peach orchards in Ebro Valley, Spain. *Plant Disease*, 93: 763.
- De Cal, A., Larena, I., Liñan, M., Torres, R., Lamarca, N., Usall, J., Domenichini, P., Bellini, A., Eribe, X., Melgarejo, P. (2009b): Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 592-605.
- Detweiler, A.R., Vargas, J.M., Dannenberger, T.K. (1983): Resistance of *Sclerotinia homeocarpa* to iprodione and benomyl. *Plant Disease*, 67: 627-630.
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. (1995): *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000): Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- Drén, G., Szabó, Z., Soltész, M., Holb, I.J. (2007): Brown rot blossom blight and fruit rot of apricot in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 13: 139-141.
- Duduk, N., Obradović, A., Ivanović, M. (2010): Uticaj etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na porast micelije *Colletotrichum acutatum*. *Pesticidi i Fitomedicina*, 25: 151-156.
- Duchoslavová, J., Širucková, I., Zapletalová, E., Navrátil, M., Šafářová, D. (2007): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on various stone and pome fruits in the Czech Republic. *Plant Disease*, 91: 907.
- Duffy, B.K., Défago, G. (1997): Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology*, 87: 1250-1257.

- Edlich, W., Lyr, H. (1995): Mechanism of action of dicarboximide fungicides. In: Lyr H. (ed.). Modern selective fungicides. 2nd revised and enlarged edition. Gustav Fisher Verlag: Jena, Stuttgart, New York, pp. 119-131.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaqz, Y., Zuriel, S., Chet, I. (1993): Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathology, 42: 324-332.
- Elad, Y. (1994): Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. Crop Protection, 13: 35-38.
- Elmer, P.A.G., Spiers, T.M., Wood, P.N. (2007): Effects of pre-harvest foliar calcium sprays on fruit calcium levels and brown rot of peaches. Crop Protection, 26: 11-18.
- Emery, K.M., Michailides, T.J., Scherm, H. (2000): Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia. Plant Disease, 84: 853-857.
- Engelkes, C.A., Nucló, R.L., Fravel, D.R. (1997): Effect of carbon, nitrogen and C:N ratio on growth, sporulation and bio-control efficacy of *Talaromyces flavus*. Phytopathology, 87: 500-505.
- EPPO (2000): Distribution maps of plant diseases, No.22. Edition 6. CAB International, Wallingford, UK.
- EPPO (2002): First report of *Monilinia fructicola* in France. EPPO Reporting Service, 2002/003.
- EPPO (2003): EPPO standards, diagnostic protocols for regulated pests. EPPO Bulletin, 33: 245-247.
- EPPO (2006): *Monilinia fructicola*. Distribution maps of quarantine pest of Europe [http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Monilinia\\_fructicola/MONIFC\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Monilinia_fructicola/MONIFC_map.htm).
- EPPO (2009): Diagnostic protocols for regulated pests - *Monilinia fructicola*. EPPO Bulletin, 39: 337-343.
- EU Pesticide Database (2012): Active substances. Regulation (EC) No 1107/2009. [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/), datum pristupa: 11.04.2012.
- Fan, J.Y., Guo, L.Y., Xu, J.P., Luo, Y., Michailides, T.J. (2010): Genetic diversity of populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China. Journal of Eukaryotic Microbiology, 57: 206-212.
- FAOSTAT (2011): Food and Agriculture Organisation of the United Nations, <http://faostat3.fao.org/home/index.html>. datum pristupa: 21.05.2013.



- Filajdić, N., Vukša, P., Ivanović, M., Rekanović, E. (2003): Biološke mere zaštite bilja: problemi i perspektive. *Pesticidi i Fitomedicina*, 18: 69-75.
- Finney, M.A. (1964): *Probit analysis – A statistical treatment of the sigmoid response curve*. University Press, 2nd edition, Cambridge, UK.
- Fisher, N., Meunier, B. (2008): Molecular basis of resistance to cytochrome bcl inhibitors. *FEMS Yeast Research*, 8: 183-192.
- Förster, H., Adaskaveg, J.E. (2000): Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology*, 90: 171-178.
- Förster, H., Driever, G.F., Thompson, D.C., Adaskaveg, J.E. (2007): Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the “reduced-risk” fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Disease*, 91: 209-215.
- Fraaje, B.A., Lukas, J.A., Clark, W.S., Burnett, F.J. (2003): QoI resistance development in populations of cereal pathogens in the UK. The BCPC International Congress – Crop Science & Technology.
- FRAC (2004): QoI working group report. <http://www.frac.info>.
- FRAC (2005): Pathogen Risk List. Fungicide Resistance Action Committee. [http://www.frac.info/publication/anhang/FRAC\\_Pathogen\\_risk%20list.pdf](http://www.frac.info/publication/anhang/FRAC_Pathogen_risk%20list.pdf). datum pristupa: 01.03.2013.
- Fulton, C.E., van Leeuwen, G.C.M., Brown, A.E. (1999): Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 495-500.
- Gell, I., Cubero, J., Melgarejo, P. (2007): Two different PCR approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2629-2637.
- Gell, I., De Cal, A., Torres, R., Usall, J. Melgarejo, P. (2008): Relationship between the incidence of latent infections caused by *Monilinia* spp. and the incidence of brown rot of peach fruit: factors affecting latent infection. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 487-498.
- Gell, I., De Cal, A., Torres, R., Usall, J. Melgarejo, P. (2009): Conidial density of *Monilinia* spp. on peach fruit surfaces in relation to the incidences of latent infections and brown rot. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 415-424.
- Gibert, C., Chadoeuf, J., Nicot, P., Vercambre, G., Genard, M., Lescourret, F. (2009): Modelling the effect of cuticular crack surface area and inoculum density on the probability of nectarine fruit infection by *Monilinia laxa*. *Plant Pathology*, 58: 1021-1031.

- Grabke, A., Hu, M.J., Luo, C.X., Bryson, P.K., Schnabel, G. (2011): First report of brown rot of apple caused by *Monilinia fructicola* in Germany. *Plant Disease*, 95: 772.
- Grahovac, M., Inđić, D., Tanović, B., Lazić, S., Vuković, S., Hrutić, J., Gvozdenac, S. (2011): Integralna zaštita jabuka od prouzrokovala truleži u skladištima. *Pesticidi i Fitomedicina*, 26: 289-299.
- Grahovac, M., Hrutić, J., Tanović, B., Inđić, D., Vuković, S., Mihajlović, M., Gvozdenac, S. (2012): *In vitro* effects of essential oils on *Colletotrichum* spp. Book of Abstracts International Conference Role of Research in Sustainable Development of Agriculture and Rural Areas, Podgorica, Montenegro, pp. 135.
- Gullino, M.L., Gilardi, G., Tinivella, F., Garibaldi, A. (2004): Observations on the behaviour of different populations of *Plasmopara viticola* resistant to QoI fungicides in Italian vineyards. *Phytopathology Mediterranea*, 43: 341-350.
- Harman, J.E., Beever, D.J. (1987): The use of post-harvest fungicides to control storage rots in nectarines. *Orchardist of New Zealand*, 60: 384.
- Harada, Y., Nakao, S., Sasaki, M., Sasaki, Y., Ichihashi, Y., Sano, T. (2004): *Monilia mumecola*, a new brown rot fungus on *Prunus mume* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 70: 297-307.
- Harrington, T.C., Wingfield, B.D. (1995): A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia*, 87: 280-288.
- Hilber-Bodmer, M., Bünter, M., Patocchi, A. (2010): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on apricot in a Swiss orchard. *Plant Disease*, 94: 643.
- Holb, I.J., Schnabel, G. (2005): Effect of fungicide treatments and sanitation practices on brown rot blossom blight incidence, phytotoxicity, and yield for organic sour cherry production. *Plant Disease*, 89: 1164-1170.
- Holb, I.J. (2006): Possibilities of brown rot management in organic stone fruit production in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 12: 87-91.
- Holb, I.J. (2008): Brown rot blossom blight of pome and stone fruits: symptom, disease cycle, host resistance, and biological control. *International Journal of Horticultural Science*, 14: 15-21.
- Holst-Jensen, A., Kohn, L.M., Jakobsen, K.S., Schumacher, T. (1997): Molecular phylogeny and evolution of *Monilinia* (Sclerotiniaceae) based on coding and noncoding rDNA sequences. *American Journal of Botany*, 84: 686-701.
- Holtz, B.A., Michailides, T.J., Hong, C.X. (1998): Development of apothecia from stone fruit infected and stromatized by *Monilinia fructicola* in California. *Plant Disease*, 82: 1375-1380.

- Hong, C., Holtz, B.A., Morgan, D.P., Michailides, T.J. (1997): Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. *Plant Disease*, 81: 519-524.
- Hong, C.X., Michailides, T.J., Holtz, B.A. (1998): Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. *Plant Disease*, 82: 1210-1216.
- Hrustić, J., Tanović, B., Grahovac, M., Mihajlović, M., Delibašić, G., Vukša, P. (2011): *In vitro* i *in vivo* efekat etarskog ulja timijana na *Monilinia fructigena*. Zbornik rezimea radova XI savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, pp. 36-37.
- Hrustić, J., Tanović, B., Mihajlović, M., Grahovac, M., Delibašić, G., Bulajić, A. (2012a): *Monilinia* spp. causal agents of apple fruit rot. Book of Abstracts I International Symposium and XVII Scientific Conference of Agronomists of Republica Srpska, Trebinje, Bosnia and Herzegovina, pp. 192.
- Hrustić, J., Grahovac, M., Mihajlović, M., Delibašić, G., Ivanović, M., Nikolić, M., Tanović, B. (2012b): Molecular detection of *Monilinia fructigena* as causal agent of brown rot on quince. *Pesticides and Phytomedicine*, 27: 15-24.
- Hrustić, J., Tanović, B., Mihajlović, M., Delibašić, G., Stanković, I., Krstić, B., Bulajić, A. (2013a): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on nectarine in Serbia. *Plant Disease*, 97: 147.
- Hrustić J., Mihajlović M., Bulajić A., Krstić B., Stanković I., Delibašić G., Grahovac M., Tanović B. (2013b): Presence and distribution of brown rot in stone fruits in Serbia. Abstract Volume 11th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation, Bled, Slovenia, pp. 37.
- Hu, M.J., Cox, K.D., Schnabel, G., Luo, C.X. (2011a): *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *PLoS ONE*, 6(9): e24990.
- Hu, M.J., Luo, C.X., Grabke, A., Schnabel, G. (2011b): Selection of a suitable medium to determine sensitivity of *Monilinia fructicola* mycelium to SDHI fungicides. *Journal of Phytopathology* 159: 616-620.
- Hughes, K.J.D., Fulton, C.E., McReynolds, D., Lane, C.R. (2000). Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 507-511.
- Hughes, K.J.D. (2003): DNA extraction from mycological organisms. SOP PLHB/M26. Central Science Laboratory, York.
- Ioos, R., Frey, P. (2000): Genomic Variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena*, and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 373-378.

- Ishii, H. (1995): Monitoring of fungicide resistance in fungi: biological to biochemical approaches. In: Singh, S.U., Singh, P.R. (eds). *Molecular Methods in Plant Pathology*, Lewis Publisher, Boca Raton, FL, pp. 483-495.
- Ishii, H., Fraaije, B.A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., Hollomon, D.W. (2001): Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*, 91: 1166-1171.
- Isman, M.B. (2000): Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19: 603-608.
- Ivanović, M., Ivanović, D. (2001): Mikoze i pseudomikoze biljaka. P. P. De-eM-Ve, Beograd.
- Jansch, M., Frey, J.E., Hilber-Bodmer, M., Brogгинi, G.A.L., Weger, J., Schnabel, G., Patocchi, A. (2012): SSR marker analysis of *Monilinia fructicola* from Swiss apricots suggests introduction of the pathogen from neighbouring countries and the United States. *Plant Pathology*, 61: 247-254.
- Jevremović, V. (1976): Osetljivost sorti breskve na Moniliju (*Monilia* sp.) u uslovima Ruma-Irug. *Jugoslovensko voćarstvo*, 39/40: 639-643.
- Jones, A.L., Aldwinckle, H.S. (1990): Brown rot diseases. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. American Phytopathology Society Press. St. Paul, MN. pp. 100.
- Jordan, D.B., Livingston, R.S., Bisaha, J.J., Duncan, K.E., Pember, S.O., Picolletti M.A., Schwartz, R.S., Sternberger, J.A., Tang, X.S. (1999): Mode of action of famoxadone. *Pesticide Science*, 55: 105-118.
- Jordović, M. (1954): Osetljivost plodova nekih sorata bresaka prema parazitu *Monilia* sp. *Arhiv za poljoprivredne nauke*, 17: 96-99.
- Karabulut, O.A., Baykal, N. (2004): Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection*, 23: 431-435.
- Karabulut, O.A., Smilanick, J.L., Crisosto, C.H., Palou, L. (2010): Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments. *Crop Protection*, 29: 903-906.
- Kišpatić, J., Medin, A., Poparić, A., Kasap, G. (1976): *M. laxa* kao uzročnik sušenja mladice maraske. *Poljoprivredno znanstvena smotra*, 39: 317-320.
- Kišpatić, J., Maceljiski, M. (1989): *Zaštita voćaka*. Znanje, Zagreb.
- Klokočar-Šmit, Z., Đurić, T., Inđić, D., Peričević, D., Bočarov, A., Nikolić, N. (2003): Efekat *Bacillus subtilis* ST/III (BEC) u zaštiti i bioregulaciji nekih povrtarskih vrsta. *Zbornik rezimea Šestog savetovanja o zaštiti bilja*, Zlatibor, pp. 68.

- Köller, W., Parker, D.M., Turechek, W.W., Avila-Adame, C. (2004): A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. *Plant Disease*, 88: 537-544.
- Krebs, B., Hoding, B., Kubart, S., Workie, M.A., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Grosch, R., Bochow, H., Hevesi, M. (1998): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Disease and Protection*, 105: 181-197.
- Kuck, K.H., Scheinpflug, H., Pontzen, R. (1995): DMI fungicides. In: Lyr, H. (ed). *Modern Selective Fungicides: properties, applications, mechanisms of action*, 2<sup>nd</sup> revised and enlarged edition. Gustav Fisher Verlag, Jena-Stuttgart-NY, pp. 205-258.
- Kulka, M., Von Schmeling, B. (1995): Carboxin fungicides and related compounds. In: Lyr, H. (ed). *Modern Selective Fungicides*. Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany, pp. 133-147.
- Lane, C.R. (2002): A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 32: 489-493.
- Larena, I., Melgarejo, P. (1996): Biological control of *Monilinia laxa* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by a lytic enzyme-producing *Penicillium purpurogenum*. *Biological Control*, 6: 361-367.
- Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J.F., Ochoa De Eribe, X., Usall, J. (2005): Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control*, 32: 305-310.
- Lazar-Baker, E.E., Hetherington, S.D., Ku, V.V., Newman, S.M. (2011): Evaluation of commercial essential oil samples on the growth of postharvest pathogen *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey. *Letters in Applied Microbiology*, 52: 227-232.
- Leroux, P., Gredt, M. (1972): Etude de l' action in vitro des fongicides, methode de l' incorporation ou milieu. *Laboratoire de Phytopharmacie-CNRA-Versailles*, pp. 1-10.
- Leroux, P. (2004): Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Elad, Y., Williamson, B. Tudzynski, P. Delen, N. (eds). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 195-222.
- Lim, T.H., Yi, J.C., Chang, T.H., Cha, B. (2001): Fitness of dicarboximide-resistant and sensitive *Monilinia fructicola* isolated from peach in Korea. *Plant Pathology Journal*, 17: 205-209.

- Lim, T.H., Kim, J.H., Cha, B. (2006): Responses of peach blossom blight and brown rot fungus *Monilinia fructicola* to benzimidazole and diethofencarb in Korea. *Plant Pathology Journal*, 22: 1-6.
- Littley, E.R., Rahe, J.E. (1984): Specific tolerance of *Sclerotium cepivorum* to dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 68: 371-374.
- Liu, W.T., Chu, C.L., Zhou, T. (2002): Thymol and acetic acid vapors reduce postharvest brown rot of apricots and plums. *Horticulture Science*, 37: 151-156.
- Lučić, K. (2009): Sadržaj sredstava za zaštitu bilja 2009.g. *Glasnik zaštite bilja*, 1-2: 191-192.
- Lukač Bulatović, M. (2005): Tendencije promene strukture voćarske proizvodnje u Srbiji i Vojvodini. *Letopis naučnih radova*, 29: 60-69.
- Luo, Y., Ma, Z.H., Michailides, T.J. (2001): Analysis of factors affecting latent infection and sporulation of *Monilinia fructicola* on prune fruit. *Plant Disease*, 85: 999-1003.
- Luo, Y., Michailides, T.J. (2001): Risk analysis for latent infection of prune by *Monilinia fructicola* in California. *Phytopathology*, 91: 1197-1208.
- Luo, Y., Michailides, T.J. (2003): Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology*, 93: 102-111.
- Luo, Y., Michailides, T.J., Morgan, P.D., Krueger, W.H., Buchner, R.P. (2005): Inoculum dynamics, fruit infection, and development of brown rot in prune orchards in California. *Phytopathology*, 95: 1132-1136.
- Luo, C.X., Cox, K.D., Amiri, A., Schnabel, G. (2008): Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, 92: 1099-1103.
- Ma, Z., Yoshimura, M.A., Michailides, T.J. (2003a): Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7145-7152.
- Ma, Z., Felts, D., Michailides, T.J. (2003b): Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77: 66-74.
- Ma, Z.H., Yoshimura, M.A., Holtz, B.A., Michailides, T.J. (2005): Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Management Science*, 61: 449-457.
- Madrigal, C., Melgarejo, P. (1994): Mechanisms of action of the antibiotic fluvipin on *Monilinia laxa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research*, 98: 874-878.

- Malandrakis, A.A., Markoglou, A.N., Ziogas, B.N. (2012): PCR-RFLP detection of the E198A mutation conferring resistance to benzimidazoles in field isolates of *Monilinia laxa* from Greece. *Crop Protection*, 39: 11-17.
- Mari, M., Torres, R., Casalini, N., Lamarca, N., Mandrin, J.F., Lichou, I., Larena, I., De Cal, A., Melgarejo, P., Usall, J. (2007): Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 1271-1277.
- Mari, M., Martini, C., Guidarelli, M., Neri, F. (2012): Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biological Control*, 60: 132-140.
- May-De Mio, L.L., Luo, Y., Michailides, T.J. (2011): Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. *Plant Disease*, 95: 821-827.
- McPhee, W.J. (1980): Some characteristics of *Alternaria alternata* strains resistant to iprodione. *Plant Disease*, 64: 847-849.
- Meier, U. (1997): Entwicklungsstadien mono- und dikotiler Pflanzen, BBCH-Monograph, Blackwell Wissenschafte-Verlag Berlin.
- Melgarejo, P., Carrillo, R., M-Sagasta, E. (1985): Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. *Transaction for the British Mycological Society*, 85: 313-317.
- Merciera, V., Bussi, C., Plenet, D., Lescourret, F. (2008): Effects of limiting irrigation and of manual pruning on brown rot incidence in peach. *Crop Protection*, 27: 678-688.
- Michailides, T.J., Ogawa, J.M., Opgenorth, D.C. (1987): Shift of *Monilinia* spp. and distribution of isolates sensitive and resistant to benomyl in California prune and apricot orchards. *Plant Disease*, 71: 893-896.
- Michailides, T., Luo, Y., Ma, Z., Morgan, D.P. (2007): Brown rot of dried plum in California: new insights on an old disease. *APSnet Feature Story*, March 2007. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/BrownRot.aspx>.
- Miessner, S., Stammler, G. (2010): *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. *Journal of Plant Disease and Protection*, 117: 162-167.
- Miletić, N., Rekanović, E., Stević, M., Latinović, N., Miladinović, Z. (2003): Preliminarna ispitivanja biofungicida Polyversum (*Pythium oligandrum* Drechsler). *Zbornik rezimea Šestog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor*, pp. 63.
- Miller, P.M. (1955): V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology*, 45: 461-462.

- Munda, A., Viršček Marn, M. (2010): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* affecting peach orchards in Slovenia. *Plant Disease*, 94:166.
- Muñoz, Z., Moret, A., Bech, J. (2008): Morphological and molecular characterization of *Monilinia* sp. isolates and pathogenicity on apple. *Agrociencia*, 42: 119-128.
- Muntaňola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija. NIRO Književne novine, Beograd.
- Nikolić, D., Keserović, Z., Magazin, N., Paunović, S., Miletić, R., Nikolić, M., Milivojević, J. (2012): Stanje i perspektive razvoja voćarstva u Srbiji. Zbornik radova i apstrakata 14. kongresa voćara i vinogradara Srbije sa međunarodnim učešćem, Vrnjačka Banja, pp. 3-22.
- Nozawa, Y., Morita, T. (1986): Molecular mechanisms of antifungal agents associated with membrane ergosterol. Dysfunction of membrane ergosterol and inhibition of ergosterol biosynthesis. In: Iwata, K., Vanden Bossche, H (eds). *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 111-122.
- Ogawa, J.M., Manji, B.T., Schreder, W.R. (1975): *Monilinia* life cycle on sweet cherries and its control by overhead sprinkler fungicide applications. *Plant Disease Reporter*, 59: 876-880.
- Ogawa, J.M., Manji, B.T., Bose, E.A. (1981): Detection of benomyl resistant *Monilinia laxa* on apricot. *Phytopathology*, 71: 893.
- Ogawa, J.M., English, H. (1991): Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources Pub. 3345.
- Ogawa, J.M., Zehr, E.I., Bird, W. (1995): Brown rot. In: Ogawa, J.M., Zehr, E.I., Bird, G.W., Ritchie, D.F., Uriu, K., Uyemoto, J.K. (eds). *Compendium of Stone Fruit Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Ondejková, N., Hudecova, M., Bacigalova, K. (2010): First report on *Monilinia fructicola* in the Slovak Republic. *Plant Protection Science*, 46: 181-184.
- Pellegrino, C., Gullino, M.L., Garibaldi, A., Spadaro, D. (2009): First report of brown rot of stone fruit caused by *Monilinia fructicola* in Italy. *Plant Disease*, 93: 668.
- Perišić, M., Marković, S., Babović, M. (1976): Prilog proučavanju uzroka sušenja mladara višanja u rejonu Fruške Gore. *Zaštita bilja*, 136: 141-142.
- Petróczy, M., Palkovics, L. (2006): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on imported peach in Hungary. *Plant Disease*, 90: 375.
- Petróczy, M., Palkovics, L. (2009): First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 343-347.



- Petróczy, M., Szigethy, A., Palkovics, L. (2012): *Monilinia* species in Hungary: morphology, culture characteristics, and molecular analysis. *Trees*, 26: 153-164.
- Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Sorokulova, I.B., Verneuil, B, Urdaci, M.C. (2002): Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Research Microbiology*, 153: 269-276.
- Pommer, E.H., Lorenz, G. (1982): Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides - a literature review. *Crop Protection*, 1: 221-230.
- Poniatowska, A., Michalecka, M., and Bielenin, A. (2013): Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 135: 855-865.
- Pusey, P.L., Wilson, C.L. (1984): Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, 68: 753-756.
- Radman, Lj. (1967): *M. laxa* (Ehr.) Ader et Ruhl., kao značajan faktor smanjenja prinosa nekih sorti šljive. *Zaštita bilja*, 85-95.
- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., Van der Sluis, I., Schippers, B., Bakker, P.A.H.M. (1995): Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85:1075-1081.
- Ritchie, D.F. (1982): Effect of dichloran, iprodione, procymidone, and vinclozolin on the mycelial growth, sporulation, and isolation of resistant strains of *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, 66: 484-486.
- Roberts, D., Lohrke, S. (2003): Unated States Department of Agriculture - Agricultural research service research programs in biological control of plant diseases. *Pest Managment Science*, 59: 654-666.
- Robertson, J.L., Smith, K.L., Savin, N.E., Lavigne, R.J. (1984): Effects of dose selection and sample size on the precision of lethal dose estimates in dose-mortality regression. *Journal of Economic Entomology*, 77: 833-837.
- Rodgers, P.B. (1989): Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. *Pest Science*, 27: 155-164.
- Rüegg, J., Lauber, H.P., Siegfried, W., Viret, O., Hilber, U. (1997): Experiences with anilinyrimidines in Switzerland. *Pesticide Outlook*, 8: 28-33.
- Russell, P.E. (2005): Centenary review - A century of fungicide evolution. *Journal of Agriculture Science*, 143: 11-25.
- Sauter, H., Ammermann, E., Benoit, R., Brand, S., Gold, R.E., Grammenos, W., Kohle, H., Lorenz, G., Muller, B., Rohl, F., Schirmer, U., Speakman, J.B., Wenderoth, B., Wingert, H. (1995): Mitochondrial respiration as a target for antifungals: Lessons from research on strobilurins. In: Dixon, G.K., Copping, L.G.,

- Hollomon, D.W. (eds). Antifungal Agents: Discovery and Mode of Action. BIOS Scientific Publisher, Oxford, UK.
- Sauter, H., Steglich, W., Anke, T. (1999): Strobilurins: Evolution of a new class of active substances. *Angewandte Chemie International Edition*, 38: 1328-1349.
- Schnabel, G., Jones, A.L. (2001): The 14 $\alpha$ -demethylase (*CYP51A1*) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistance to myclobutanil. *Phytopathology*, 91: 102-110.
- Sholberg, P.L., Haag, P.D., Hambleton, S., Boulay, H. (2003): First report of brown rot in wine grapes caused by *Monilinia fructicola* in Canada. *Plant Disease*, 87: 1268.
- Snyder, L.C., Jones, A.L. (1999): Genetic variation between strains of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21: 70-77.
- Sonoda, R.M., Ogawa, J.M., Manji, B.T., Shabi, E., Rough, D. (1983): Factors affecting control of blossom blight in a peach orchard with low level benomyl-resistant *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, 67: 681-684.
- Spiegel, J., Stammler, G. (2006): Baseline sensitivity of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* to pyraclostrobin and boscalid. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113: 199-206.
- Stević, M., Vukša, P. (2006): Osetljivost *Monilinia laxa* (Ader. & Ruhl.) na fungicide različitog mehanizma delovanja. *Pesticidi i Fitomedicina*, 21: 297-304.
- Stojanović, D., Kostić, B. (1957): Prilog proučavanju vrsta *Monilia* na jabučastom i koštičavom voću. *Zaštita bilja*, 44: 69-72.
- Stojanović, D., Kostić, B. (1958): *Monilia fructigena* (Ader. et. Ruhl.) Honey na grožđu. *Zaštita bilja*, 46: 65-67.
- Stojanović, S. (2004): Poljoprivredna fitopatologija. Srpsko biološko društvo "Stevan Jakovljević" Kragujevac.
- Sződi, S.Z., Rozsnyay, Z., Rózsa, E., Turóczy, G. (2008): Susceptibility of sour cherry cultivars to isolates of *Monilia laxa* (Ehrenbergh) Saccardo et Voglino. *International Journal of Horticultural Science*, 14: 83-87.
- Sződi S.Z., Komjáti H., Turóczy G. (2012): Characterization of *M. laxa* and *M. fructigena* isolates from Hungary with MP-PCR. *Horticulture Science*, 39: 116-122.
- Takamura, N., Ochiai, M. (1989): Control of brown rot of peaches by bitertanol. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, 40: 77-80.

- Tamura, H., Mizutani, A. (1999): Mode of action of strobilurin fungicides. *Journal of Pesticide Science*, 24: 189-196.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Steker, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Tanović, B., Milijašević, S., Obradović, A., Todorović, B., Rekanović, E., Milikić, S. (2004): *In vitro* efekti etarskih ulja iz začinskih i lekovitih biljaka koji se prenose zemljištem. *Pesticidi i Fitomedicina*, 19: 233-240.
- Tanović, B., Rekanović, E., Potočnik, I., Todorović, I. (2005): Effectiveness of fungicides and biofungicides in the control of grey mould of raspberry in Serbia. Book of abstracts 9<sup>th</sup> International Rubus and Ribes Symposium, Santiago, Chile, pp. 31.
- Tanović, B., Delibašić, G., Hrustić, J. (2009): *In vitro* effect of essential oils from some aromatic and medicinal plants on apple fruit pathogens. Book of Abstracts VI Congress of Plant Protection with Symposium about Biological Control of Invasive Species, Zlatibor, pp. 37.
- Tanović, B., Hrustić, J., Delibasic, G., (2010a): Toxicity of volatile phase of essential oils from aromatic and medicinal plants to apple fruit pathogens *in vitro*. Book of Abstracts of 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress, Lisboa, Portugal, pp. 63.
- Tanović, B., Hrustić, J., Ivanović, M., Delibašić, G. (2010b): Effectiveness of biofungicides in the control of grey mould in raspberry in Serbia. Proceedings 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress, Lisboa, Portugal, pp. 17-18.
- Thomidis, T., Michailides, T., Exadaktylou, E. (2009): Contribution of pathogens to peach fruit rot in northern Greece and their sensitivity to iprodione, carbendazim, thiophanate-methyl and tebuconazole fungicides. *Journal of Phytopathology*, 157: 194-200.
- Thomidis, T., Exadaktylou, E. (2010): Effect of boron on the development of brown rot (*Monilinia laxa*) on peaches. *Crop Protection*, 29: 572-576.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Tomlin, C. (2009): *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council, Farnham.
- Trkulja, V. (1996): Vrste roda *Monilia*-Paraziti breskve i mogućnosti njihovog suzbijanja. *Biljni lekar*, 3: 531-539.

- van Leeuwen, G.C.M., van Kesteren, H.A. (1998): Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Canadian Journal of Botany*, 76: 2042-2050.
- van Leeuwen, G.C.M., Stein, A., Holb, I., Jeger, M.J. (2000): Yield loss in apple caused by *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey, and spatio-temporaldynamics of disease development. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 519-528.
- van Leeuwen, G.C.M., Baayen, R.P., Jeger, M.J. (2001): Pest risk assessment for countries of the European Union (as PRA area) on *Monilinia fructicola*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 31: 481-487.
- van Leeuwen, G.C.M., Holb I.J., Jeger, M.J. (2002a): Factors affecting mummification and sporulation of pome fruit infected by *Monilinia fructigena* in Dutch orchards. *Plant Pathology*, 51: 787-793.
- van Leeuwen, G.C.M., Yen, R.P.B., Holb, I.J., Jeger, M. (2002b): Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycological Research*, 106: 444-451.
- Vasiljević, Lj.(1955): Proučavanje nekih osobina *Monilia* spp. kod nas. *Zaštita bilja*, 32: 3-14.
- Vasić, M., Duduk, N., Ivanović, M.M., Obradović, A., Ivanović, M.S. (2012): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on stored apple in Serbia. *Plant Disease*, 96: 456.
- Vasić, M., Duduk, N., Ivanović, M.S. (2013): First report of brown rot caused by *Monilia polystroma* on apple in Serbia. *Plant Disease*, 97: 145.
- Veličković, M. (2002): Voćarstvo. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Vico, I., Jurick, W.M. (2012): Postžetvena patologija biljaka i biljnih proizvoda. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet.
- Vignutelli, A., Hilber-Bodmer, M., Hilber, U.W. (2002): Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*, 106: 329.
- Villani, S.M., Cox, K.D. (2011): Characterizing fenbuconazole and propiconazole sensitivity and prevalence of 'Mona' in isolates of *Monilinia fructicola* from New York. *Plant Disease*, 95: 828-834.
- Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., De Cal, A. (2010): Primary inoculum sources of *Monilinia* spp. in Spanish peach orchards and their relative importance in brown rot. *Plant Disease*, 94: 1048-1054.
- Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., Lamarca, N., De Cal, A. (2012): Secondary inoculum dynamics of *Monilinia* spp. and relationship to the

- incidence of postharvest brown rot in peaches and the weather conditions during the growing season. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 585-598.
- Vučinić, Z. (1993): Proučavanje ciklusa razvoja i rasprostranjenosti *Monilinia* spp. na koštičavim voćkama u Crnoj Gori. *Poljoprivreda i šumarstvo*, XXXIX 3-4: 5-18.
- Vučinić, Z. (1994): Monilioze voćaka. *Zaštita bilja*, 45: 5-17.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T. J. (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315-322.
- Wilson, E.E., Ogawa, J.M. (1979): Fungal, bacterial and certain non-parasitic diseases of fruit and nut crops in California. *Californian Agricultural Science Publications*, Berkeley, California, USA.
- Wilson, C.L., Soalr, J.M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M.E. (1997): Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81: 204-210.
- Wilson, C. (2011): Historical Perspective on Postharvest Biocontrol: past, present and future. *International Workshop on Postharvest Biological Control: Challenges and Opportunities*, Leesburg, VA, October 25-28.
- Wittig, H.P.P., Johnson, K.B., Psheidt, J.W. (1997): Effect of epiphytic fungi on brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. *Plant Disease*, 81: 383-378.
- Wong, F.P., Wilcox, W.F. (2002): Sensitivity to azoxystrobin among isolates of *Uncinula necator*: Baseline distribution and relationship to myclobutanil sensitivity. *Plant Disease*, 86: 394-404.
- Xu, X.M., Robinson, J.D. (2000): Epidemiology of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple: infection of fruits by conidia. *Plant Pathology*, 49: 201-206.
- Xu, X.M., Bertone, C., Berrie, A. (2007): Effects of wounding, fruit age and wetness duration on the development of cherry brown rot in the UK. *Plant Pathology*, 56: 114-119.
- Yáñez-Mendizábal, V., Zeriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Pérez-García A., Teixidó, N. (2012): Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 609-619.
- Yoshimura, M.A., Luo, Y., Ma, Z., Michailides, T.J. (2004): Sensitivity of *Monilinia fructicola* from stone fruit to thiophanate-methyl, iprodione, and tebuconazole. *Plant Disease*, 88: 373-378.

- Ypema, H.L., Gold, R.E. (1999): Kresoxim-methyl-modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease*, 83: 4-19.
- Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bianchi, A., Albasini, A. (1996): Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Phytopathology*, 144: 491-494.
- Zehr, E.I., Luszcz, L.A., Olien, W.C., Newall, W.C., Toler, J.E. (1999): Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole following prolonged exposure in peach orchards. *Plant Disease*, 83: 913-916.
- Ziogas, B.N., Baldwin, B.C., Young, J.E. (1997): Alternative respiration: A biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science*, 50: 28-34.
- Zhang, D., Lopez-Reyes, J.G., Spadaro D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2010): Efficacy of yeast antagonists used individually or in combination with hot water dipping for control of postharvest brown rot of peaches. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117: 226-232.
- Zhu, X.Q., Guo, L.Y. (2010): First report of brown rot on plum caused by *Monilia polystroma* in China. *Plant Disease*, 94: 478.
- Zhu, X.Q., Chen, X.Y., Guo, L.Y. (2011): Population structure of brown rot fungi on stone fruits in China. *Plant Disease*, 95: 1284-1291.

## BIOGRAFIJA

Hrustić Jovana rođena je 12. februara 1986. godine u Beogradu. Osnovnu školu i srednju Medicinsku školu završila je u Beogradu. Poljoprivredni fakultet, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, Univerziteta u Beogradu završila je 2009. godine odbranom diplomskog rad pod naslovom: „*In vitro* efekat etarskih ulja na prouzrokovaoče truleži ploda jabuke”.

Doktorske studije na istom fakultetu, na grupi Fitomedicina, upisala je 2009/10. godine. Od februara 2010. godine angažovana je u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun, kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a od oktobra 2012. godine zaposlena je u istom Institutu, u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju u zvanju istraživač-pripravnik.

Od februara 2010. godine bila je angažovana na realizaciji Projekata „Razvoj i unapređenje bioracionalnih metoda zaštite bilja od bolesti i štetočina”, TR20036, a od januara 2011. godine na Projektu III 46008 „Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane“. Oba projekta finansiralo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu 2011-2013. godine učestvovala je u realizaciji projekta bilateralne naučno-tehnološke saradnje između Republike Srbije i Republike Belorusije pod nazivom „Ispitivanje naučne opravdanosti biološke zaštite jabuke od prouzrokovaoča truleži plodova tokom skladištenja“.

Do sada je objavila i saopštila ukupno 41 naučni rad, od čega devet objavljenih u međunarodnim časopisima, četiri u nacionalnim časopisima, 28 saopštenih na međunarodnim i domaćim skupovima.

Obavila je kraća studijska putovanja u Belorusiju u okviru realizacije bilateralnog Projekta (2011. i 2013. godine) i u BIH u okviru EU COST Training School (COST Action FP1002) (2013. godine).

Govori, čita i piše engleski jezik.

Bila je član izvršnog odbora X International Rubus and Ribes Symposium, Zlatibor, Serbia, 2011. godine.

Član je Društva za zaštitu bilja Srbije.

## Izjava o autorstvu

Potpisana **Jovana Hrustić**

broj indeksa **37/09**

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Karakterizacija vrsta roda *Monilinia* patogeni koštičavih voćaka u Srbiji i osetljivost na fungicide“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 03.10.2013.

Jovana Hrustić



## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Jovana Hrustić**

Broj indeksa **37/09**

Studijski program **Poljoprivredne nauke Modul: Fitomedicina**

Naslov rada „**Karakterizacija vrsta roda *Monilinia* patogeni koštičavih voćaka u Srbiji i osetljivost na fungicide**“

Mentor **prof. dr Aleksandra Bulajić, vanredni profesor**  
Drugi mentor **dr Brankica Tanović, naučni saradnik**

Potpisana **Jovana Hrustić**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 03.10.2013.

Jovana Hrustić

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Karakterizacija vrsta roda *Monilinia* patogena koštičavih voćaka u Srbiji i osetljivost na fungicide“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim predlozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 03.10.2013.

Jovana Krstović