

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jovana D. Blagojević

**MORFO-FIZIOLOŠKA I MOLEKULARNA
KARAKTERIZACIJA
VRSTA RODA *ALTERNARIA*,
PATOGENA BILJAKA FAMILIJE BRASSICACEAE
U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jovana D. Blagojević

**MORPHO-PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF *ALTERNARIA* SPECIES,
PATHOGENS OF PLANTS OF THE FAMILY
BRASSICACEAE
IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentori:

dr Žarko Ivanović, viši naučni saradnik

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

dr Jelena Vukojević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Milica Ljaljević Grbić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane:

~ Zahvalnica ~

Ova doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije TR31018 – "Razrada integrisanog upravljanja i primene savremenih principa suzbijanja štetnih organizama u zaštiti bilja".

Hvala mentoru **dr Žarku Ivanoviću** za sve profesionalne i životne lekcije. Na šansi da se bavim nečim što zaista volim. Zahvalna sam za sve terene i slobodu tokom istraživačkog rada zahvaljujući kojoj sam imala prilike da iskusim i naučim mnogo toga.

Zahvaljujem mentorki profesorki **dr Jeleni Vukojević** za preneto znanje i dragocenu podršku tokom svih faza izrade ovog rada, za ogromno strpljenje i sve korisne savete tokom pisanja radova i ove disertacije.

Hvala na insistiranju, stavu i preciznosti u radu koje ću nadam se uspeti da implementiram.

Zahvaljujem se profesorki **dr Milici Ljaljević Grbić** za strpljenje i sve korisne savete tokom pisanja ove disertacije.

Zahvaljujem se profesorki **dr Mirjani Stajić** za podršku i uvek korisne savete.

Zahvaljujem se kolegama sa Instituta za zaštitu bilja, a posebno **dr Ani Anđelković**, i **Stefanu Stošiću**, dragocenim saborcima na putu doktorskih studija.

*

Hvala **dr Milici Milutinović**, **dr Milošu Brkušaninu**, **Mirjani Jovanović**, **Mariji Stojanović**, **dr Mirjani Novković** i **dr Tamari Marković**, mojim dragim prijateljima na trajanju, stpljenju, rečima i zagrljajima, deljenju znanja i podršci još od najranijih dana našeg studiranja.

*

Želim da se zahvalim **porodici Polimac**; **porodici Stojanović**, Momčilu i Marku, a posebno Mileni, koji su me prihvatili kao svoju i bili tu za mene u svakom trenutku pisanja ove disertacije; i posebno **porodici Polić**, Aci, Šemsi i Nikoli, i Postenju, za veliko prijateljstvo i sve ostalo što su mi pružili.

*

Hvala mojoj sestri **Simki** koju je situacija iznedrila kao prijatelja za ceo život, hvala za sav smeh, svu brigu, neverovatnu podršku, korisne savete i znanje koje je podelila sa mnom i sve one fenomenalne gif aplikacije i **dr Marku Ristiću** na ogromnoj podršci i veri u mene.

*

*Želim da se zahvalim mojoj najužoj porodici za sve što su uložili i za sve što su žrtvovali, mojoj najdražoj **sestri Ivani**, za svu podršku i безусловnu ljubav svih ovih godina,
Hvala **Draganu** i njoj što su mi dali najveći dar, našu **Lenu**,
Hvala mojoj **mami Svetlani** i mom **ocu Dušanu**,
hvala vam na beskrajnoj i безусловnoj podršci, razumevanju i brižnosti u svim trenucima i formama, u svakom mom naumu,
hvala što ste mi omogućili da budem ovde gde jesam, baš ovakva kakva jesam.*

*Želim da se zahvalim **Milutinu**,
Na putu koji smo prešli zajedno, na svim saznanjima, avanturama, našim velikim idejama i njihovim ostvarenjima, na jednoj novoj i boljoj stvarnosti koju smo stvorili.*

*

Mojoj Iskri, hvala za njenu samodovoljnost i što mi je ukazala poverenje da budem njena mama.

*

Ovaj doktorat posvećujem

*...mojoj dragoj Leni
...mojoj snagi i najvećem izazovu, mojoj Iskrici*

MORFO-FIZIOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA VRSTA RODA *ALTERNARIA*, PATOGENA BILJAKA FAMILIJE BRASSICACEAE U SRBIJI

SAŽETAK:

Biljke iz porodice Brassicaceae (kupusnjače) su rasprostranjene širom sveta i obuhvataju mnoge ekonomski, nutritivno i medicinski značajne vrste koje po obimu proizvodnje zauzimaju peto mesto u svetu. Obzirom na stalni nedostatak hrane u svetu, postoji kontinuirana potreba za povećanjem proizvodnje ovih biljnih kultura, a razvoj efikasnih strategija zaštite od patogena predstavlja važan cilj u njihovom gajenju. Fitopatogene vrste gljiva predstavljaju najznačajnije prouzrokovaoče bolesti kupusnjača, među kojima su i vrste roda *Alternaria*. U periodu od 2013. do 2016. godine, tokom obilazaka glavnih proizvodnih regiona kupusnjača u Srbiji, na 24 lokaliteta u 22 administrativna okruga, detektovani su tipični simptomi crne lisne pegavosti koje izazivaju *Alternaria* spp. Uočena je relativno visoka učestalost oboljenja za uljanu repicu (17-43%), ren (30-51%), kupus (22-53%), brokoli (15-34%), karfiol (14-28%), kelerabu (18-26%) i kelj (21-28%). Iz uzoraka biljaka sa simptomima bolesti identifikovano je 436 izolata *Alternaria* spp. Rezultati morfoloških i molekularnih analiza su potvrdili prisustvo 8 vrsta, prouzrokovaoča lisne pegavosti kupusnjača: *A. brassicae* (141 izolat), *A. brassicicola* (141 izolat), *A. japonica* (12 izolata), *A. alternata* (114 izolata), *A. arborescens* (12 izolata), *A. cheiranthi* (8 izolata), *A. nepalensis* (4 izolata) i *A. malvae* (4 izolata). Na osnovu filogenetske analize i genealoške mreže ispitivanih sekvenci *ITS*, *GAPDH*, *Alt a1* i *ATP* gena, potvrđeno je postojanje jednog multilokusnog haplotipa za *A. brassicae*, *A. cheiranthi* i *A. malvae*; tri haplotipa za *A. brassicicola*; po dva haplotipa za *A. japonica* i *A. arborescens*; dok je 20 haplotipova izdvojeno za *A. alternata*. Zavisnost distribucije haplotipova u odnosu na domaćina ili geografski region utvrđena je samo za neke delove haplotipske mreže izolata *A. alternata*, *A. brassicicola* i *A. japonica*. Na testiranim biljkama, najpatogenija je bila *A. brassicicola*, zatim *A. brassicae* i *A. japonica*, dok su ostale izolovane vrste *Alternaria* bile značajno manje patogene. Izolati *A. alternata* uglavnom su bili slabo patogeni, ali se izdvojila i grupa nepatogenih izolata, 15 izolata haplotipa 20 i 4 izolata haplotipa 4. Iako genetički različiti, patogeni i nepatogeni izolati *A. alternata* imali su visok stepen srodnosti, što sugeriše da su faktori patogenosti ili virulencije u ovoj filogenetskoj liniji nestabilniji nego što je slučaj kod ostalih vrsta. Biljke rena su bile najotpornije na infekciju *Alternaria* spp. pa tako vrste *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi* i *A. nepalensis* nisu pokazale virulentnost na ovom domaćinu. U svim ispitivanim slučajevima stariji listovi su bili više oštećeni od mladih, što ukazuje na različitu osetljivost biljaka prema bolesti u različitim razvojnim stadijumima. Pored svega navedenog, ispitivanja patogenosti na različitim domaćinima ukazala su na potencijal *Alternaria* spp. za unakrsnu infekciju različitih zasada kupusnjača. Zabeležene vrednosti stope rasta i intenziteta sporulacije izolata na 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C istakle su razlike u evolucionim strategijama između vrsta. Izolati *A. alternata* su imali najširi opseg optimalnih temperatura i najbržu stopu rasta, *A. brassicicola* najveći intenzitet sporulacije i visoku stopu rasta, dok su optimalne temperature za *A. brassicae* izolate bile niže, a plastičnost spora na različitim temperaturama najveća u poređenju sa drugim grupama. Takođe, zaključeno je da učestalost javljanja *A. brassicae* i *A. brassicicola* na renu, kupusu, brokoliju, kelerabi i kelju u Srbiji može biti povezana sa sezonskim fluktuacijama temperature. Na osnovu mikrosatelitskih lokusa za populacije *A. brassicicola* uočen je visok genetički diverzitet populacije, netipičan za vrste koje se aseksualno razmnožavaju. Uprkos visokom genetičkom diverzitetu ove vrste, prisutvo mutacija koje su odgovorne za promenu osetljivosti na fungicid azoksistrobin nisu detektovane. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju

prvo detaljno proučavanje *Alternaria* spp. na kupusnjačama u Srbiji. Imajući u vidu da su do sada uglavnom vrste *A. brassicae* i *A. brassicicola* smatrane za uzročnike crne pegavosti na kupusnjačama, dobijeni rezultati nesumnjivo ukazuju na više patogena, kao i na neophodnost detaljnog poznavanja prouzrokovaca kako bi se razumela epidemiologija i uspostavila najbolja strategija za efikasno suzbijanje bolesti prouzrokovane vrstama roda *Alternaria*.

KLJUČNE REČI: kupusnjače, morfologija, identifikacija, *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis*, *A. malvae*, patogenost, epidemiologija, multigenska karakterizacija.

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Algologija i mikologija

UDK:

MORPHO-PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *ALTERNARIA* SPECIES, PATHOGENS OF PLANTS OF THE FAMILY BRASSICACEAE IN SERBIA

ABSTRACT:

The plants from family Brassicaceae are distributed throughout the world, consisting of a wide range of economically, nutritionally and nutraceutically important crops, ranking 5th in the global production. The global demand for cruciferous plants makes it one of the fastest-growing crops in production with a need for increasing growing area and productivity, both of which depend on effective pathogen control strategies. Fungal pathogens causing leaf spot disease are one of the most limiting factors for growing *Brassica* crops and *Alternaria* spp. cause serious losses throughout the world. During the survey, period 2013-2016, a typical *Alternaria*-induced dark leaf spot lesions were noticed at 24 localities of 22 administrative districts of major production areas of the cruciferous crops in Serbia. From the symptomatic plants, 436 isolates of *Alternaria* spp. have been collected and estimated incidence of disease was relatively high, for rapeseed (17-43%), horseradish (30-51%), cabbage (22-53%), broccoli (15-34%), cauliflower (14-28%), kohlrabi (18-26%) and kale (21-28%). In this study, morphological, molecular and pathogenic analyses were congruent and identified 8 pathogens causing leaf spot disease: *A. brassicae* (141 isolates), *A. brassicicola* (141 isolates), *A. japonica* (12 isolates), *A. alternata* (114 isolates), *A. arborescens* (12 isolates), *A. cheiranthi* (8 isolates), *A. nepalensis* (4 isolates) and *A. malvae* (4 isolates). Multigenetic analyses and haplotype network of *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH*, and *ATP* sequences revealed: one multilocus haplotype for *A. brassicae*, *A. cheiranthi* and *A. malvae*; three haplotype groups for *A. brassicicola*; two for *A. japonica* and *A. arborescens*; and 20 haplotypes for *A. alternata* isolates. The haplotype distribution dependency on host or geographical regions was confirmed only for some parts of haplotype network of *A. alternata*, *A. brassicicola* and *A. japonica* isolates. The pathogenicity test showed that *A. brassicicola* was the most virulent, *A. brassicae* and *A. japonica* exhibited the same level of pathogenicity, while the other species showed less pathogenic capability for tested plants. *A. alternata* population was generally weakly pathogenic with two non-pathogenic groups, 15 isolates of haplotype 20 and 4 isolates of haplotype 4. Although these groups of pathogenic and non-pathogenic isolates were genetically separated, the analyses showed they are closely related, suggesting that pathogenicity or virulence factors are more unstable in this phylogenetic lineage. The difference in susceptibility among plants was indicated, where horseradish plants were the most resistant, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi* and *A. nepalensis* have not shown virulence on this host. Old leaves were more severely affected than young leaves in all cases, indicating an age-related difference in the susceptibility of the plants. All species indicated potential for cross-infection, and the same haplotypes of particular species were isolated from different cruciferous hosts in Serbia, suggesting the presence of one persistent *Alternaria* population on multiple *Brassica* hosts in the region. The data recorded on rate of growth and sporulation intensity of isolates at 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C and 40 °C revealed significant differences in evolutionary strategies among species: *A. alternata* had the widest optimum range and the fastest growth rate; *A. brassicicola* showed the highest sporulation intensity and high growth rate; and *A. brassicae* expressed lower optimum temperatures for sporulation and significant plasticity of spore dimensions compared to the other species. Temperature response and prevalence of species in the field suggested that incidence of *A. brassicae* and *A. brassicicola* species was related to seasonal temperature fluctuations in the all tested hosts except rapeseed. Analysis of microsatellite loci revealed high genetic diversity of *A. brassicicola*, not a common feature for species in which only asexual reproduction was noticed. Although high genetic diversity was detected in *A. brassicicola*, changes in azoxystrobin sensitivity were not found, as molecular screening of

cytB gene did not indicate the presence of mutations. This dissertation presents the first detailed study of *Alternaria* spp. in the cruciferous crops in Serbia and points out the necessity of proper identification and characterization in order to understand pathogen epidemiology and strategies in effective disease management.

KEY WORDS: *Brassica*, morphology, identification, *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis*, *A. malvae*, pathogenicity, epidemiology, multilocus phylogeny.

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Algology and Mycology

UDK:

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Familija Brassicaceae	1
1.2. Najznačajniji predstavnici familije Brassicaceae.....	2
1.3. Bolesti biljaka familije Brassicaceae	5
1.4. Vrste roda <i>Alternaria</i> i njihov značaj	7
1.4.1. Patogenost i patogeneza vrsta roda <i>Alternaria</i>	7
1.4.2. Taksonomija i nomenklatura roda <i>Alternaria</i>	10
1.5. Gubici u prinosu kupusnjača uzrokovani patogenim vrstama roda <i>Alternaria</i>	13
1.6. Proučavanja genetičke varijabilnosti <i>Alternaria</i> populacija – značaj i upotreba mikrosatelita.....	14
1.7. Mere suzbijanja i kontrole patogenih vrsta roda <i>Alternaria</i>	15
1.7.1. Hemijske mere zaštite	15
1.7.2. Biološke mere zaštite.....	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	18
3. MATERIJAL I METODE	19
3.1. Sakupljanje biljnog materijala sa simptomima bolesti.....	19
3.2. Izolacija patogena i dobijanje čistih kultura	19
3.3. Analize morfoloških osobina izolata <i>Alternaria</i> spp.....	19
3.4. Analize fizioloških osobina izolata <i>Alternaria</i> spp.....	20
3.4.1. Hranljive podloge za testiranje rasta, intenziteta sporulacije i dužine konidija.....	20
3.4.2. Opseg testiranih temperatura za rast, intenzitet sporulacije i dužinu konidija.....	20
3.5. Provera patogenosti i potencijalnih biljaka domaćina	21
3.6. Molekularne metode za identifikaciju i karakterizaciju izolata	21
3.6.1. DNK ekstrakcija.....	21
3.6.2. Lančana reakcija polimeraze.	22
3.6.3. Prečišćavanje PCR produkata.....	23
3.6.4. Molekularna identifikacija <i>Alternaria</i> spp.....	23
3.6.5. Konstrukcija genealoške mreže i filogenetskih stabala.....	24
3.7. Analiza mikrosatelitskih markera <i>Alternaria brassicicola</i>	24
3.8. Analiza prisustva mutacija <i>cytB</i> gena kod izolata <i>Alternaria brassicicola</i>	25
3.9. Ispitivanje antagonističkog delovanja saprobnih izolata gljiva sa kupusnjača na patogene <i>Alternaria brassicae</i> i <i>A. brassicicola</i>	26
3.9.1. Izolacija i identifikacija mikromiceta za testiranje antagonističkog delovanja.....	26

3.9.2. <i>In vitro</i> ispitivanje inhibitornog efekta antagonista	26
3.9.3. <i>In vivo</i> ispitivanje inhibitornog efekta antagonista.....	27
3.10. Statistička obrada podataka.....	27
4. REZULTATI	28
4.1 Simptomi lisne pegavosti na kupusnjačama u Srbiji	28
4.2. Uzorkovanje i izolacija patogena izazivača pegavosti lista kupusnjača	28
4.3. Morfološke karakteristike izolata <i>Alternaria</i> spp. na V8 hranljivoj podlozi i identifikacija	30
4.4. Ispitivanje fizioloških osobina izolata <i>Alternaria</i> spp.	34
4.4.1. Uticaj hranljivih podloga na rast, intenzitet sporulacije i dimenzije konidija.....	34
4.4.2. Uticaj temperature na rast, intenzitet sporulacije i dimenzije konidija.....	40
4.5. Patogenost ispitivanih <i>Alternaria</i> spp.	44
4.5.1. Patogenost <i>A. brassicicola</i>	44
4.5.2. Patogenost <i>A. japonica</i>	47
4.5.3. Patogenost <i>A. brassicae</i>	47
4.5.4. Patogenost <i>A. alternata</i>	48
4.5.5. Patogenost <i>A. arborescens</i>	48
4.5.6. Patogenost <i>A. cheiranthi</i>	49
4.5.7. Patogenost <i>A. nepalensis</i>	49
4.5.8. Patogenost <i>A. malvae</i>	49
4.5.9. Statistička analiza testa patogenosti	49
4.6. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata <i>Alternaria</i> spp.	52
4.6.1. Molekularna identifikacija izolata	52
4.6.2. Konstrukcija haplotipskih mreža.....	55
4.6.3. Konstrukcija filogenetskih stabala	62
4.7. Ispitivanje mikrosatelitskih markera <i>Alternaria brassicicola</i>	64
4.8. Ispitivanje prisustva mutacija <i>cytB</i> gena kod izolata <i>Alternaria brassicicola</i>	67
4.9. Antagonističko delovanje <i>Trichoderma harzianum</i> i <i>Fusarium lateritium</i> na patogene <i>Alternaria brassicae</i> i <i>A. brassicicola</i>	68
4.9.1. Izolacija i identifikacija <i>T. harzianum</i> i <i>F. lateritium</i>	68
4.9.2. <i>In vitro</i> delovanje <i>T. harzianum</i> i <i>F. lateritium</i> na rast <i>A. brassicae</i> i <i>A. brassicicola</i> ..	68
4.9.3 <i>In vivo</i> delovanje <i>T. harzianum</i> i <i>F. lateritium</i> na patogenost <i>A. brassicae</i> i <i>A. brassicicola</i>	69
5. DISKUSIJA.....	72
5.1. Simptomi koje izazivaju patogene vrste roda <i>Alternaria</i> na kupusnjačama i učestalost javljanja	72

5.2. Pouzdanost morfoloških kriterijuma za identifikaciju vrsta roda <i>Alternaria</i>	73
5.3. Fiziološke osobine <i>Alternaria</i> spp.....	74
5.3.1. Značaj sastava podloge na rast i sporulaciju	74
5.3.2. PCA analiza	76
5.3.3. Značaj <i>in vitro</i> testiranja temperature.....	77
5.4. Razlike u patogenosti studiranih vrsta roda <i>Alternaria</i>	78
5.5. Uticaj različitih faktora na preživljavanje i uspešnost patogena	80
5.6. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata <i>Alternaria</i> spp.	81
5.7. Analiza mikrosatelitskih markera <i>Alternaria brassicicola</i>	82
5.8. Proučavanja prisustva mutacija <i>cytB</i> gena	83
5.9. <i>Trichoderma harzianum</i> i <i>Fusarium lateritium</i> , antagonisti razvoja <i>Alternaria brassicae</i> i <i>A. brassicicola</i>	84
5.9.1. Inhibicija razvoja <i>A. brassicae</i> i <i>A. brassicicola</i> pod uticajem <i>T. harzianum</i>	84
5.9.2. Inhibicija razvoja <i>A. brassicae</i> i <i>A. brassicicola</i> pod uticajem <i>F. lateritium</i>	85
6. ZAKLJUČAK.....	87
7. LITERATURA.....	89

1. UVOD

1.1. Familija Brassicaceae

Familija krstašica ili kupusnjača (Cruciferae, Brassicaceae) obuhvata mnoge ekonomski važne kosmopolitske vrste koje naseljavaju raznovrsna staništa, mada se najveći broj vrsta nalazi u borealnom i umerenom pojasu severne Zemljine hemisfere (Price i sar., 1994). Biljke iz fam. Brassicaceae su jedne od najstarijih i danas najčešće gajenih vrsta povrća i po produkciji zauzimaju peto mesto u svetu (Marhold i Lihová, 2006). To su povrtarske, uljane i krmne kulture koje se odlikuju velikom raznovrsnošću i koje su zbog visokog sadržaja vitamina C, karotenoida, flavonoida i drugih antioksidanasa, esencijalnih aminokiselina i mineralnih materija, biljke visoke biološke vrednosti (Koike i sar., 2007). Kupusnjače predstavljaju monofiletsku grupu, koja obuhvata oko 330 rodova i 3700 vrsta (Al-Shehbaz i sar., 2006; Marhold i Lihová, 2006).

Nastanak i poreklo biljaka iz familije Brassicaceae vezuje se za epohu eocena i područje Irana i Turanske nizije odakle su se, kako se pretpostavlja, dalje širile (Franzke i sar., 2011). Prema Saharan i sar. (2016) kupusnjače su jedne od najranije domestifikovanih biljaka. Neki izvori navode da su se kupusnjače gajile i pre 8000 godina u primorskim delovima evropskog kontinenta dok prvi sanskritski zapisi o upotrebi kupusnjača datiraju oko 2000-1500 godine pre nove ere (Al-Shehbaz i sar., 2006). Prvi konkretni podaci o kupusnjačama potiču iz antičkog perioda kada su po Teofrastu u širokoj upotrebi bile tri sorte kupusa: divlji, kupus sa glatkim listovima i kupus sa naboranim listovima. Takođe, grčki, rimski i kineski zapisi iz 500-200 godina pre nove ere svedoče o širokoj upotrebi ovih biljaka u medicinske svrhe (Prakash i Hinata, 1980). Kupusnjače spadaju u najranije domestifikovane biljke a danas se različite vrste mogu sresti u primorskim oblastima Evrope, Azije i Severne Amerike (Al-Shehbaz i sar., 2006; Saharan i sar., 2016). Mnogi divlji varijeteti *Brassica nigra* i *B. oleracea* se mogu sresti kao korovske vrste pored puteva i u kultivisanim poljima manjih, izolovanih oblasti Rodosa, Sicilije, Turske, Maroka, Etiopije, Krita i Turske (Tsunoda, 1980). Usled duge istorije gajenja i kultivisanja ovih vrsta, areal je proširen na teritorije svih kontinenata, a prema Anjum i sar. (2012) neke vrste žive i u slatkoj vodi ili čak na serpentinu i dolomitu koji su bogati magnezijumom.

Vrste iz familije Brassicaceae su uglavnom jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, retko žbunovi, sa jednostavnim, ponekad duboko urezanim, naizmenično ili spiralno raspoređenim listovima. Kod mladih biljaka listovi su često organizovani u formu rozete. Stabljike mogu biti uspravne ili polegle, uglavnom su zeljaste, ali ponekad i drvenaste. Cvetovi formiraju grozdaste ili nešto ređe metličaste cvasti ili štitove, ili obrazuju pojedinačne cvetove na cvetnim drškama u osnovi rozete (Warwick, 2011). Cvetovi su dvopolni, aktinomorfno simetrični, sa izuzecima zigomorfne simetrije. Cvet grade četiri čašična i četiri krunična listića koji su unakrsno raspoređeni, zbog čega cela familija nosi ime Krstašice (Cruciferae, lat. *crux* - krst). Kao važan kriterijum pri determinaciji vrsta koristi se morfologija izraštaja koji se obrazuju na prašničkim koncima. Plod ove grupe biljaka je različitog izgleda i građe, pa se tako može sresti izduženi tip ljuske, člankovita ljuska, orašica, ljusčica ili čahura (Warwick, 2011).

Pored široke gastronomske upotrebe, različite vrste Brassicaceae se od davnina koriste i u medicinske svrhe. Ukus i lekovitost kupusnjača uglavnom je povezana sa sadržajem jedinjenja sumpora poznatih kao glikozinolati i njihovim hidrolitičkim proizvodima (Murillo i Mehta, 2001). Svaka vrsta sadrži različit profil ovih jedinjenja, a do danas je identifikovano oko 15 različitih grupa glikozinolata (Vig i sar., 2009). Prema strukturi bočnog lanca koji

potiče od aminokiseline, glikozinolati se mogu podeliti na alifatske (nastale iz metionina, izoleucina, leucina i valina), indolne (nastali iz triptofana) i aromatske (nastali iz fenilalanina i tirozina). Jedne od najviše izučavanih supstanci sa hemoprotektivnim delovanjem su indol-3-karbinol i derivat 3,3'-diindolilmetan koji svoj efekat ostvaruju delujući na enzime kao što su kaspaza i ciklin zavisna kinaza, čime utiču na regulaciju ćelijskog ciklusa, metabolizam estrogena i ekspresiju više gena među kojima je npr. *BRCA (breast cancer gene)* (Yuan i sar., 2008). Osim glukobrasicina koji se može naći kod skoro svih kupusnjača, one sadrže i mnoge druge nevitaminske i nemineralne komponente koje imaju pozitivan efekat na zdravlje ljudi kao što su sinirgin, flavonoidi, kvercetin, kaempferola, α - i β -amirin – od kojih sve mogu imati antikancerogenu aktivnost (Mazumder i sar., 2016). Važno je istaći da sve ove fitohemikalije imaju sinergistički efekat koji rezultuje antikancerogenim, antioksidativnim, antiinflamatornim i kardioprotektivnim delovanjem (Han i sar., 2014). Epidemiološke studije na kupusnjačama koje se sprovode već skoro pola veka potvrdile su njihovo delovanje u prevenciji kancera dojke, jajnika, prostate, pluća i kancera vezanih za gastrointestinalni trakt (Han i sar., 2014).

Pored nutritivnog i lekovitog značaja treba istaći da preko stotinu vrsta kupusnjača akumulira teške metale i metaloide, posebno cink i nikl, a neke su i metal - hiperakumulatori (kao što su rodovi *Alyssum*, *Thlaspi* i *Arabidopsis*). Upravo proces fitoremedijacije predstavlja najjeftiniji i ekološki najprikladniji metod za čišćenje i pripremu zemljišta za obradu, čime se poboljšava kvalitet i prinos kultura (Szczygłowska i sar., 2011).

Savremena molekularna proučavanja su pokazala da uprkos velikom broju rodova i vrsta, predstavnici fam. Brassicaceae imaju jedan od najmanjih genoma u grupi Angiosperma (manje od 3,425 miliona baznih parova po ćeliji) (Al-Shehbaz i sar., 2006). Evolucija ovako malog genoma tokom istorije se uglavnom zasnivala na umnožavanju, preuređenju i fuziji hromozoma (Johnston i sar., 2005). Pripadnici ove grupe su vrlo pogodni model organizmi za genetička proučavanja pa je tako *Arabidopsis thaliana* jedan od najpoznatijih model organizama za proučavanje razvoja, fiziologije i funkcije gena (Al-Shehbaz i sar., 2006).

1.2. Najznačajniji predstavnici familije Brassicaceae

U svetu, kupusnjače se gaje na preko 39 miliona hektara, sa prinosom od oko 53 miliona tona. Ekonomski najvažniji rod familije je rod *Brassica* koji obuhvata 40 vrsta među kojima su najznačajnije uljane kulture, kupus, brokoli, karfiol, kelj i drugi varijeteti vrste *B. oleracea* (Agrios, 2005) (Tabela 1). U Srbiji se 2016. godine povrće gajilo na 280 000 ha, od čega 10 804 ha pod kupusom i keljom, sa 26,8 t/ha prinosa, što je ukupno 290 001 t (Statistički godišnjak Srbije, 2016). U 2018. godini zasejane površine kupusa i kelja su bile nešto manje i iznosile su 8 251 ha, ukupan prinos je bio 209 353 t sa 25,4 t/ha. U Srbiji, zbog pogodne klime i zemljišta, proizvodnja uljane repice je u 2018. godini porasla tri puta, proizvodna površina iznosila je 45 628 ha sa prosečnim prinosom 3 t/ha i ukupnim prinosom od 135 422 t (Statistički godišnjak Srbije, 2018). U Srbiji, ren se gaji na približno 1 500 ha sa prosečnim prinosom 8 t/ha. Druge kupusnjače kao što su brokoli, karfiol i kelj pupčar zastupljene su u značajnoj meri, ali se ne vodi zvanična statistika.

Tabela 1. Ekonomski najvažnije biljke iz fam. Brassicaceae koje se koriste u ishrani ljudi

Vrsta	Kultivar (grupa)	Narodno ime	Jestivi deo biljke
<i>B. oleracea</i>	var. <i>capitata</i>	Kupus	List
	var. <i>acephala</i>	Kelj	List
	var. <i>viridis</i>	Krmni kelj	List
	var. <i>alboglabra</i>	Kineski brokoli	List
	var. <i>gemmifera</i>	Prokelj	Pupoljci
	var. <i>gongyloides</i>	Keleraba	Stablo
	var. <i>botrytis</i>	Karfiol	Cvasti
	var. <i>italica</i>	Brokoli	Cvasti
	var. <i>botrytis</i>	Romanesco brokoli	Cvasti
	var. <i>italica</i> x <i>alboglabra</i>	Brokolini	Cvasti
<i>B. rapa</i>	ssp. <i>rapa</i>	Repa	Koren
	ssp. <i>pekinensis</i>	Kineski kupus	List
	ssp. <i>narinosa</i>	Kineski kelj	List
	ssp. <i>chinensis</i>	Pak Čoi	List
	ssp. <i>pervidis</i>	komatsuna	List
	ssp. <i>nipposinica</i>	Mizuna	List
	ssp. <i>parachinensis</i>	Rapini	List, stabljika, cvetovi
<i>B. napus</i>	var. <i>napobrassica</i>	Rutabaga	Koren
	var. <i>pabularia</i>	Sibirski kelj	List
	var. <i>oleifera</i>	Uljana repica	Seme
<i>B. juncea</i>	var. <i>rugosa</i>	Zelena slačica Indijska slačica	List Seme
<i>B. nigra</i>		Crna slačica	Seme
<i>B. carinata</i>		Etiopijska slačica	List, seme
<i>Brassica hirta</i>		Bela slačica	Seme
<i>Armoracia rusticana</i>		Ren	Koren
<i>Barbarea verna</i>		Potočarka	List
<i>Eruca vesicaria</i>		Rukola	List, stabljika
<i>Lepidium sativum</i>		Kres salata	List, stabljika
<i>Nastoriturum officinale</i>		Potočarka	List, stabljika
<i>Raphanus sativus</i>		Rotkva	Koren
	var. <i>longipinnatus</i>	Daikon rotkva	Koren
<i>Wassasbia japonica</i>		Vasabi	Koren

***Brassica napus* (uljana repica).** Prema *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database* (FAOSTAT), uljane kulture *B. napus*, *B. juncea* i *B. carinata* daju oko 12% svetskih zaliha jestivog biljnog ulja, a neke od njih se koriste i kao lisnato i korensko povrće (<http://faostat.fao.org/>). Uljana repica predstavlja drugu po važnosti uljanu kulturu u svetu, sa proizvodnjom na preko 36 miliona hektara i 75 miliona tona prinosa u 2017. godini (USDA, 2018). Evropska unija je najveći proizvođač uljane repice u svetu. Prema Oil World (<https://www.oilworld.biz/p/rapeseed-products-1#rapeseed-products-1>) ukupno 22,3 miliona tona uljane repice je proizvedeno na 6,5 miliona hektara u 2015/2016. godini. Rastuća potreba za uljem uljane repice uticala je na širenje proizvodnje na Jugozapadnu Evropu, gde uljana repica postaje preovlađujuća kultura. *B. napus* ($2n = 38$) je amfidiploidna vrsta nastala spontanom hibridizacijom *B. oleracea* ($2n = 18$) i *B. rapa* ($2n = 20$) pre oko 10 000 godina (Al-Shehbaz i sar., 2006). Termin uljana repica odnosi se na veliki broj različitih podvrsta, formi i varijeteta. Domestifikovana uljana repica u Evropi se javlja oko 400 do 500 godina pre nove ere i odatle se širila u druge regije (Gómez-Campo i Prakash, 1999). Termin kanola se uglavnom odnosi na varijetete uljane repice koji su zbog niskog sadržaja eruične kiseline i glikozinolata pogodniji za proizvodnju ulja i uglavnom se koriste u ishrani (Gulden i sar., 2008). Zahvaljujući visokom sadržaju ulja (i do 40%) i proteina (20-40%) u semenu uljane repice, ulje uljane repice se koristi u ishrani, ali i za proizvodnju biodizela, u ishrani stoke, kao usev koji poboljšava karakteristike i strukturu zemljišta i kao jedna od najboljih medonosnih biljaka. Zahvaljujući visokom sadržaju nezasićenih masnih kiselina, sterola, antioksidanata i vitamina, ulje uljane repice ima i veliki zdravstveni značaj (Hashmi i sar., 2016).

***Brassica oleracea* i najznačajniji varijeteti.** Najznačajniji varijeteti vrste *B. oleracea* su *B. oleracea* var. *capitata* (glavičasti kupus), *B. oleracea* convar. *botrytis* var. *italica* (brokoli), *B. oleracea* var. *sabauda* (kelj), *B. oleracea* var. *gemmifera* (kelj pupčar), *B. oleracea* var. *botrytis* (karfiol), *B. oleracea* var. *gongyloides* (keleraba), *B. oleracea* var. *acephala* (lisnati kelj ili raštan) (Podsedeck, 2007).

Brassica oleracea var. *capitata*, glavičasti kupus, je listopadna zelena, crvena (ljubičasta) ili bela (bledozelena) dvogodišnja biljka. U prvoj godini biljke dostižu visinu 40–60 cm, do cvetanja dolazi u drugoj godini kada bijke mogu narasti i do 1,5–2,0 m. Većina kupusa ima debele, naizmenično raspoređene listove. Plod je ljuska koja se u zrelosti otvara dehiscencijom, a seme je smeđe ili crno. Biljke se oprašuju insektima (Fritz i sar., 2009). Kupus je selektivno uzgajan zbog težine i morfoloških karakteristika glavice, otpornosti na mraz, brzog rasta i sposobnosti skladištenja. Izgled glavice kupusa dobio je značaj u selektivnom uzgoju, pri čemu su sorte odabrane zbog oblika, boje, čvrstoće i drugih fizičkih karakteristika, ali i otpornosti na razne insekte i bolesti (Dixon i sar., 2007). Najznačajniji svetski proizvođači kupusa u 2017. godini bili su Kina (47% ukupne svetske proizvodnje ili 32,8 miliona tona), Indija (8,5 miliona tona) i Rusija (3,3 miliona tona). U Evropi najveći proizvođači kupusa su Poljska (1,2 miliona tona) i Rumunija (1,1 milion tona) (Chepkemoui, 2017).

Brassica oleracea var. *botrytis*, karfiol, se u ishrani ljudi koristi u formi bele glavice što je zapravo redukovana cvast. Za razliku od ostalih kupusnjača karfiol je osetljiv na spoljašnje uslove gajenja, kao što su visoka temperatura i suša, koji uzrokuju nepravilno formiranje ili zaostajanje u rastu cvasti, što smanjuje tržišnu vrednost (Delahaut i Newenhouse, 1997). Najveći svetski proizvođači karfiola su Kina (9,1 miliona tona) i Indija (7,9 miliona tona) a u Evropi vodeće mesto zauzimaju Španija (0,55 miliona tona), Italija (0,38 miliona tona) i Francuska (0,33 miliona tona) (Burton, 2017).

Brassica oleracea convar. *botrytis* var. *italica*, brokoli, zahteva kao i karfiol, nešto niže temperature gajenja, mada je dosta otporniji od karfiola. U ishrani se koristi zbijena cvast koja se nalazi na vrhu stabljike, dok cvetni pupoljci mogu biti zeleni, ljubičasti ili žuti (Liptay, 1988). Najčešće uzgajani varijetet brokolija je kalabreški brokoli ili običan brokoli (nazvan po oblasti Italije, Kalabriji) i poznat je po velikim zelenim glavicama (10 do 20 cm) i debelim stabljikama. Drugi tip je „klijajući“ brokoli koji ima više manjih glavica i tanje stabljike. Treća vrsta je slična karfiolu i vrhovi cvetnih pupoljaka imaju ljubičastu boju, a najviše se uzgaja u Evropi i Severnoj Americi, ređe u Aziji. Danas, najveći proizvođač brokolija na svetskom tržištu su SAD sa površinom gajenja od 55 000 ha i prinosom od 7,9 t/ha u 2016. godini (Fritz i sar., 2009).

Brassica oleracea var. *gongyloides*, keleraba, je dvogodišnja biljka, dobijena veštačkom selekcijom za lateralni rast meristemskog tkiva pa je njen jestivi deo uvećano stablo. Postoji veliki broj sorti koje se uglavnom razlikuju prema boji stabljike (zelene ili crvene). Najčešće sorte su Beli Beč, Ljubičasti Beč, Veliki vojvoda, Gigante, Ljubičasti Dunav i Beli Dunav (<https://horticulture.oregonstate.edu/oregon-vegetables/kohlrabi-0>). Keleraba je otpornija na spoljašnje uslove od drugih kupusnjača. Konzumacija kelerabe najzastupljenija je na severoistoku Evrope, ali i u Nemačkoj, Švajcarskoj i Austriji, a najveći proizvođači su Kina, Rusija, Indija i Koreja (Saharan i sar. 2016).

Brassica oleracea var. *gemmifera*, kelj, je takođe dvogodišnja biljka, znatno otpornija na visoke i niske temperature, mraz i sušu. Razlikuje se od ostalih varijeteta po tome što list deluje mehurasto usled zadebljanja parenhimskog tkiva. Postoji mnogo varijeteta kelja koje pripadaju različitim vrstama roda *Brassica* (Lešić i sar., 2016). Granati kelj ili kravlji kelj (ponekad klasifikovan i kao *B. oleracea* var. *fruticosa* ili *B. oleracea* var. *selenesia*) najviše se koristi za stočnu hranu. Kelj pupčar, prokelj ili briselski kupus ima karakterističan izgled, glavice se formiraju u osnovi listova na stabljici i može ih biti i do 100. Raštika ili lisnati kelj, ne formira glavicu i može imati glatko lišće (*B. oleracea* f.

viridis) ili kovrdžavo, mehurasto lišće (*B. oleracea* f. *sabellica*). Pored ovih koriste se još i kuhinjski kelj, zeleni kelj, patuljasti sibirski kelj i škotski kelj (Saharan et al. 2016).

Druge ekonomski značajne vrste fam. Brassicaceae. Osim navedenih, ekonomski važne vrste su i *Brassica rapa* (repa), *B. juncea* (indijska slačica), *B. nigra* (crna slačica), *B. alba* (bela slačica) i *B. pekinensis* (kineski kupus), a u okviru svake vrste postoji veliki broj varijeteta. Osim vrsta roda *Brassica* značajne su i vrste iz drugih rodova ove familije: *Raphanus sativus* (rotkvice), *Armoracia rusticana* (ren), *Nasturtium officinale* (potočarka), *Lepidium sativum* (vrtni kres) i *Eruca sativa* (rukola) (Rimmer i sar., 2007).

Armoracia rusticana, ren, je otporna višegodišnja biljka koja se za razliku od ostalih kupusnjača sadi gusto i raste tokom duge vegetacione sezone. Korenov sistem se sastoji od dugog, belog, cilindričnog glavnog korena, koji može rasti do oko 60 cm, sa tankim bočnim korenovima. Korenov sistem može dosegnuti dubinu od 3-4 m sa bočnim širenjem od oko 1 m. Biljke rena su dugo smatrane sterilnim jer kako se danas pretpostavlja, usled nakupljanja štetnih mutacija, interspecifične hibridizacije, i samokompatibilnosti, seme rena retko može da klija. Ren se razmnožava sadnjom korenskih delova prikupljenih iz useva iz prethodne godine (Walters i Wahle, 2010). Za ishranu se koriste lišće i koren rena koji ima specifičan ukus zbog glikozinolatskih jedinjenja koje sadrže (Balasinska i sar., 2005). Pretpostavlja se da ren vodi poreklo iz umerenih područja istočne Evrope i zapadne Azije. Poznate su tri vrste, *A. macrocarpa*, *A. rusticana* i *A. sisymbrioides*, od kojih se za komercijalnu upotrebu uglavnom koristi *A. rusticana*. Kultivacija i selekcija samoniklih biljaka rena ima dugu tradiciju, a poseban ekotip Novosadski ren, karakterističan za Vojvodinu, poznat je po svom kvalitetu. Ren se gaji širom Evrope zahvaljujući svojoj širokoj upotrebi u gastronomiji i medicini (Agneta i sar., 2013).

1.3. Bolesti biljaka familije Brassicaceae

Bolesti predstavljaju značajan faktor koji može ograničiti uspešnu proizvodnju kupusnjača. Fitopatogene gljive više ugrožavaju proizvodnju kupusnjača u odnosu na bolesti uzrokovane virusima i bakterijama (Koiike i sar., 2007; Abdel-Farid i sar., 2009). Prinos biljaka može biti ugrožen u različitim fazama razvića počevši od setve, rasada, berbe, ali i kasnije tokom skladištenja i transporta. Simptomi bolesti koje izazivaju patogene gljive se mogu pojaviti kako na nadzemnim tako i na podzemnim organima biljaka. Zaražene biljke u većini slučajeva potpuno propadaju, što se direktno odražava na njihov prinos u proizvodnji.

Na semenu i klijanima kupusnjača velike štete mogu naneti gljive *Pythium* spp, *Rhizoctonia* sp. i *Phoma lingam*, prouzrokovajući propadanje klijanaca i poleganja rasada. Propadanje korena ili "kilo korena" prouzrokuje *Plasmodiophora brassicae*. Uvenuće biljaka može se javiti usled nekroze korena i stabla koju prouzrokuje *Fusarium oxysporum* f. *conglutinans*. Patogeni *Hyaloperonospora parasitica* (plamenjača), *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola* (crna pegavost) i *Albugo candida* (bela rđa) inficiraju listove kupusnjača ometajući vršenje fotosinteze i izazivajući njihovo sušenje. Na semenskom usevu kupusnjača značajne štete mogu naneti *Alternaria brassicae*, *Albugo candida* i *Phoma lingam* (Ivanović i Ivanović, 2001; Rimmer i sar. 2007).

Poleganje rasada je veoma rasprostranjeno oboljenje koje izaziva velike štete u proizvodnji rasada zbog mikroklimatskih uslova zatvorenog prostora koji pogoduju razvoju više patogena kao što su *Pythium* spp, *Rhizoctonia solani*, *Olpidium brassicae*, *Phoma lingam* i *Alternaria brassicae* (Maceljski i sar., 1997). Na intenzitet pojave bolesti utiču različiti faktori kao što su stepen vlažnosti, temperatura, svetlost, gustina setve i predispozicija domaćina (Ivanović i Ivanović, 2001). Na tek izniklim klijanima, prvi simptomi oboljenja javljaju se na prizemnom delu stabla, u vidu vodenaste (*Pythium* spp.) ili poluvlažne (*R. solani*) nekroze.

Inficirani deo stabla postaje mekši i tanji od zdravog zbog čega mlade biljke padaju na podlogu odnosno "poležu", zaraženo tkivo se suši i dobija mrku boju, tj. podleže nekrozi. Bolest se u povoljnim uslovima brzo širi sa obolelih biljaka na susedne, zdrave biljke, tako da za kratko vreme propada veći deo rasada (Balaž, 2002).

Prouzrokovac kupusne kile je *Plasmodiophora brassicae*, jedna od najdestruktivnijih bolesti kupusnjača koja izaziva velike ekonomske gubitke na većem broju gajenih i samoniklih vrsta iz fam. Brassicaceae (Srivastava i sar., 2011). Najčešće se javlja na kupusu, kineskom kupusu, kelju pupčaru, a manje osetljivi su keleraba, kelj, karfiol, rotkvica i neki varijeteti repice, dok je ren otporan. Prva faza bolesti uočava se na korenskim dlačicama obolele biljke koje nepravilno zadebljavaju što se u kasnijoj fazi bolesti širi na ceo korenov sistem koji na kraju gubi svoju funkciju. Kasnije, zadebljanja pucaju usled razlaganja tkiva što ima za posledicu pojavu neprijatnog mirisa i naseljavanje povreda saprobnim organizmima iz zemljišta (Ivanović i Ivanović, 2001). U Srbiji je bolest prisutna u skoro svim regionima gajenja kupusa.

Vrste roda *Alternaria* izazivaju simptome crne pegavosti lišća na biljkama iz fam. Brassicaceae i najčešće su to: *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica* i *A. alternata*. *A. brassicae* je patogen koji se uglavnom javlja na uljanim kulturama, dok su ostale tri vrste uglavnom patogeni povrća (Saharan i sar., 2016). Infekcija se primarno vrši preko lista, čime se smanjuje fotosintetički potencijal što dovodi do smanjenja prinosa, kvaliteta i tržišne vrednosti biljke, mada se mogu inficirati i stablo, plod i seme (Verma i Saharan, 1994). *A. brassicicola* i *A. brassicae* izazivaju slične simptome crne pegavosti lišća. Infekcija počinje na starijim, donjim listovima biljaka. Pege su mrke boje, okruglaste i sa hlorotičnim oreolom, prečnika do 1 cm sa karakterističnim koncentričnim krugovima. Usled nekroze i propadanja zaraženih delova lista, smanjuje se asimilaciona površina biljaka, što dovodi do smanjenja prinosa i pogoršanja njegovog kvaliteta (Saharan i sar., 2016). Slične pege, ali izduženog oblika, javljaju se i na peteljka listova i na stablu domaćina. Na glavicama karfiola i brokolija pege su mrke, gotovo crne boje, često velike i mogu prekriti jedan njen deo ili čak čitavu glavicu, usled čega značajno umanjuju njenu tržišnu vrednost. U semenskom usevu kupusnjača pege se javljaju na ljuskama i plodovima. Zaražene ljuske postaju nekrotične i ostaju bez semena ili daju smežurano seme slabe klijavosti (Saharan i sar., 2016).

Patogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, inficira samo biljke iz fam. Brassicaceae. Gljiva inficira biljku u svim fenofazama razvoja, a prvi simptomi se uočavaju na mladim biljkama u vidu hloroze donjih listova. Listovi pokazuju znakove uvelosti, zatim po obodu nekrotiraju, suše se i opadaju. Na uzdužnom preseku stabla uočava se mrka obojenost provodnog tkiva što je takođe karakterističan simptom bolesti. Obolele biljke se deformišu, zaostaju u rastu, a posle cvetanja i formiranja plodova propadaju (Lević, 2008; Liu i sar., 2017).

Hyaloperonospora parasitica je parazit svih vrsta roda *Brassica*, posebno brokolija, i izaziva plamenjaču kupusa koja se javlja u uslovima hladnije i vlažnije klime. Patogen može inficirati mlade biljke u rasadu i zrele biljke u polju kada se uočavaju žućkaste poligonalne pege, oivičene lisnom nervaturom na listovima. Na naličju lista, u zoni pega, stvara se beličasto-sivkasta micelija, zaraženo lišće gubi turgor, vene, suši se i otpada (Gisi i Sierotzki, 2008).

Vrsta *Albugo candida* izaziva oboljenje poznato kao bela rđa i može se naći u svim rejonima gajenja povrtarskih kultura iz fam. Brassicaceae. Ova bolest je posebno značajna za uljanu repicu i slačicu, prisutna je i na kupusu, karfiolu, kelju, renu i rotkvici i ne pričinjava značajne štete sem u proizvodnji semena (Shiraishi i sar., 2003). Simptomi se uočavaju na adaksijalnim stranama listova gde se javljaju mnogobrojna ispupčenja epidermisa bele boje, a mogu se javiti i hloroze, nekroze i opadanje listova. U slučaju sistemskih zaraza dolazi do hipertrofije tkiva što uzrokuje uvrtnja stabla, lista i cveta (Srivastava i sar., 2010).

Erysiphe cruciferarum je izazivač bolesti poznate pod imenom pepelnica i može inficirati sve nadzemne delove biljke. U početku simptomi se javljaju u obliku belih kružnih fleka koje se u povoljnim uslovima (povišena vlažnost i temperatura) šire i spajaju pokrivajući celu površinu lista, nakon čega lišće žuti i nekrotira. Simptomi se prvo uočavaju na spoljnom lišću izazivajući nekroze, ali infekcija zahvata i unutrašnje lišće šireći se od vrha prema unutrašnjosti lista što ima za posledicu pojavu truleži. Parazitira na kupusu, karfiolu, rotkvi i kelerabi. U Srbiji nije zabeležen veći ekonomski značaj (Ivanović i Ivanović, 2001).

1.4. Vrste roda *Alternaria* i njihov značaj

Vrste roda *Alternaria* su kosmopoliti sa izuzetnom sposobnošću prilagođavanja različitim uslovima spoljašnje sredine, pa mogu biti prisutne i u vlažnim i u semi-aridnim regionima, gde mogu inficirati brojne biljne kulture preko listova, stabljika, cvetova i plodova (Desphande, 2002). *Alternaria* spp. su identifikovane na žitima, uljanim kulturama, povrću (fam. Apiaceae, Solanaceae, Brassicaceae, itd.), voću (jagodičasto, koštičavo, jabučasto) i ukrasnom bilju (Thomma, 2003). Pored šteta koje uzrokuju na polju, zbog širokog opsega temperatura na kojima se mogu razvijati, uzročnici su i propadanja poljoprivrednih proizvoda tokom skladištenja, transporta i u procesu prerade (Sommer, 1985; Ostry, 2008). Takođe, izazivaju propadanje semena i sejanaca ili nagomilavanje toksičnih metabolita u biljnim organima čime se smanjuje kvalitet proizvoda. Spore *Alternaria* spp. su najčešći i najsnažniji alergeni poreklom iz vazduha kako u zatvorenom tako i na otvorenom prostoru. Vrste roda *Alternaria* prezimljavaju na zaraženim ostacima useva, semena i korova u vidu micelije, mikrosklerocija ili konidija, a mogu se širiti putem insekata, vetra, kiše, kao i navodnjavanjem (Laemmlen, 2001; Battilani i sar., 2009). Tokom vegetacije, vrste ovog roda se šire rastom micelije dok vazдушna strujanja prenose konidije patogena na nadzemne delove biljaka. Kod većine *Alternaria* vrsta nije identifikovan polni stadijum (Simmons, 2007).

Vrste roda *Alternaria* su podeljene na tri ekološke grupe: saprobe, slabe ili oportunističke patogene i specijalizovane virulentne forme (Thomma, 2003). Uprkos razlikama koje postoje unutar roda *Alternaria* na morfološkom i genetičkom nivou, infekcije se uglavnom dešavaju po sličnom obrascu (Lawrence i sar., 2008). Sve vrste proizvode tamne, višecelijske, melanizovane, feodiktiospore koje se obrazuju u lancima različite dužine i obrasca granjanja. Primarna infekcija se odvija preko lista (lisna pegavost), patogen utiče na smanjenje fotosintetičkog potencijala domaćina što ima za posledicu njegovo sporo propadanje (Rottem, 1994). U odgovarajućim spoljašnjim uslovima, dormantne spore, debelih melaniziranih zidova, dospevaju na površinu lista, kličaju, a zatim kroz stome, hidatode, lenticele ili oštećenja na listovima kličajuće cevčice prodiru u tkivo domaćina, dok virulentnije vrste mogu i direktno prodreti kroz kutikulu i epidermis (Rottem, 1991). Iako su osnovni mehanizmi infekcije domaćina vrlo slični za sve patogene vrste roda *Alternaria*, tokom koevolucije sa domaćinima, patogene vrste su razvile različite strategije i specijalizacije za domaćina koje omogućavaju infekciju i prevazilaženje odbrambenih mehanizama biljke.

1.4.1. Patogenost i patogeneza vrsta roda *Alternaria*

Ciklus bolesti odvija se u nekoliko faza:

Inicijalna faza. U uslovima povećane vlažnosti i optimalne temperature, na površini lista biljke domaćina dormantne spore kličaju u germinativnu cevčicu. Tokom ovog procesa dolazi do redukcije citoplazme i umnožavanja mitohondrija i ribozoma (Thoma, 2003). Na uspešnost uspostavljanja kontakta i penetracije patogena u tkivo domaćina mogu uticati karakteristike lista, kao što su debljina kutikule, broj i raspored stoma, kao i zadržavanje vlage na listu (Vloutoglou i sar., 1999).

Predpenetraciona faza. Tokom rasta germinacione cevčice dolazi do usložnjavanja njene građe tj. do diferenciranja apesorije, predpenetracione strukture. Apesorije omogućavaju adheziju za površinu biljke, prepoznavanje domaćina i prodiranje u unutrašnjost biljnih ćelija. Pričvršćivanje patogena za domaćina omogućeno je sintezom i izlučivanjem proteina hidrofobina što uzrokuje elektrostatičko privlačenje vazdušastih hifa i površine domaćina. Adhezija za domaćina istovremeno predstavlja morfogenetički signal za razvoj apesorije (Wessels i sar., 1996). Procesi koji se nalaze u osnovi formiranja apesorije nisu u potpunosti poznati, ali se pretpostavlja da mnogi molekuli koji se nalaze na površini biljke (šećeri, proteini, voštane strukture...) indukuju morfogenetske promene koje omogućavaju dalji razvoj apesorije. Prepoznavanje domaćina se vrši na više načina, npr. preko ćelijskog zida apesorije i proteina integrina, heterodimernog transmembranskog proteina koji povezuje ekstracelularni matriks sa citoskeletom (Brakebusch i sar., 1997). Ovaj proteinski receptor, cAMP (ciklični adenozin monofosfat) signalnim putem indukuje unutrašnje reakcije citoskeleta i dolazi do različitog intraćelijskog odgovora, zavisno od faze patogeneze. Drugi način prepoznavanja domaćina se vrši nakon mehaničkog dodira apesorije i stoma čime dolazi do otvaranja jonskih kanala na površini apesorije i ulaska ekstracelularnih jona u ćeliju. Jonska permeabilnost plazma membrane se menja, ostvaruje se konverzija ekstracelularnog mehaničkog signala u intracelularni električni signal koji ponovo pomoću cAMP transdukcionog puta, predstavlja signal za diferencijaciju citoskeleta u apikalnom delu apesorije (Hoch i sar., 1987). Vrste roda *Alternaria* razvile su različite mehanizme prodiranja kroz spoljašnje strukturne barijere biljke kao što su kutikula i epidermis ili mogu bez prepreke ulaziti u tkivo domaćina kroz prirodne otvore (stome, hidatode, lenticеле).

Penetraciona faza. Prodiranje patogena u tkivo domaćina je najčešće rezultat zajedničkog enzimatskog i mehaničkog delovanja (Kolattukudy, 1995). Tokom klijanja spore i prodiranja patogena u ćeliju domaćina, vrste roda *Alternaria* produkuju veliki broj enzima i toksina koji mogu biti specifični (*HST-host specific toxins*) ili nespecifični (*nonHST-non host specific toxins*) za biljku domaćina (Rottem, 1994).

Enzimi i toksini vrsta roda *Alternaria*. Hidrolitički enzimi koje produkuju patogene vrste *Alternaria* mogu biti iz grupa kutinaza, celulaza, pektinaza i proteaza. Iako su ovi enzimi neophodni i za saprobni način života, biosintetička regulacija i struktura ovih molekula može biti specijalizovana i adaptirana za posebnog domaćina (Schafer, 1993). Enzim kutinaza razlaže strukturni polimer kutin, koji gradi kutikulu biljaka, i odgovoran je za patogenost kod mnogih drugih vrsta gljiva (Kolattukudy, 1995). Nakon enzimatskog delovanja, u osnovi uspešne infekcije su i mehanički procesi. Nakon formiranja apesorija i pričvršćivanja za površinu biljke, dolazi do nagomilavanja melanina u zidu apesorije, čime se smanjuje poroznost zida i omogućava zaštita od odbrambenog sistema biljke (De Jong i sar., 1997). Nagomilavanjem melanina i koncentracijom glicerola u citoplazmi povećava se ćelijski turgor koji se koncentriše na malo područje u apikalnom delu apesorije koje nije bilo podložno melanizaciji. Iz ovog dela se razvija infektivna hifa koja prolazi kroz enzimima razloženu kutikulu ćelijskog zida i dospeva unutar domaćina (Mendgen i sar., 1993).

Poznato je da vrste roda *Alternaria* mogu sintetisati više od 70 sekundarnih metabolita, od kojih su samo neki toksični za biljke, životinje i ljude (Thomma, 2003). Sve do sada proučavane patogene vrste produkuju toksine, specifične i/ili nespecifične za domaćina, vrlo različitih hemijskih struktura (Rottem, 1994). U mnogim slučajevima produkcija toksina je ključna za razvoj bolesti. Bilo da su specifični ili nespecifični za domaćina, toksini mogu biti uključeni u bilo koji stupanj infekcije, od inicijalne faze, procesa penetracije i kolonizacije, do smrti biljke domaćina. Osnovna uloga specifičnih i nespecifičnih toksina je da oslabe biljku, inhibiraju njene odbrambene reakcije i povećaju dostupnost hranljivih materija za patogena. Istraživanja Liu i sar. (1992) ukazuju da su metaboliti ovih vrsta različite toksičnosti, neki od njih imaju moćne mutagene i teratogene sposobnosti i povezuju se sa određenim formama

kancera. Tako, alternarična kiselina menja morfološke i fiziološke karakteristike plazma membrane kod plazmodezmi i izaziva curenje elektrolita (Langsdorf i sar., 1991). Fitotoksin *A. alternata* onemogućava sintezu ATP-a (adenozin trifosfat) vezujući se za katalizatore ove reakcije. Takođe, ovaj toksin utiče i na pokrete stoma (deluje na process fotofosforilacije u hloroplastima), na ćelijski protoplast i fluks jona kroz plazmalemu. *A. macrospora*, patogen biljaka pamuka, utiče na propustljivost plazma membrane ćelija lista zbog čega dolazi do gubitka kalijuma u ćeliji (Escriva i sar., 2017).

Toksini vrsta roda *Alternaria* se prema strukturi molekula mogu svrstati u tri grupe: derivati dibenzo-pirona [alternariol (AOH), alternariol monometil-etar (AME), altenuen (ALT) i altenuisol (AS)], derivati tetraminske kiseline [tenuazonična kiselina (TeA) i izotenuazonična kiselina (iso-TeA)] i derivati perilena [altertoksini I, II i III (ATX-I, ATX-II i ATX -III) i stemfilitoksin III] (Ostry, 2008; Logrieco i sar., 2009; Battilani i sar., 2009). U izveštaju *European Food Safety Authority* (EFSA) iz 2011. godine izdvajaju se još dve grupe *alternaria* toksina, AAL-toksini (AAL-TA i AAL-TB) i toksini mešovite strukture kao što je ciklični tetrapeptid tentoksin (TEN). AAL toksin koji proizvodi *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, patotip *A. alternata* na paradajzu, ima molekulsku strukturu sličnu sfingolipidima, dok AM toksin izolovan iz *A. alternata* f. sp. *mali*, patotip *A. alternata* koji se javlja na jabuci, ima strukturu cikličnog despiceptida (Wang i sar., 1996; Johnson i sar., 2000). Iako strukturno različita jedinjenja, toksini koje proizvode neki patotipovi *A. alternata* mogu imati zajednički biosintetički put kao što je to kod AF toksina (patotip *A. alternata* izolovan sa jagode), AK toksina (patotip *A. alternata* izolovan sa japanske kruške) i ACT toksina (patotip *A. alternata* izolovan sa mandarine) (Nakashima i sar., 1985; Nakatsuka i sar., 1990).

Pored toksina specifičnih za domaćina, vrste roda *Alternaria* proizvode i veliki broj toksina nespecifičnih za domaćina. To su ziniol, alternarična kiselina, alternariol, radicinil, radicinol i tentoksin. Isti toksin može biti sintetisan od strane različitih patogena, uticati na više domaćina, a mogu biti uključeni u jedan ili više stadijuma infekcije. *A. brassicicola* pored specifičnog AB toksina proizvodi i nespecifične toksine kao što su despiceptidi i komponente slične fuzikoksinu (Cook i sar., 1997; MacKinnon i sar., 1999). Poznato je da veliki broj vrsta: *A. porri*, *A. solani*, *A. zinnia*, *A. carthami*, *A. macrospora* i *A. tagetica* mogu proizvoditi ziniol (Maiero i sar., 1991). Pound i Stahmann (1952) su pokazali da nespecifični toksin *A. solani*, alternarična kiselina, izaziva hlorozu i nekrozu biljaka paradajza. Nespecifičnost ovog toksina je pokazana primenom na biljke iz familije kupusa, gde su se pojavili slični simptomi. Može se pretpostaviti da toksini nespecifični za domaćina nisu primarne determinantne bolesti, ali imaju funkciju važnog faktora virulencije (Rottem, 1994). Patotipovi *A. alternata* mogu proizvoditi AM (domaćin jabuka), AC (domaćin citrusi), AK (domaćin breskva), AF (domaćin jagoda), AL (domaćin paradajz) i AT toksin (domaćin duvan). Kod delovanja ovih toksina uočeno je da nastaje tri tipa histoloških promena (Park i sar., 1981). Najčešće dolazi do invaginacije, fragmentacije i stvaranja vezikula plazma membrane, izduživanja dezmotubula i degradacije ćelijskog zida. Drugi tip histoloških promena (karakterističan za AM toksin) odnosi se na promene hloroplasta, praćene vezikulacijom i odvajanjem lamele hloroplasta. Treći tip reakcije tkiva sreće se kod AL toksina (paradajz) kada se uočava povećanje volumena mitohondrija, redukcija mitohondrijalnih krista, povećanje zapremina endoplazmatičnog retikuluma i dolazi do njegove vezikulacije (Park i sar., 1981).

Infekcija, invazija, rast i reprodukcija patogena. U početku infekcije, na zaraženom lišću simptomi se uočavaju kao sitne, ovalne pege, ljubičaste, braon ili crne boje, manje veličine 1,5-5 mm u prečniku, sa hlorotičnim ili tamnijim obodom. Kako bolest napreduje može doći do spajanja pega ili do njihovog uvećavanja kada poprimaju nepravilan oblik. Ukoliko se pege jave na peteljka lišća, lišće žuti i javlja se defolijacija. U uslovima intenzivne defolijacije može doći i do prevremenog opadanja plodova (Rottem, 1994). Nakon reprodukcije patogena, kada se steknu povoljni uslovi sredine i ostvari receptivnost domaćina, ciklus bolesti se

ponavlja na istoj biljci kao sekundarna infekcija ili na nekoj drugoj biljci domaćinu. *Alternaria* spp. prezimljavaju u formi micelije, spora ili mikrosklerocija u opalim plodovima i lišću, granama ili ispod kore, odakle u sledećoj vegetacionoj periodu mogu ponovo vršiti infekciju.

1.4.2. Taksonomija i nomenklatura roda *Alternaria*

Rod *Alternaria* pripada carstvu Fungi, razdelu Ascomycota, klasi Dothideomycetes, redu Pleosporales, familiji Pleosporaceae. Vrste roda *Alternaria* su izrazito varijabilne i široko rasprostranjene zbog čega su opisivane pod različitim sinonimima nepouzdanе taksonomske ispravnosti. Klasifikacija i sistematika ovog roda su veoma složene i do danas nisu u potpunosti rešene (Simmons, 1992; Pryor i Michailides, 2002; Woudenberg i sar., 2015). Prema USDA Index-u domaćina gljiva, patogene *Alternaria* spp. su registrovane u preko 4000 kombinacija *Alternaria*/domaćin (Lawrence i sar., 2013).

Rod *Alternaria* prvi put je opisan 1816. godine sa *A. tenuis* kao tipskom i jedinom vrstom (Rottem, 1994). Glavna karakteristika roda je formiranje nizova tamno obojenih višćelijskih konidija sa longitudinalnim i transverzalnim septama (feodiktiospore), varijabilnog izgleda i veličine. Na početku rod nije bio prepoznat, a *A. tenuis* je identifikovana kao *Torula alternata* (Rottem, 1994). Kasnije, tokom istorijskog razvoja klasifikacije brojni novi rodovi, kao što su *Macrosporium*, *Stemphylium* i *Ulocladium*, su izdvojeni na bazi produkcije feodiktiospora što je uzrokovalo konfuziju među istraživačima. Nekoliko reklasifikacija ovih rodova rezultovalo je sve većim brojem novih vrsta (Rottem, 1994). Wiltshire (1933) je nakon ponovnog ispitivanja karakteristika vrsta rodova *Macrosporium* i *Stemphylium* ove taksone vratio u rod *Alternaria*. Definisane današnjeg koncepta roda *Alternaria* započelo je seminarskim radom "Tipizacija *Alternaria*, *Stemphylium* i *Ulocladium*" praćeno brojnim novim studijama u kojima su opisana i dva nova roda *Embellisia* i *Nymbia* (Simmons, 1965, 1971). Danas se procenjuje da je broj vrsta roda *Alternaria* od 100 do nekoliko stotina (Lawrence i sar. 2013). Način kvantifikacije morfoloških parametara ima direktan uticaj na taksonomska istraživanja. Prvobitna grupisanja vrsta ovog roda, vršena su na osnovu veličine spora, dužine vrata spora i prisustva odnosno odsustva konidijalnih lanaca, nisu bila informativna zbog variranja broja vrsta (Elliot, 1917). Klasifikacija na osnovu katenulacije u Longicatenatae, Brevicatenatae i Noncatenatae se pokazala nedovoljno precizna (Neergaard, 1945). Nishimura i Kohmoto (1983) su pokušali da na osnovu produkcije specifičnih toksina, grupu *A. alternata sensu lato* podele na patotip forme. Simmons (1992) takođe definiše vrste na osnovu veličine spora i dužine vrata spora, ali i prisustva, odsustva, broja i rasporeda septi, i obrasca sporulacije. Na ovaj način formirano je 14 kompleksa vrsta, koje ipak ne razjašnjavaju filogenetske veze unutar roda *Alternaria*. Termin 'kompleksna vrsta' se održao do danas. Obzirom da morfologija spora zavisi od uslova gajenja kulture i da zbog nestandardizovanih uslova često dolazi do preklapanja karakteristika konidija između vrsta, rekonstruisanje taksonomije na osnovu morfoloških osobina samo je uvećalo broj vrsta unutar roda (Andersen i sar., 2001, 2002; Peever i sar., 2004). Standardizacijom uslova gajenja (temperatura, vlažnost, sastav medijuma) morfološke osobine kao što su oblik konidija (tip i dužina konidijalnog vrata), veličina konidija, broj i raspored septi, i obrazac sporulacije omogućavaju pouzdane filogenetske analize. Rad Emory G. Simmons-a na taksonomiji roda *Alternaria* rezultirao je Priručnikom za identifikaciju *Alternaria* (Simmons, 2007) sa morfološkim opisima 275 do sada opisanih i determinisanih vrsta. Samo na osnovu trodimenzionalnog izgleda obrasca sporulacije nazivi mnogih vrsta u okviru ovog roda su promenjeni i pregrupisani (Simmons, 2007).

Molekularno-filogenetskim studijama roda *Alternaria* analizirano je oko 80 različitih vrsta, koje predstavljaju svega oko 20% ukupnog diverziteta roda (Pryor i Gilberston, 2000; Hong i sar., 2005; Woudeberg i sar., 2015). Za grupu alternarioidnih hifomiceta, do decembra 2009, u bazi genskih sekvenci (*GenBank*) registrovano je oko 3200 unosa za oko 80 sekvencioniranih genskih lokusa (Lawrence i sar., 2016). Filogenetske analize roda *Alternaria*

bazirane su na molekularnim podacima sekvenci 18S nrDNA (*SSU*), 28S nrDNA (*LSU*), *ITS* 1 i *ITS* 2 (*internal transcribed spacer regions* 1 i 2), *ITS* 3 i 4 (5.8S nrDNA), *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *RPB2* (*RNA polymerase second largest subunit*), *TEF1* (*translation elongation factor 1-alpha*), *Alt a1* (*Alternaria alergen gene a1*), *ATP* (*Plasma membrane ATPase*), *CAL* (*calmodulin*) i *ACT* (*actin*). GenBank još uvek ne poseduje dovoljan broj unetih genskih sekvenci da bi se konstruisalo odgovarajuće filogenetsko stablo svih opisanih vrsta roda *Alternaria* (Woudenberg i sar., 2015). Dosadašnja molekularna istraživanja filogenije *Alternaria* spp. pokazala su se delimično nepouzdana, nepotpuna i nedovoljno jasna za formiranje jasne slike evolutivnih odnosa. Genske sekvence *SSU*, *LSU* i *ITS* su previše konzervativne da bi napravile jasnu filogenetsku razliku, stoga pojedinačne filogenije ne bi trebalo zasnivati na ovim genima (Woudenberg i sar., 2013). Geni koji kodiraju protein aktin i β -tubulin takođe ne pružaju pouzdane podatke (Lawrence i sar., 2013). Na osnovu filogenetskih analiza *ITS*, *GAPDH*, *RPB2* i *TEF1* gena po prvi put su se unutar grupe alternarioidnih hifomiceta izdvojile filogrupe *Alternantherae*, *Chalastospora*, *Crivellia*, *Eureka*, *Embellisia*, *Gypsophilae*, *Japonica*, *Phragmosporae*, *Teretispora*, *Ulocladies*, *Ulocladium* i *Undifilum* (Lawrence i sar., 2013). Genske sekvence *Alt a1* i *ATP* omogućile su još pouzdaniju analizu i sistematizaciju filogenetskih odnosa roda *Alternaria*, mada su neki nodusi stabla i dalje vrlo slabo podržani (*Cheiranthus*, *Nymbya*, *Pseudocladium*, *Embellisoides*, *Eureka*, *Dianthicola*, *Panax*, *Phragmosporae*, *Clathrospora*, *Pleosporinium*) i neophodne su dodatne analize (Woudenberg i sar., 2013). U grupi alternarioidnih hifomiceta izdvojeno je devet rodova: *Alternaria*, *Chalastospora*, *Crivellia*, *Embellisia*, *Nimbya*, *Stemphylium*, *Ulocladium*, *Undifilum* i *Sinomyces* (Woudenberg i sar., 2013). Na osnovu filogenetske analize roda *Alternaria* koja je integrisala dostupne morfološke i molekularne podatke izdvojeno je 8 filogrupa: *Alternaria*, *Alternantherae*, *Brassicicola*, *Gypsophilae*, *Panax*, *Porri*, *Radicina* i *Sonchi* (Simmons, 2007; Lawrence i sar., 2013;). Filogrupe čiji su predstavnici *A. brassicicola*, *A. porri* i *A. radicina* su najjasnije podržane dosadašnjim studijama (Pryor i Gilbertson, 2000; Chou i Wu, 2002; de Hoog i Horré, 2002; Pryor i Bigelow, 2003; Hong i sar., 2005; Lawrence i sar., 2013; Woudenberg i sar., 2013, 2015).

Filogrupa *Alternaria* roda *Alternaria* jedna je od najviše proučavanih grupa. Glavna karakteristika filogrupe *Alternaria* je produkcija sitnih konidija okruglastog ili elipsoidnog oblika, sa nekoliko transferzalnih i longitudinalnih septi. Filogenetske rekonstrukcije vrsta na osnovu morfologije konidija, kao ni podela na patotipove prema specifičnosti za domaćina, nisu dali konkretne rezultate (Johnson i sar., 2000). Peever i sar. (2004) predlažu da se sve vrste roda *Alternaria* koje proizvode sitne spore podvedu pod vrstu *A. alternata* dok se ne utvrde zadovoljavajuće genetičke ili fiziološke metode za jasnije razlikovanje. Ipak, u okviru filogrupe *Alternaria* mnogi autori izdvajaju tri grupe (Simmons, 2002; Roberts, 2005). Filogrupa sa predstavnikom *A. alternata*, proizvodi konidijalne lance na relativno kratkim primarnim konidioforima koji se sekundarno i tercijarno granaju. Grupa sa predstavnikom *A. tenuissima* ima obrazac sporulacije koji karakteriše mnogo manji broj spora, sa ili bez granjanja. Grupu *A. arborescens* karakterišu primarni konidiofori sa simpodijalnim grananjem. Iako molekularne analize *mtSSU*, *mtLSU*, *CAL*, *ACT* i β -*TUB*, nisu pokazale nikakvu značajnu razliku između ovih grupa metodama RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) i RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) izdvojena su tri različita klastera: *infectoria*, *arborescens* i kombinovani *alternata/tenuissima* klaster (Kang i sar., 2002; Pryor i Michailides, 2002; Pryor i Bigelow, 2003; Peever i sar., 2004). Dodatne analize *ITS* sekvenci su pokazale da je *infectoria* grupa filogenetski potpuno odvojena od ostalih grupa (Lawrence i sar., 2013; Woudenberg i sar., 2013). Izolati iz grupa *alternata/tenuissima* i *arborescens* pokazale su monofiletsko poreklo i dalje nisu mogle biti razdvojene (Pryor i Michailides, 2002; Woudenberg et al. 2013). Filogenetske rekonstrukcije gena *GAPDH*, *Alt a1*, *ATP* i *CAL* potvrdile su odvajanje grupa *infectoria*, *arborescens* i *alternata/tenuissima* mada ne sa velikim stepenom pouzdanosti (Lawrence i sar., 2013). Jedna od najopsežnijih analiza, sprovedena je

od strane Woudenberg i sar. (2015), gde je na osnovu multigeneske analize regiona *SSU*, *LSU*, *ITS*, *GAPDH*, *RPB2*, *TEF1*, *Alt a 1*, *endoPG* i analize anonimnog regiona OPA10-2 utvrđeno da se filogrupa *Alternaria* sastoji iz 11 filogenetskih vrsta (*A. burnsii*, *A. tomato*, *A. jacinthicola*, *A. iridiaustralis*, *A. eichhorniae*, *A. betae-kenyensis*, *A. gaisen*, *A. alstroemeriae*, *A. longipes*, *A. gossypina*, *A. alternata*) i jednog kompleksa vrsta (*A. arborescens*). Svih 35 morfovvrsta koje se ne mogu razdvojiti pomenutim filogenetskim analizama svrstane su u grupu *A. alternata*.

Filogrupu *Radicina* čine vrste *A. radicina*, *A. smyrnii*, *A. petroselini*, *A. selini* i *A. carotiincultae*, patogeni biljaka fam. Apiaceae. Na osnovu analiza *ITS* i *SSU* rDNK regiona filogrupa je podeljena na dve klade: *A. radicina-carotincultae* (pretežno patogeni šargarepe) i *A. petroselini-selini-smyrnii* (pretežno patogeni peršuna). Vrste *A. radicina* i *A. carotincultae* na osnovu morfološkog i filogenetskog upoređivanja nisu pokazala razlike (Pryor i Gilbertson, 2002). Međutim, analize protein kodirajućih regiona β -*TUB* i *Alt a1*, i analize *RAPD* i *ISSR* sekvenci DNK pokazale su da *A. carotiincultae* i *A. radicina* jesu odvojene vrste, vrlo bliske i nedavno razdvojene (Park i sar., 2008). Ovako jasnih primera filogenetske povezanosti nema mnogo u rodu *Alternaria* (Woudenberg i sar., 2013).

Filogrupa *Alternantherae*, čiji je predstavnik *A. alternantherae* proizvodi uglavnom pojedinačne spore, ovalnog ili elipsoidnog oblika, sa izraženom euseptom i bez vrata konidije (Lawrence i sar., 2013). Analizama *GAPDH*, *ITS* i *Alt a1* genskih sekvenci *Nymphaea celosia* i još dve vrste koje su ranije pripadale rodu *Nimbya* svrstane su u grupu *Alternantherae*. *N. gomphrenae* je u ovu grupu svrstana na osnovu *ITS* sekvence (Chou i Wu, 2002; Woudenberg i sar., 2013).

Filogrupa *Brassicicola* uključuje vrste *A. brassicicola* i *A. mimicula* (Pryor i Bigelow; 2003; Lawrence i sar., 2013). Primarne konidiofore su jednostavne ili granate, a konidije u lancima različite dužine i stepena granjanja. Konidije su male i srednje veličine, cilindričnog ili jajastog oblika, sa apikalnim ili laterarnim sekundarnim konidioforima. Mogu imati nekoliko transverzalnih septi i uglavnom nemaju longitudinalne septe (Simmons, 2007; Lawrence i sar., 2013). Na osnovu morfologije, ovoj grupi su pridodate još i *A. alstroemeriae*, *A. nepalensis*, *A. septorioides* i *A. solidaccana*, što su kasnije potvrdili i molekularni podaci (Simmons, 2007; Woudenberg i sar., 2013). *A. japonica* je prvobitno svrstana u filogrupu *Brassicicola* iako se kasnije utvrdilo da pripada odvojenoj filogrupu *Japonica* (Pryor i Gilbertson, 2000; Pryor i Bigelow, 2003; Hong i sar., 2005; Lawrence i sar., 2013; Woudenberg i sar., 2013).

Unutar roda *Alternaria* filogrupa *Porri* sadrži najveći broj vrsta koje proizvode spore velikih dimenzija i dugačkih vratova. Ova grupa sadrži i vrlo značajne vrste biljnih patogena *A. porri* (patogen fam. Alliaceae), *A. solani* (patogen fam. Solanaceae), *A. tomatophila* (patogen paradajza) i *A. dauci* (patogen fam. Apiaceae). Patogeni *A. solani*, *A. tomatophila* i *A. porri* formiraju nezavisnu filogenetsku liniju u odnosu na vrstu *A. dauci*, što su potvrdile i analize metaboličkih jedinjenja (Brun i sar., 2013). Vrste izolovane sa krompira i paradajza su zbog svoje velike heterogenosti svrstane u kompleks *A. solani sensu lato* (Pryor i Gilbertson, 2000). Na osnovu morfoloških osobina opisane su vrste *A. grandis* i *A. solani* na krompiru, a na paradajzu tri vrste: *A. tomatophila*, *A. cretica* i *A. subcylindrica* (Simmons, 2007). Veliku varijabilnost grupe *A. solani* na krompiru potvrdile su i brojne molekularne studije (Brun i sar., 2013; Gannibal i sar., 2009). Filogenetske analize zasnovane na *ITS* sekvencama nisu mogle razdvojiti različite sojeve unutar kompleksa *A. solani sensu lato*. Analizom sekvenci *GAPDH*, *RPB2*, *TEF1* i *Alt a1* iz kompleksne vrste *A. solani* izdvojilo se nekoliko novih vrsta među kojima i vrsta *A. tomatophila* (Andersen i sar., 2009). *A. tomatophila* ima izraženiju specijalizaciju i pretežno je patogen na paradajzu. Vrste *A. solani* i *A. tomatophila* su nastale od zajedničkog pretka nakon što se predačka linija specijalizovala za biljke iz fam. Solanaceae (Gannibal i sar., 2009). Pripadnici filogrupe *Porri*, patogene za fam. Alliaceae, takođe nisu morfološki jasno odvojeni, mada karakteristike ukazuju na prisustvo pet vrsta. Analizom sekvenci *GAPDH*, *RPB2*, *TEF1* i *Alt a1* utvrđeno je da filogrupa *Porri* sadrži 63 vrste umesto ranijih 82 (Woudenberg i sar., 2013).

Filogrupe *Sonchi*, *Panax* i *Gypsophilae* su novoformirane filogrupe roda *Alternaria*, određene prvenstveno na bazi morfoloških osobina, a kasnije potvrđene i molekularnim metodama (Simmons, 2002; Hong i sar., 2005). Analizom genskih sekvenci *Alt a1* i *GAPDH* mnoge vrste su pridodate ovim filogrupama, iako nodusi razdvajanja nisu dovoljno pouzdani (Woudenberg i sar., 2013).

1.5. Gubici u prinosu kupusnjača uzrokovani patogenim vrstama roda *Alternaria*

Vrste roda *Alternaria* mogu značajno uticati na prinose ekonomski važnih vrsta kupusnjača u svetu (Kumar i sar., 2014). Ove vrste uglavnom izazivaju oštećenje fotosintetičke površine biljke, smanjenje dužine ploda, broja i težine semena i promene hemijskog sastava samog semena, kao što su smanjenje količine i sastava ulja u semenu i smanjenu klijavost semena (Saharan i sar., 2016).

Za Indijsko poluostrvo, Meena i sar. (2010) navode smanjenje prinosa slačice oko 70% pod uticajem patogenih vrsta *Alternaria* i ističu da do danas nije primećena otpornost biljaka na bolest. Za uljanu repicu, podaci o gubicima prinosa nisu značajno odstupali 1982. i 1994. godine i iznosili su oko 17-60% odnosno 10-75% (Kolte, 1982; Verma i Saharan, 1994; Saharan et al., 2016). Slične vrednosti detektovane su i za *Brassica rapa* i *B. juncea*, od 21-71% (Meena, 2010). Verma i Saharan (1994) i Meena (2010) navode da patogen *A. brassicae* predstavlja možda najveću pretnju za uljane kulture, ne samo u Indiji, već i širom sveta. Osim na uljane kulture, *A. brassicae* utiče i na smanjenje prinosa *Eruca sativa* i *Brassica rapa* var. *trilocularis* i to za 56% odnosno 70% (Jain, 1992). Za oblast Himalajski Pradeš izmereni su gubici od 27-45% za *Brassica rapa* var. *trilocularis*, 17,2% za *B. napus* i 10,7% za *B. carinata* (Saharan i sar., 1984; Kumar i sar., 1997). Na području Nepala, osim smanjenja prinosa slačice od 32-57%, pod uticajem patogenih *Alternaria* spp, primećeno je i smanjenje sadržaja ulja u semenu od 4,4% (Shresta i sar., 2005). Takođe, na uljanoj repici zaraženoj ovim vrstama, Saharan i sar. (2016) detektuju značajne gubitke u prinosu i značajno smanjenje sadržaja ulja u semenu (1-10%), dok Ansari i sar. (1989) tvrde da se smanjenje sadržaja ulja u semenu kreće između 14,6% do 36%. Kumar i sar. (2014) su uočili da infekcija *A. brassicae*, uzrokuje smanjenja prinosa na karfiolu 30% i indijskoj slačici 47%. Na obolelim biljakama *Brassica rapa* var. *trilocularis*, Kadian i Saharan (1983) primećuju da infekcija *A. brassicae* dovodi do smanjenja dužine ploda, utiče na broj i klijavost semena, kao i na sadržaj ulja u semenu. Vrsta *A. alternata* može uzrokovati gubitke 4-18% na *Raphanus sativus* (Suhag i sar., 1983).

U Severnoj Americi, gubici prinosa uljane repice izazvane *A. brassicae* mogu biti i do 30% (Conn i sar., 1990). Vrsta *A. brassicae* prepoznata je kao glavni patogen svih kupusnjača u Kanadi (Cerkauskas, 1988). Prema Stonehouse (2000) *A. brassicae* se može sporadično detektovati na uljanoj repici, od lokaliteta do lokaliteta, uglavnom tokom kišne sezone, i tada može uzrokovati gubitke i do 75%. Isti autor navodi da su gubici prinosa uljane repice uzrokovani od strane pomenutih patogena 1999. godine iznosili 23 miliona kanadskih dolara. Za veštačku inokulaciju biljaka *Brassica campestris* i *B. napus* u polju, kombinovana infekcija *A. brassicae* i *A. japonica*, dovela je do smanjenja prinosa od 42% odnosno 70%, dok je sadržaj ulja u semenu smanjen za više od 33% za *B. campestris* i 34% za *B. napus* prema navodima Degenhardt i sar. (1974). Isti autori su saopštili da infekcija *Brassica campestris* i *B. napus* samo sa *A. brassicae*, može uzrokovati 63% odnosno 42% gubitaka prinosa, a u slučaju *A. japonica* 42% odnosno 34%. Usled pegavosti listova kupusnjača, Babadoost i Gabrielson (1993) saopštavaju značajne gubitke u prinosu semena kupusa i kelja u SAD. Reis i Boiteux (2010) navode da su *A. brassicae* i *A. brassicicola* najznačajniji patogeni kupusnjača u Južnoj Americi. Ovi autori takođe navode da je *A. brassicicola* najčešće detektovana na *Brassica oleracea* kompleksu, dok *A. brassicae* uglavnom prevladava na *B. rapa* kompleksu i korovskim vrstama. Tamayo i sar. (2001) navode da je vrsta *A. brassicae* glavni patogen biljaka karfiola u Južnoj Americi uzrokujući gubitke i do 30%.

U Australiji, uljana repica je glavna gajena kultura kupusnjača, istraživanja kao i strategije zaštite se vrlo intenzivno sprovode dugi niz godina. Kao glavni patogeni u ovom području su označene vrste *A. brassicae* i *A. japonica* koje mogu izazvati i do 60% gubitaka prinosa uljane repice (Al-Lami i sar., 2019).

U Evropi, prema nekim procenama, epidemije na kupusnjačama su uzrokovane najčešće vrstama *A. brassicae* i *A. brassicicola* i intenzitet infekcije zavisi od vremenskih uslova za razvoj epidemije, a gubici prinosa mogu iznositi i do 86% (Humpherson-Jones, 1989). U Litvaniji je detektovana infekcija *Alternaria* spp. na 37-100% mahuna uljane repice (Brazauskiene i Petraitiene, 2006). U Nemačkoj je takođe zabeleženo prisustvo pegavosti listova uljane repice što je izazvalo gubitke prinosa semena i do 50% (Daebeler i sar., 1986; Humpherson-Jones, 1992). U Rumuniji, navedeni patogeni uzrokovali su gubitak prinosa od 28% na brokoliju i uskladištenom kupusastom povrću (Tasca i Triaf, 1984). U Poljskoj, pod uticajem zaraze patogenim *Alternaria* spp. gubici prinosa kupusnjača iznosili su 15-70% (Nowakowska i sar., 2019).

1.6. Proučavanja genetičke varijabilnosti *Alternaria* populacija - značaj i upotreba mikrosatelita

Proučavanje genetičkog diverziteta populacija patogenih gljiva pruža korisne informacije o epidemiologiji, evolucionoj istoriji, ali i interakciji patogen-domaćin koja je važna za efikasnu kontrolu bolesti (Morris i sar., 2000). Prema Alexander i sar. (1993), presudan faktor koji utiče na dinamiku biljnih bolesti uzrokovanih patogenim gljivama jeste genetička varijabilnost u populaciji patogena. McDonald i Linde (2002) zastupaju stanovište da je genetička struktura određena evolucionom istorijom date populacije, odnosno mutacijom, selekcijom i protokom gena. Prema tome, efektivna veličina populacije patogena, sposobnost patogena da izazove infekciju i način na koji se vrši reprodukcija patogena su varijabilni pokazatelji koji se mogu koristiti za utvrđivanje "efekta osnivača" odnosno broja introdukcija u nove geografske oblasti. Širenje patogena se stalno dešava, smanjujući varijabilnost takvih populacija gljiva, ali i uzrokujući epidemije na novim biljkama u oblastima gde patogen ranije nije bio rasprostranjen (Linde i sar., 2010). U novim uslovima sredine može se pokazati da patogen ima veći evolucioni potencijal nego što je bio u originalnoj osnivačkoj populaciji (McDonald i Linde, 2002). Kao posledica, dolazi do nagomilavanja dodatnih mutacija, stvaraju se novi genotipovi i povećava efektivna veličina populacije patogena. Kako se može zaključiti, na diverzitet populacije patogena značajno utiče raspon ekoloških i životnih parametara, uključujući raspored biljaka domaćina, dužina života biljke, načini razmnožavanja i dr. (Linde i sar., 2010). Upoređivanje nasumičnih sekvenci DNK može biti naročito informativno za filogenetske studije populacija patogena, odnosno za razlikovanje različitih sojeva unutar iste vrste i to u zavisnosti od domaćina, geografske regije ili nekog morfološkog karaktera. Jednostavne ponavljajuće sekvence (SSR, *simple sequence repeats*), kratki tandemske ponovci (STR, *short tandem repeats*) ili brojčano varijabilni tandemske ponovci (VNTR, *variable number tandem repeats*) su segmenti DNK sačinjeni od nekoliko nasumično raspoređenih, uzastopno ponovljivih motiva, koji se sastoje od 1-10 baznih parova. Mikrosateliti se odlikuju visokim polimorfizmom i kodominantno se nasleđuju i pokazali su se vrlo efikasni u mapiranju genoma, populacionoj genetici i identifikaciji gljiva (Brufford i Wayne, 1993). Veći broj studija istakao je značaj mikrosatelitskih ili SSR ponovaka za proučavanje epidemiologije biljnih mikoza i *Alternaria* vrsta (Peever i sar., 2002).

Kada su u pitanju patogene gljive za koje do sada nije utvrđen polni stadijum kao što je to kod vrsta roda *Alternaria*, proučavanje genetičke strukture populacija je neophodno jer osim što odsustvo polnog stadijuma otežava klasifikaciju, takođe nije moguće proceniti granice vrsta na osnovu seksualne kompatibilnosti (Cooke i sar., 1998; Leiminger i sar., 2013).

Do sada, broj radova i metoda u kojima je proučavan genetički diverzitet populacija *Alternaria* korišćenjem mikrosatelitskih regiona je ograničen: *A. solani* (van der Waals i sar., 2004); *A. alternata* (Morris i sar., 2000; Gherbawy, 2005; Bagherabadi i sar., 2015; Meng i sar., 2015; Esfahani, 2018); *A. brassicicola* (Bock i sar., 2002, 2005; Linde i sar., 2010; Kreis i sar., 2016); *A. helianthi* (Prasad i sar., 2009); *Alternaria* spp. (Pryor i Michailides, 2002; Mercado Vergnes i sar., 2006).

1.7. Mere suzbijanja i kontrole patogenih vrsta roda *Alternaria*

Razvoj bolesti zavisi od niza dinamičkih interakcija između biljke domaćina i patogena, na ćelijskom, histološkom nivou kao i na nivou cele biljke, ali i od uslova spoljašnje sredine. Danas se u zaštiti bilja primenjuju različite metode kontrole bolesti i štetočina zasnovane na hemijskim, genetičkim, biološkim i agrotehničkim metodama koje objedinjene čine integralnu kontrolu (Cartwright i Benson, 1995).

1.7.1. Hemijske mere zaštite

Veliki broj studija pokazuje da je primena fungicida na vrste roda *Alternaria* najefikasnija onda kada prag infekcije biljaka dostigne oko 25% (Shrivastava i sar., 2015). Tiram 75 (grupa ditiokarbamata) se pokazao kao vrlo efikasan fungicid pri 5000 ppm, dok je Tiram 80 i Arasan 50 pri koncentracijama 10 000 ppm doveo do potpune inhibicije rasta *Alternaria* spp. na kupusnjačama (Saharan i sar., 2016). Najbolji efekat zaštite karfiola postignut je kombinacijom preparata Dithane Z-78 (zineb, grupa ditiokarbamata), Difoltan (benzilimidazol), Blitox (bakar-oksihlorid) i Bordovska čorba (Singh i sar., 2015). Vrlo efikasan u suzbijanju *Alternaria* patogena na semenu rotkvice pokazao se preparat Dithane M-45, ali i Bordovska čorba (Saharan i sar., 2016). U kontroli *Alternaria* patogena pokazalo se da tri uzastopna tretiranja Dithane M-45 mogu biti efikasnija u odnosu na tretiranja drugim fungicidima kao što su Kavach, Foltaf, Bayleton, Baycor i Contaf (Singh i Singh, 2006). Fungicid Mankozeb se pokazao najefikasniji za inhibiranje rasta micelije *A. brassicae* (Singh i sar., 2015). Od sedam testiranih fungicida u različitim koncentracijama, hlortalonil, bakar-oksihlorid, azoksistrobin, propineb, bakar-hidroksid i mankozeb, svi preparati su pokazali značajnu inhibiciju rasta *A. alternata* (Verma i Saharan, 1994). U kontroli razvića ove vrste, vrlo efikasnim su se pokazali i različiti preparati sa dodatkom biljnih hormona, poput indol-3-butirične kiseline ili naftalne kiseline, koji mogu značajno odložiti razvoj bolesti i truljenje plodova (Datar, 1996). Za preparat Amistar (azoksistrobin i ciprokonazol) dokazano je da vrlo uspešno inhibira rast *Alternaria* spp. na kupusu, smanjujući učestalost javljanja bolesti za 89-94% (Sidlauskiene i sar., 2003). Za suzbijanje *A. brassicicola* na kupusu, tri tretiranja Ditan M-45 (0,25%), Kavach (0,1%) ili Foltof (0,25%) u razmaku od 10 dana, pokazala su se najefikasnijim (Verma i Verma, 2010).

U Srbiji, vrlo zastupljeni fungicidi za kontrolu lisne pegavosti uzrokovane *Alternaria* spp. su preparati iz grupe azoksistrobina koji se apliciraju nekoliko puta godišnje, najčešće pred kraj sezone, kada je učestalost javljanja bolesti najveća. Strobilurinski preparati se baziraju na strobilurinu, jedinjenju koje proizvodi *Strobilurus tenacellus* iz koje je i izolovan strobilurin A, dok su drugi strobilurini izvedeni kao estri ili amidi. Oni inhibiraju transport elektrona između citohroma b i c1 u elektron-transportnom lancu mitohondrija inhibirajući respiratorni lanac i proizvodnju ATP molekula što utiče na klijanje spora i rast micelije (Vega i Dewdney, 2014). U Srbiji je u komercijalnoj upotrebi preparat *Quadris*, lokalsistemični fungicid sa aktivnom materijom azoksistrobinom. Deluju protektivno, kurativno i eradikativno na skoro sve gljive iz klasa Oomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes i Deuteromycetes (Bartlett i sar., 2002). Zbog specifičnog mehanizma delovanja za ovu grupu fungicida postoji visok rizik od pojave rezistentnosti. Do sada je rezistentnost na

azoksistrobin registrovana kod vrsta *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* i *A. solani* (Ma i sar., 2003). Detektovana su tri tipa mutacija nukleotida u sekvenci *cytb* gena, koje vode promeni aminokiselina u peptidnom lancu proteina i onemogućavaju vezivanje fungicida za aktivno mesto enzimskog kompleksa pa se smatraju odgovornim za rezistentnost patogena. To su mutacije F129L, G137R i G143A: konverzija aminokiseline fenilalanin u leucin na poziciji 129, odgovorna je za delimičnu rezistentnost patogenih vrsta roda *Alternaria* (F129L); promena aminokiseline glicin u alanin na poziciji 143 (G143A), odgovorna je za potpunu rezistentnost na dati fungicid; dok se mutacija G137R i promena aminokiseline glicin u argin, najređe sreće, ali je takođe odgovorna za delimičnu rezistentnost. Do sada u Srbiji, nije registrovana smanjena efikasnosti ovih fungicida na kupusnjačama, međutim ispitivanja i monitoring osetljivosti patogena su pod pojačanim nadzorom, kao i širom sveta.

1.7.2. Biološke mere zaštite

Metode genetskog inženjeringa. Ove metode su omogućile razvoj novih transgenih biljnih varijeteta otpornih na bolesti. Transgene biljke brokolija (*B. oleracea* var. *italica* hibrid *green comet*) u koji je ubačen gen poreklom iz *Trichoderma* spp. mogu proizvoditi enzim endohitinazu koji biljke brokolija čini otpornim na veliki broj patogena (Mamgain i sar., 2013).

Upotreba biljnih ekstrakata. Ekstrakti velikog broj vrsta biljaka, kao što su: *Lawsonia inermis*, *Canna indica*, *Allium sativum*, *Ipomoea palmata*, *Cenchrus catharticus*, *Mentha piperita*, *Prosopis spicigera*, *Allium cepa*, *Argemone mexicana*, *Convolvulus arvensis*, *Datura stramonium* i *Clerodendron inerma* su pokazali da u potpunosti mogu inhibirati klijanje spora izolata *A. brassicae* sa karfiola (Saharan i sar., 2016). Datar (1996) je demonstrirao da ekstrakt belog luka može inhibirati rast *A. alternata* u kulturi. Ekstrakti dve korovske biljke, *Polygonum perfoliatum* i *Glycyrrhiza glabra*, su pokazali inhibitorno delovanje na rast izolata *A. brassicicola* sa kupusa (Ching, 2007) dok je ekstrakt *Myoporum bontioides* inhibitorno delovao na rast izolata *A. alternata* i *A. brassicicola* (Saharan i sar., 2016). Od testiranih biljnih ekstrakata, najjače delovanje na izolate *A. brassicae* pokazali su ekstrakti *Camellia sinensis*, *Asparagus racemosus*, *Aloe vera*, *Acacia nilotica* i *Anthocephalus cadamba* dok je ekstrakt *Astercantha longifolia* pokazao umereno inhibitorno delovanje (Mamgain i sar., 2013). Testiranjem antifungalne aktivnosti nekih komponenti propolisa ustanovljen je inhibitorni efekat na rast izolata *A. alternata* sa paradajza koji je po efikasnosti bio veći od komercijalnih fungicida koji često imaju negativne sporedne efekte na zrenje i kvalitet plodova (Saharan i sar., 2016).

Biokontrola. Primena hemijskih preparata za kontrolu biljnih bolesti predstavlja potencijalnu opasnost po životnu sredinu i zdravlje ljudi i životinja. Zadržavanje međuprodukta degradacije preparata u ekosistemu, veliki troškovi razvoja novih preparata i vrlo zahtevni uslovi registracije, uticali su na razvoj alternativnih metoda za suzbijanje štetnih organizama, posebno biopesticida (Cartwright i Benson, 1995). Danas se u svetu velika pažnja posvećuje istraživanjima prirodnih produkata sa ciljem dobijanja biopesticida. Biopesticidi podrazumevaju primenu korisnih mikroorganizama i produkata njihovog metabolizma delujući antagonistički na prouzrokovaoče bolesti ili na imuni sistem biljke, nisu štetni za ljude i ekološki su bezbedni (Heydari i Pessarakli, 2010). Organizmi kao što su *Trichoderma koningii*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium* spp. i *T. harzianum* pokazali su antagonističko delovanje i inhibiciju rasta *A. brassicicola* i *A. japonica* na semenu rotkvice (Vananacci i Harman, 1987). Takođe, za neke sojeve *Streptomyces bobili* je pokazano da mogu imati inhibitorno dejstvo na rast *A. brassicae*, *A. brassicicola* i *A. raphani* (Babu i sar., 2000). Neke aktinomycete, soj A19, poseduju inhibitorno dejstvo na rast *A. alternata* (Saharan i sar., 2016). Bakterije rodova *Pantoea* i *Bacillus* pokazale su se vrlo efikasnim biološkim agensima kako in

vitro tako i *in vivo*. U Srbiji, registrovano je nekoliko bioloških fungicida, od kojih se u praksi najviše sreću F-stop (*Bacillus subtilis*), Polyversum (na bazi *Pythium oligandrum*) i Trifender (*Trichoderma asperellum*) i koriste se za suzbijanje fitopatogenih vrsta iz rodova *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Fusarium* i *Sclerotinia* (Grahovac i sar., 2009).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Poslednjih godina, došlo je do ekspanzije gajenja i rasta proizvodnje kupusnjača u svetu, pre svega uljane repice, ali i ostalih vrsta, kao što su ren, kupus, brokoli i karfiol. Imajući u vidu ekonomski značaj ovih biljaka sa jedne strane kao i njihovu osetljivost na patogene vrste roda *Alternaria*, sa druge, kao i činjenicu da u Srbiji, ali i u oblasti jugostočne Evrope, do sada nije urađena detaljna analiza prisustva, varijabilnosti i patogenosti pojedinih vrsta ovog roda na kupusnjačama, postavljeni su sledeći ciljevi:

- opis simptoma bolesti u polju, utvrđivanje učestalosti javljanja kao i izolacija prozrokovala sa različitih domaćina;
- identifikacija patogena na osnovu morfoloških i molekularnih karakteristika do nivoa vrste;
- ispitivanje uticaja sastava hranljivih podloga i temperature na morfološke karakteristike kolonija i konidija izolovanih *Alternaria* spp;
- istraživanja patogenosti i potencijalnih vrsta biljaka domaćina;
- određivanje intra- i interpopulacione varijabilnosti i taksonomske pripadnosti izolata molekularnim metodama, a potom i konstrukcijom filogenetskih stabala i genealoških mreža na osnovu sekvenci *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* gena;
- utvrđivanje stepena genetičke varijabilnosti i procena strukturiranosti populacija *Alternaria* vrsta na osnovu analize četiri mikrosatelitska regiona;
- molekularna istraživanja *cytB* gena sa ciljem detekcije prisustva mutacija koje bi uticale na smanjenje efikasnosti primene fungicida azoksistrobina;
- ispitivanje potencijalnih antagonističkih uticaja vrsta iz rodova *Trichoderma* i *Fusarium* kao alternativne metode biološke borbe na suzbijanju patogenih vrsta *Alternaria*;

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Sakupljanje biljnog materijala sa simptomima bolesti

Tokom četvorogodišnjeg monitoringa, 2013-2016, vršen je obilazak najznačajnijih regiona gajenja kupusnjača i pregled zasada na prisistvo simptoma lisne pegavosti prouzrokovane *Alternaria* spp. Biljni materijal sa simptomima bolesti je prikupljen sa 35 parcela, 24 lokaliteta raspoređena u 22 administrativna okruga. Sa teritorije cele Srbije prikupljeni su uzorci zaraženih biljaka: rena sa 9 lokaliteta, kupusa sa 14, brokolija sa 7, karfiola sa 7, kelerabe sa 5, kelja sa 4 lokaliteta, dok su sa 9 lokaliteta iz severne Srbije prikupljane obolele biljke uljane repice. Sakupljeni broj uzoraka je varirao u zavisnosti od veličine zasada, izgleda obolelih biljaka i intenziteta zaraze i kretao se od 6 do 29 biljaka. Uzorkovanje je vršeno na jednakim razmacima, u dijagonalnom transektu od jednog kraja zasada do drugog i istovremeno je vršena procena učestalosti javljanja bolesti. Svaki uzorak biljke sa simptomima bolesti je obeležen, odložen u papirnu kesu i transportovan u ručnom frižideru do Laboratorije Odseka za bolesti bilja, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu.

3.2. Izolacija patogena i dobijanje čistih kultura

Izolacija patogena je vršena standardnim fitopatološkim metodama (Dhingra i Sinclair, 1986). Fragmenti biljaka, veličine oko 1x1 cm, isecani su sterilnim skalpelom sa prelaza nekrotičnog i zdravog tkiva biljke i površinski sterilisani 1 min u 1% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl). U laminarnoj komori, sterilisani fragmenti su ispirani destilovanom vodom tri puta i prebačeni na sterilni filter papir kako bi se odstranio višak vode. Nakon toga, isečci su postavljeni u centar Petri kutije sa krompir dekstroznim agarom (PDA, *potato dextrose agar* – Dhingra i Sinclair, 1986) i inkubirani na temperaturi od 23 °C, 3 dana u uslovima 8 h/16 h smene svetla i mraka. Nakon inkubacije izvršena je opservacija dobijenih kultura pod binokularom i u aseptičnim uslovima, sterilnom iglom, delovi hifa ili pojedinačne spore su inokulisani na V8 podlogu (200 ml V8 soka, 3 g CaCO₃, 15 g agara i 800 ml sterilne destilovane vode – SDV) koja je inkubirana 5 dana na 23 °C u uslovima 8 h/16 h smene svetla i mraka, kako bi se dobile čiste kulture. *In situ*, pod mikroskopom je posmatran izgled konidija i obrazac sporulacije sa ciljem identifikacije prouzrokovala bolesti tj. potvrde *Alternaria* spp.

Sa ciljem formiranja kolekcije autohtonih izolata prouzrokovala lisne pegavosti kupusnjača u Srbiji, čiste kulture *Alternaria* spp. su standardnim mikološkim metodama prenesene u epruvete sa kosom PDA podlogom. Nakon pet dana inkubacije na 23 °C i razvoja kultura, epruvete su deponovane u frižider na 4 °C. Sva eksperimentalna ispitivanja obavljena su u Odseku za bolesti bilja, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu gde je smeštena i mikoteka.

3.3. Analize morfoloških osobina izolata *Alternaria* spp.

Proučavanje morfologije *Alternaria* spp. izolovanih sa biljaka iz fam. Brassicaceae u Srbiji obuhvatalo je makroskopsku i mikroskopsku karakterizaciju kolonija na V8 podlozi. Fragment micelije (Ø 5mm), isečen sa rastuće, ivične zone kolonije *Alternaria* sp. gajenih 5 dana na V8, na 23 °C, postavljen je u centar Petri kutija sa V8 podlogom. Inokulisane Petri kutije inkubirane su u komori sa hladno belim osvetljenjem na udaljenosti od 40 cm, na 23 °C

tokom 7 dana. Makroskopska proučavanja obuhvatala su praćenje razvoja i stope rasta, teksture i boje kolonija kao i izgleda i boje ivica kolonije. Stopa rasta kolonija praćena je tokom 7 dana gajenja, vršena su uzastopna merenja dijametra kolonija u dva dijagonalna pravca. Izračunata srednja vrednost je izražena u mm rasta po danu (mm dan^{-1}). Tri ponavljanja su postavljena za svaki izolat.

Praćenje mikroskopskih osobina izolata *Alternaria* spp. obuhvatalo je izgled i veličinu konidija kao i vrata konidija (50 nasumično odabranih konidija po izolatu), broj transverzalnih i longitudinalnih septi, kao i karakteristike obrasca sporulacije, odnosno načina na koji su raspoređene konidije na konidioforima. Za mikroskopsko posmatranje obrasca sporulacije fragment micelije sa konidioforima i konidijama postavljen je na predmetno staklo u kapi SDV. Za posmatranje izgleda i veličine konidija, pravljena je suspenzija spora. Nakon završenog praćenja stope rasta izolata, u Petri kutiju dodato je 5 ml SDV sa 0,5 ml Tween 20%. Smeša micelije i spora je filtrirana kroz sterilnu gazu. Privremeni mikroskopski preparati pravljene su nanošenjem kapi suspenzije spora na predmetno staklo i prekrivanjem pokrovnim staklom. Za posmatranje preparata korišćen je mikroskop Olympus BX51 (400x) dok je za posmatranje obrasca sporulacije korišćen binokular EU scope (90x). Za identifikaciju vrsta roda *Alternaria* korišćen je protokol preporučen od strane Simmons (2007). U komparativna proučavanja uključena su i dva referentna izolata *A. brassicae* EGS 38-032 i *A. brassicicola* EEB 2232.

3.4. Analize fizioloških osobina izolata *Alternaria* spp.

Za ispitivanje fizioloških osobina izolata *Alternaria* spp. sa kupusnjača obuhvaćen je izgled kolonija, stopa rasta kao i intenzitet sporulacije, dužina konidija i vrata konidija na različitim hranljivim podlogama i temperaturama. Makroskopska i mikroskopska proučavanja izolata odvijala su se po protokolu opisanom u potpoglavlju 3.3. Za određivanje intenziteta sporulacije korišćena je suspenzija konidija (potpoglavlje 3.3) dok je hemocitometrom određivan broj spora u 1 ml suspenzije, a po potrebi suspenzija je razređivana (Muntañola-Cvetković, 1987). U komparativna proučavanja uključena su i dva referentna izolata *A. brassicae* EGS 38-032 i *A. brassicicola* EEB 2232. Statistička analiza sprovedena je kako je naznačeno u potpoglavlju 3.10.

3.4.1. Hranljive podloge za testiranje rasta, intenziteta sporulacije i dužine konidija

Korišćene su četiri hranljive podloge: V8, sladni agar (MA) (Dhingra i Sinclair, 1986), krompir dekstrozni agar (PDA) i Čapek kisela podloga (CZ) (Dhingra i Sinclair, 1986). Fragmenti micelije (\varnothing 5mm) ispitivanih izolata, isecani su sa periferije kolonija posle 7 dana rasta na V8 agaru na 23 °C i postavljeni u centar Petri kutija sa 20 ml testirane hranljive podloge. Petri kutije su inkubirane u komori sa hladno belim osvetljenjem na udaljenosti od 40 cm, na 23 °C tokom 7 dana. Tri ponavljanja su postavljena za svaki izolat.

3.4.2. Opseg testiranih temperatura za rast, intenzitet sporulacije i dužinu konidija

Fragmenti micelije (\varnothing 5mm), isecani su sa ivica kolonija *Alternaria* spp. gajenih 7 dana, na 23 °C, na V8 podlozi. Fragmenti su postavljeni u centar Petri kutija sa PDA podlogom koje su potom inkubirane u komorama na 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C. Tri ponavljanja su postavljena za svaki izolat i ispitivanu temperaturu.

3.5. Provera patogenosti i potencijalne biljke domaćini

U cilju provere patogenosti izolata *Alternaria* spp. sa kupusnjača, urađene su veštačke inokulacije na listovima svih biljaka domaćina. Za test patogenosti odabrane su zdrave, 8 nedelja stare biljke uljane repice, rena, kupusa, brokolija, karfiola, kelerabe i kelja sa najmanje 10 potpuno formiranih listova. Suspenzija spora koja je korišćena za inokulaciju biljaka pripremljena je od kulture gajene na 23 °C, 7 dana na V8 podlozi prema protokolu opisanom u potpoglavlju 3.3. Suspenzija spora koncentracije 10^6 ml^{-1} je određivana hemocitometrom, po potrebi su od početne suspenzije pravljena razblaženja. U testu patogenosti, testirane su dve inokulacione metode. U prvoj inokulacionoj metodi suspenzija spora je postavljena na intaktnu površinu lista, dok je za drugu metodu list biljke prethodno povređen sterilnom iglom. Na 6 simetričnih mesta na intaktnoj i oštećenoj lisnoj površini postavljeno je 20 μm suspenzije. Biljke korišćene kao negativne kontrole su inokulisane sa SDV. Suspenzija svakog izolata inokulisana je na tri lista svake biljke domaćina. Nakon inokulacije, biljke su postavljene u klima komore sa relativnom vlažnošću 95 do 100%, 72 h na temperaturi 23/18 °C i fotoperiodom 8 h/16 h. Patogenost je ocenjivana posle 7 dana od inokulacije, praćenjem pojave prvih simptoma u vidu okruglih, braonkastih lezija na listu. Za procenu patogenosti izolata merena je površina nekrotičnih lezija lista pri čemu je korišćen program ImageJ (Schenider i sar., 2012). Izolati su smatrani patogenim ukoliko su izazivali simptome vidljive golim okom, odnosno >2% nekroze lista. Reizolacija sa inokulisanih listova na kojima su se javili simptomi bolesti vršena je po metodi opisanoj za izolaciju patogena (potpoglavlje 3.2). U komparativna proučavanja uključena su i dva referentna izolata *A. brassicae* EGS 38-032 i *A. brassicicola* EEB 2232.

3.6. Molekularne metode za identifikaciju i karakterizaciju izolata

3.6.1. DNK ekstrakcija

Ekstrakcija DNK je obavljena u skladu sa uputstvima proizvođača komercijalnog kita DNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany). Pod stereo mikroskopom, iz kultura gljiva gajenih 7 dana na PDA, na 23 °C, sterilnom iglom, vrlo pažljivo kako ne bi bila zahvaćena i podloga, sakupljana je micelija rastuće zone izolata i prebacivana u sterilne mikrotube zapremine 1,5 ml (od 20 do 50 mg). U mikrotube sa micelijom dodavan je tečni azot i uz pomoć tučkova za jednokratnu upotrebu vršena je homogenizacija sadržaja. Nakon homogenizacije, u svaku mikrotubu dodavano je po 400 μl AP1 pufera sa ciljem oslobađanja ćelijskog sadržaja i pružanja stabilnog okruženja za oslobođene molekule. Za otklanjanje jednolančane RNK, odnosno za eliminisanje aktivnosti endo- i egzonukleaza prema DNK korišćen je Enzim RNase A (4 μl). Sadržaj je sjedinjen jakim protresanjem i mikrotube su prebačene u vodeno kupatilo na 65 °C u trajanju od 20 min. U toku kuvanja, mikrotube su još nekoliko puta snažno protresane kako bi se podstaklo oslobađanje ćelijskog sadržaja i razlaganje RNK. Nakon ovoga, po 130 μl P3 pufera dodavano je u svaku mikrotubu. Dodavanje P3 pufera ima za funkciju taloženje komponenti ćelija odnosno proteina i ugljenih hidrata u datoj smeši. Nakon mešanja na Vortex-u mikrotube su postavljene u stalak sa ledom u trajanju od 5 min. U sledećoj fazi, sadržaj mikrotuba je prebačen u QIAshredderMini Spin kolone sa kolektorskim mikrotubama i centrifugiran 2 min na 14.000 rpm. Nakon centrifugiranja, pažljivim pipetiranjem, kako se ne bi poremetio talog, tečna faza je prebačena u mikrotube od 1,5 ml nakon čega je dodato oko 675 μl pufera AW1 (zavisno od količine tečne faze) i sadržaj je promešan pipetom. U sledećoj fazi, sadržaj mikrotuba je prebacivan u DNeasy Mini Spin kolone sa kolektorskim tubama (iz jednog ili dva puta zavisno od količine tečnosti u tubici)

koje su centrifugirane 1 min na 8.000 rpm. Posle centrifugiranja sadržaj iz kolektorske tube je odstranjen dok je DNK ostala vezana za filter kolone. U sledećem koraku, na filter DNeasy Mini Spin kolone dodato je 500 µl AW2 pufera, nakon čega su tube centrifugirane 1 min na 8.000 rpm. Na filter DNeasy Mini Spin kolone ponovo je dodavano 500 µl AW2 pufera, nakon čega je obavljeno centrifugiranje 2 min na 14.000 rpm kako bi se prečistila DNK na filteru. Ukoliko bi se vizuelno uočilo da na filteru i dalje postoje nečistoće, dodavano je 500 µl etanola i postupak je ponovljen kao sa AW2 puferom. Kolektorske tube su potom odstranjene, a DNeasy Mini Spin kolone su prebačene u nove mikrotube zapremine 1,5 ml, nakon čega je na filter spin kolone dodavano 100 µl AE pufera. Mikrotube su držane na sobnoj temperaturi 5 min, nakon čega su centrifugirane 1 min na 8.000 rpm. Dodavanje AE pufera imalo je za cilj rastvaranje DNK sa filtera. Uzorci DNK su čuvani u zamrzivaču na -20 °C.

3.6.2. Lančana reakcija polimeraze

Pored morfološke identifikacije izolata, metoda lančane reakcije polimeraze (PCR-*polymerase chain reaction*) korišćena je za umnožavanje specifičnih regiona DNK koji su omogućili detekciju i identifikaciju izolovanih gljiva molekularnim metodama. Identifikacija je vršena umnožavanjem četiri specifična "housekeeping" i protein kodirajuća genska regiona i to: *Alt a1*, *GAPDH*, *ATP* i *RPB2* kao i *ITS* regiona.

Za umnožavanje *ITS* regiona korišćeni su *ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') i *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') prajmeri, prema temperaturnim uslovima koje preporučuje Woudenberg i sar. (2013) koji su korigovani na prikazani način:

inicijalna denaturacija	95 °C	5 min	
denaturacija	95 °C	30 s	35 ciklusa
hibridizacija prajmera	59 °C	50 s	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

Amplifikacija *Alt a 1* regiona sprovedena je koristeći prajmere *alt-for* (5'-ATGCAGTTCAC CACCATCGC-3') i *alt-rev* (5'-ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC-3') prateći protokol Hong i sar. (2005) koji je izmenjen na sledeći način:

inicijalna denaturacija	94 °C	1 min	
denaturacija	94 °C	30 s	35 ciklusa
hibridizacija prajmera	62 °C	30 s	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

Region *GAPDH* je umnožen koristeći prajmere *gpd1* (5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3') i *gpd2* (5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3') prema Lawrence i sar. (2018):

inicijalna denaturacija	94 °C	5 min	
denaturacija	94 °C	30 s	35 ciklusa
hibridizacija prajmera	53 °C	30 s	
elongacija	72 °C	90 s	
finalna elongacija	72 °C	7 min	

Prajmeri *ATPDF1* (5'-ATCGTCTCCATGACCGAGTTCG-3') i *ATPDR1* (5'-TCCGATGGAGTTCATGATAGCC -3') su korišćeni za umnožavanje regiona *ATP* gena kako je opisano od strane Lawrence i sar. (2013):

inicijalna denaturacija	94 °C	4 min	
denaturacija	94 °C	30 s	35

hibridizacija prajmera	59 °C	30 s	ciklusa
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	5 min	

Za genski region *RPB2* korišćeni su prajmeri *RPB2DF* (5'-ACCGACACACAAATGCTGGAGC) i *RPB2DR* (5'-CAAGACCCCAATGAGAGTTGTG) prema protokolu Lawrence i sar. (2013) koji je izmenjen na sledeći način:

inicijalna denaturacija	94 °C	5 min	40 ciklusa
denaturacija	95 °C	40 s	
hibridizacija prajmera	59 °C	30 s	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

Smeša za PCR reakcije sadržala je 25 µl: po 1 µl prajmera (100 pmol/µl, Metabion International, Deutschland) i 1 µl DNK uzorka, 4 µl od smeše nukleotida 200 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 µl TE pufera (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,6), 0,5 µl 100 µM MgCl₂, 1U Taq polimeraze (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 14,85 µl sterilne molekularne RNase-free vode. Kao negativna kontrola korišćena je PCR reakciona smeša gde je umesto DNK dodavana molekularna voda (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). PCR reakcija izvedena je u 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California) pri gore navedenim uslovima PCR reakcije.

Umnoženi PCR produkti su razdvojeni elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Agarozni gel je pravljn rastvaranjem 1 g agaroze u 100 ml 1 × TBE pufera (Tris-Borat 90 mM, EDTA 1 mM, nakon čega je dodato 2 µl Midori Green DNA Stain; Nippon Genetics, Europe). U svaki bunarčić na gelu stavljeno je 5 µl PCR smeše bojene sa 1 µl boje (Loading dye, Fermentas). Elektroforeza je tekla 20 min pri konstantnom naponu struje od 100 V, u aparatu za horizontalnu elektroforezu (MUPID ONE electrophoresis unit, Nippon Genetics, Europe). Za vizualizaciju PCR produkata korišćen je UV transiluminator (TFP-M/WL 312, VilberLourmat) i nakon toga gelovi su fotografisani (DOC PRINT DP-001, FDC). Za određivanje veličine umnoženog PCR produkta korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) sa veličinom DNK fragmenata od 100 do 3000 bp.

3.6.3. Prečišćavanje PCR produkata

Nakon uspešnog umnožavanja i nakon vizuelizacije, PCR produkti su prečišćeni uz pomoć komercijalnog kita QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), prema uputstvu proizvođača. U mikrotube sa PCR reakcionom smešom (20 µl) dodato je 100 µl PBI pufera (5 zapremina reakcione smeše), a smeša je zatim prebačena u QIAquick kolonu sa kolektorskom tubicom i centrifugirana 1 min na 13.000 rpm. Nakon centrifugiranja tečna faza je odbačena i u kolonu je dodavano 750 µl PE pufera i ponovo je centrifugirano 1 min na 13.000 rpm. Tečna faza i kolektorska tubica se odbacuju, a kolona se prebacuje u mikrotube od 1,5 ml. Na filter QIAquick kolone se dodaje 50 µl EB pufera i centrifugira 1 min na 13.000 rpm. Mikrotube sa DNK, spremne za sekvenciranje, čuvane su na 4 °C do pripreme za slanje na uslužno sekvenciranje (<https://dna.macrogen.com/#>).

3.6.4. Molekularna identifikacija *Alternaria* spp.

Za sređivanje i proveru kvaliteta sekvenci korišćen je program FinchTV Version 1.4.0. (<http://www.geospiza.com/finchtv/>), dok je za poravnanje i poređenje sekvenci korišćen program ClustalW kao deo MEGA 6 softverskog paketa (Tamura i sar., 2013). Sekvence izolata *Alternaria* spp. iz Srbije su unete u online NCBI GenBank bazu podataka (*National Center for*

Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) i dodeljen im je pristupni broj (*GenBank Accession Number*). Molekularna identifikacija vršena je BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) analizom sređenih sekvenci izolata sa kupusnjača u Srbiji i poređena sa dostupnim sekvencama ispitivanih gena drugih *Alternaria* spp. u GenBank bazi podataka (<http://blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.6.5. Konstrukcija genealoške mreže i filogenetskih stabala

Za proučavanje inter- i intra populacijske varijabilnosti *Alternaria* spp. izolovanih sa različitih kupusnjača u Srbiji, konstruisana je genealoška mreža haplotipova za svaku vrstu za koju je ustanovljeno postojanje više haplotipova. Za konstruisanje genealoške mreže korišćen je program TCS v.1.2.1 (Clement i sar., 2000).

Za konstrukciju filogenetskih stabala, najpogodniji model nukleotidne supstitucije utvrđen je korišćenjem programa jmodeltest v2.1.7 (Darriba i sar., 2012) posmatrajući Bajesov infomacioni kriterijum (BIC, *Bayesian Information Criterion*). Filogenetska stabla konstruisana su putem Maximum Likelihood (ML) metode, integrisane unutar programa MEGA verzija 6.0. i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja (Tamura i sar., 2013). Druga algoritamska šema, na osnovu istog BIC informacionog kriterijuma, sprovedena je u programu Mr. Bayes (Ronquist i sar., 2012). Korišćeni parametri za analizu su podrazumevali dva simultana ponavljanja od 1 000 000 generacija, uzorkovanje na svakih 100 generacija i odbacivanje 25% konstrukcija rezultata (*burn-in* 25%) radi eliminisanja greške. Za procenu verodostojnosti rezultata analize, odnosno dostizanje stacionarne faze Markovljevih lanaca (MCMC, *Markov Chain Monte Carlo*) prilikom uzorkovanja i provere stabilnosti analize u MrBayes-u, korišćen je program Tracer v.1.5.0 (Rambaut i Drummond, 2009). Korišćena outgrupa je referentni izolat *Stemphylium callistephi* EEB 1055 (Woudenberg i sar., 2013) (Tabela 6). Za vizuelizaciju stabala i posteriornih verovatnoća primenjen je program FigTree v.1.4. (Rambaut and Drummond, 2012).

3.7. Analiza mikrosatelitskih markera *Alternaria brassicicola*

Za analizu genetičkog diverziteta populacije *A. brassicicola* korišćena su četiri mikrosatelitska lokusa, prethodno dizajnirana za *A. brassicicola*. Za svaki od parova prajmera AB1 [*Abmic 4f* (5'- CTGGCCTTGGCTGTCTAGCG -3') i *Abmic 4r* (5'- TCCAGTCGATAAGATCAAACC -3')]; AB2 [*Abmic 8f* (5'- CTTACAGCATCGAGGCAAAA -3') i *Abmic 8r* (5'- GACATGACATGGCGTTGTGT -3')]; AB3 [*Abmic 9f* (5'- CCGAGAGAAGCAACATACTG -3') i *Abmic 9r* (5'- TAGGCGTGATCTTGCCGAGG -3')]; i AB4 [*Abmic 11f* (5'- GGTGGTTGAGTGCTTGATTTG -3') i *Abmic 11r* (5'- GTCGGGCTTGATATCCTTTG -3')] (Avenot i sar., 2005) pravljena je posebna PCR smeša koja je sadržala 1,5 µl DNK, 0,4 µM koncentraciju svakog od prajmera, 200 µM od svakog dNTP, 2,5 µl TE pufera, 0,5 µl 100 µlM MgCl₂, i 1 U Taq Hot Start DNK polimeraze (Fermentas, Vilnius, Lithuania) (Kreis i sar., 2016). Za umnožavanje datih regiona korišćena je PCR metoda prema uslovima Avenot i sar. (2005) u 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California):

Inicijalna denaturacija	94 °C	3 min	
denaturacija	94 °C	30 s	
hibridizacija prajmera	55 °C za AB1; 58 °C za AB2; 60 °C za AB3 i AB4	30 s	30 ciklusa
elongacija	72 °C	30s	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

PCR umnoženi fragmenti ispitivanih izolata poslani su na uslužno sekvenciranje u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer u Macrogen, Inc (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Sekvence dobijene PCR umnožavanjem od strane svakog pojedinačnog SSR para prajmera smatrane su alelima. Pridružujući alele svakog SSR lokusa redom formirani su haplotipovi. Na osnovu umnoženih alela određuje se broj genotipova u populacijama *A. brassicicola* u Srbiji (MLG, *multilocus genotype richness*).

Statističke analize obavljene su u programu *RStudio*, verzija 1.1.463 kao i u *popr package*, v 2.1. Za analizu udela varijanse, uzrokovane razlikama između jedinki unutar populacija i između populacija različitih regiona u Srbiji kao i izolata izolovanih sa različitih domaćina, korišćena je analiza molekularne varijanse (AMOVA) (Excoffier i sar., 1992). Genotipski diverzitet određivan je pomoću Neo-vog (Nei's), standardizovanog Šenon-ovog (Shannon index, H) (Shannon, 2001), Stodart-Tejlor-ovog (Stoddart-Taylor's index, G) (Stoddart i Taylor, 1988), Simpson-ovog indeksa diverziteta (Simpson's, λ) (Simpson, 1949), indeksa ujednačenosti (E) (Grunwald i sar., 2003) i indeksa asocijacije (I_A).

Neov indeks diverziteta:

$$H_{\text{exp}} = 1 - \sum P_i^2$$

gde je P_i - frekvencija i -tog alela na datom lokusu (Nei, 1978)

Šenon-ov indeks (H'):

$$H' = - \sum_i (P_i) \ln P_i$$

izražen i kao $N_1 = e^{H'}$ (Hill-ova vrednost Shannon-ov indeksa), gde je P_i - frekvencija genotipova u i -toj nominalnoj kategoriji MLG; (Grunwald i sar. 2003; Hill, 1973)

Stoddart-Taylor indeks:

$$G = 1 / \sum P_i^2$$

gde je P_i - frekvencija i -tog genotipa u populaciji

Simpson-ov indeks:

$$(1 - \lambda) = \sum P_i^2$$

gde je $(1 - \lambda)$ Simpsonov indeks diverziteta a P_i - frekvencija i -tog genotipa u populaciji

Indeks ujednačenosti:

$$E = (G - 1) / (N_1 - 1)$$

Indeks Asocijacije:

$$I_A = (V_0 / V_E) - 1$$

gde je V_0 - zabeležena razlika u varijabilnosti između izolata, dok je V_E očekivana varijabilnost (Grunwald i sar. 2003)

3.8. Analiza prisustva mutacija *cytB* gena kod izolata *Alternaria brassicicola*

Za ispitivanje prisustva mutacija *cytB* gena PCR metodom korišćeni su prethodno razvijeni prajmeri za *A. brassicicola* (Kreis i sar., 2016). Prajmeri *CytB129.2F* i *CytB129.2R* su korišćeni za amplifikaciju kodona koji nosi mutaciju F129L, dok su prajmeri *AbCytB101F* i *AbCytB92R* korišćeni za umnožavanje fragmenta *cytB* gena koji sadrži kodone koji nose mutaciju G137A i G143A. Pravljenе su dve odvojene smeše, svaka zapremine 25 μ l: 1 μ l DNK uzorka, 12,5 μ l 2 \times PCR Master mixa (K071, Fermentas, Lithuania), 9 μ l RNase-free water i po 1,25 μ l svakog prajmera (forward and reverse). Uslovi u kojima su se odvijale PCR reakcije:

Inicijalna denaturacija	94 °C	3 min	35 ciklusa
denaturacija	94 °C	30 s	
hibridizacija prajmera	59 °C	30 s	
elongacija	72 °C	30 s	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

Uzorci su poslani na uslužno sekvenciranje (potpoglavlje 3.6).

3.9. Ispitivanje antagonističkog delovanja saprobnih izolata gljiva sa kupusnjača na patogene *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola*

3.9.1. Izolacija i identifikacija mikromiceta za testiranje antagonističkog delovanja

Prilikom izolacija *Alternaria* spp. sa listova biljaka iz fam. Brassicaceae, u mešovitim kulturama su uočeni izolati gljiva koji su ispoljili antagonističko delovanje na rast *Alternaria* spp. Izolovane su čiste kulture antagonista (potpoglavlje 3.2) i na osnovu morfološkog izgleda kolonija izolati su podeljeni u dve grupe. Identifikacija vrsta ove dve grupe izolata vršena je na osnovu morfoloških i molekularnih karakteristika. Za molekularnu identifikaciju, DNK ekstrakcija sprovedena je po protokolu opisanom u potpoglavlju 3.6.1. Za potrebe molekularne identifikacije korišćeni su univerzalni ITS prajmeri navedeni u potpoglavlju 3.6.2. Ukupna zapremina PCR smeše bila je 25 µl i to: 12,5 µl 2 × PCR Master mixa (Fermentas, Lithuania), 9 µl RNase-free water, po 1,25 µl svakog prajmera (100 pmol/µl) i 1 µl ekstrahovane ukupne DNK. PCR reakcija je obuhvatala podfaze:

inicijalna denaturacija	95 °C	5 min	35 ciklusa
denaturacija	95 °C	30 s	
hibridizacija prajmera	57 °C	30 s	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

Ocenjivanje amplifikovanih produkata, prečišćavanje umnoženih DNK fragmenata i sekvenciranje obavljeno je po proceduri navedenoj u potpoglavlju 3.6.

3.9.2. *In vitro* ispitivanje inhibitornog efekta antagonista

Inhibitorno delovanje saprobnih vrsta gljiva na rast *A. brassicae* i *A. brassicicola* ispitivano je metodom dualnih kultura (Fokkema, 1978). Fragmenti (Ø 5mm) ispitivanih antagonista, isecani su sa periferije kolonija gajenih 7 dana na PDA i inokulisani na Petri kutije sa PDA i to 1 cm od ivice. Sa druge strane Petri kutije, takođe 1 cm od ivice, postavljani su fragmenti (Ø 5mm) ispitivanih *Alternaria* izolata, isecani sa PDA kultura starih 7 dana. Zbog brzog rasta kultura prve grupe ispitivanih antagonista, fragmenti *A. brassicae* i *A. brassicicola* zasejavani su tri dana ranije, dok je zasejavanje fragmenata micelije druge grupe antagonista urađeno istovremeno u trenutku sa zasejavanjem patogena. Ovako pripremljene Petri kutije, inkubirane su 5 dana na 25 °C. Kontrolu su predstavljale kolonije *A. brassicae* i *A. brassicicola* bez antagonista, postavljene 1 cm od ivice Petri kutije sa PDA. Za svaki izolat, ponavljanje testa je obavljeno tri puta. Inhibitorno delovanje utvrđivano je merenjem inhibicije rasta testiranih *Alternaria* izolata. Procenat inhibicije rasta izračunat je prema formuli:

$$I = C - T / C \times 100$$

gde je I = procenat inhibicije rasta, C = prečnik kolonije ispitivanih izolata u kontroli, T- prečnik kolonije ispitivanog izolata u kokulturi sa antagonistom.

3.9.3. *In vivo* ispitivanje inhibitornog efekta antagonista

Za *in vivo* test inhibicije antagonista su birane zdrave biljke kupusa starosti 8 nedelja. Suspenzije spora ispitivanih patogena i antagonista, pripremane su prema protokolu navedenom u poglavlju 3.5. Koncentracija spora u suspenziji kretala se oko 10^6 konidija ml⁻¹. U prvom ogledu listovi kupusa su prvo tretirani metodom prskanja sa suspenzijama patogena, *A. brassicae* odnosno *A. brassicicola*. Inokulisane biljke su 72 h držane u kutijama u kojima je održavana visoka vlažnost, da bi potom bile prebačene u klima komore sa osvetljenjem 8 h/16 h i temperaturom 25 °C. Nakon 2 dana, na tretirane listove nanošena je suspenzija spora antagoniste, prve odnosno druge grupe izolata. U drugom ogledu, procedura je bila ista, ali su listovi kupusa prvo inokulisani suspenzijama spora antagonista, svakog od ispitivanih grupa, a nakon 72 h tretirani sa suspenzijom patogena *A. brassicae* odnosno *A. brassicicola*. Za svako testiranje korišćene su po tri biljke. Nakon 5 dana, procenat nekrotičnih lezija je ocenjivan prema protokolu korišćenom za test patogenosti u potpoglavlju 3.5.

3.10. Statistička obrada podataka

Za neometano sprovođenje parametarske analize nisu mogli biti zadovoljeni svi uslovi. Kada se analiziraju prirodne populacije jedinki, kao što je u ovim istraživanjima, veliki broj izolata *Alternaria* spp. i neujednačenost broja izolata između analiziranih grupa može predstavljati problem. Imajući u vidu da neujednačenost podataka može narušiti i onemogućiti ispravnu interpretaciju rezultata, ali i to da parametarski testovi pružaju veću informativnost i analizu više interakcija faktora, rezultati parametarskih modela analize proveravani su neparametarskim statističkim testovima kao što su Fridman-ov test i Kruskal – Wallis-ov model analize varijanse. Za analize je korišćen parametarski model analize varijanse (ANOVA) u statističkom softveru SPSS verzija 20,0 (SPSS inc., Čikago, Illinois). Izbor konkretnog ANOVA faktorskog modela za statističku analizu determinisan je postavljenim hipotezama i karakteristikama podataka za svaki specifični eksperiment. Podaci dobijeni ponavljanjem eksperimenta su objedinjeni posle testa za proveru homogenosti varijanse (Leven-ov test). Razlike u srednjim vrednostima tretmana su proveravane Tukey-evim testom, ukoliko u rezultatima nije navedeno drugačije. PCA analiza je korišćena u testu ispitivanja temperaturnog uticaja na rast i sporulaciju *Alternaria* izolata, a u cilju preciznije analize velikog seta podataka, kako bi se identifikovali najbitniji faktori.

4. REZULTATI

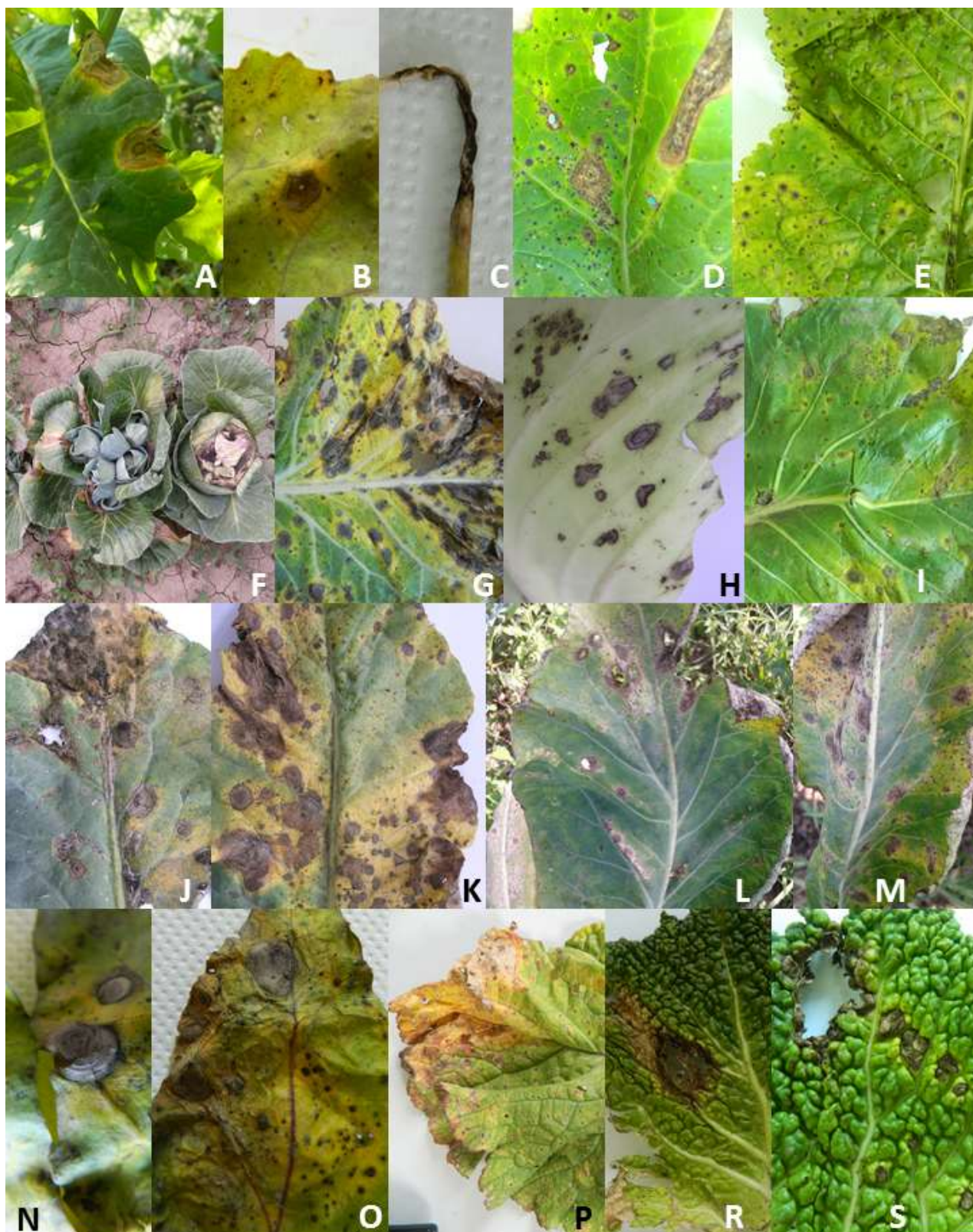
4.1 Simptomi lisne pegavosti na kupusnjačama u Srbiji

Tokom monitoringa zasada kupusnjača, u periodu od 2013. do 2016. godine, prisustvo simptoma lisne pegavosti potvrđeno je u svim glavnim regionima gajenja kupusnjača. Prvi simptomi lisne pegavosti uzrokovani patogenim vrstama roda *Alternaria* uočeni su na listićima klijanaca u rasadu. Simptomi na listićima su dijametra od nekoliko mm, tačkaste nekrotične lezije, svetlo braon do mrke boje. U polju, tokom faze intenzivnog rasta biljke, simptomi su uglavnom uočavani na donjem, starijem lišću u formi ovalnih nekrotičnih pega, prečnika od 1 do 45 mm, sive, braonkaste ili mrke boje uz prisustvo svetlo zelenog ili žutog oreola (Slika 1). Za vreme cvetanja i plodonošenja intenzitet infekcije je bio izraženiji, a simptomi su se mogli uočiti na svim delovima biljke, na lišću, stabljikama i ljuskama. Kako je bolest dalje napredovala, lezije su se širile i spajale u veće nekrotične površine nepravilnog oblika, uzrokujući potpuno propadanje hlorotičnog tkiva, prevremeno sušenje lišća i opadanje ljuski.

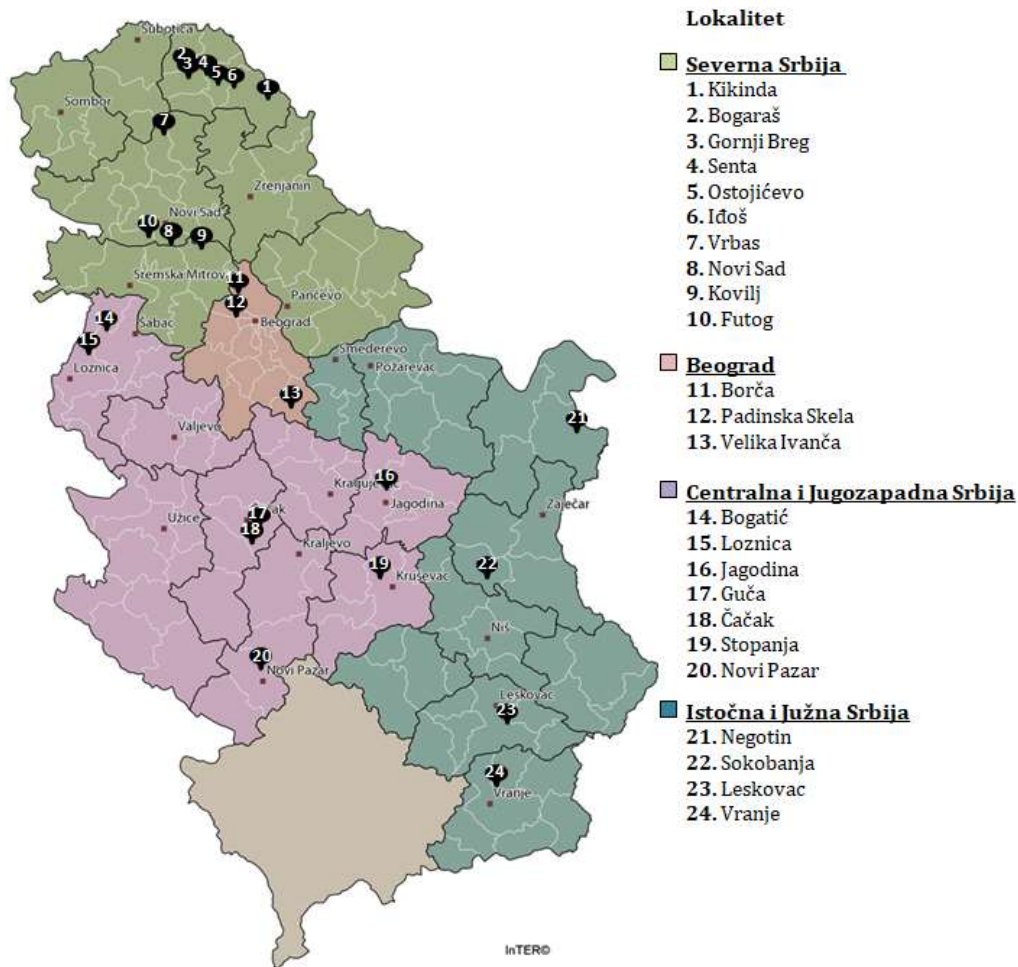
4.2. Uzorkovanje i izolacija patogena izazivača pegavosti lista kupusnjača

Prisustvo vrsta roda *Alternaria* potvrđeno je na 10 lokaliteta u Vojvodini, tri lokaliteta u beogradskoj regiji, 7 lokaliteta u centralnoj i zapadnoj Srbiji i na 4 lokaliteta u južnoj i istočnoj Srbiji (Slika 2). Sa biljaka koje su pokazivale tipične simptome lisne pegavosti prikupljeno je 527 uzoraka sa svih studiranih lokaliteta. Pored *Alternaria* vrsta koje su bile predominantno izolovani patogen (81%) potvrđeno je prisustvo i drugih patogenih gljiva kao što su *Leptosphaeria* spp. (9%) na uljanoj repici, *Septoria* sp. (4%), *Penicillium* spp. (4%) i *Sclerotinia* sp. na kupusu (2%).

Učestalost javljanja bolesti uzrokovane *Alternaria* patogenima bila je najveća u regionu južne Srbije za biljke rena (51%), kupusa (53%), brokolija (34%) i karfiola (28%), dok je za uljanu repicu (43%) i kelj (28%) to bio beogradski region. Dok je za kelerabu najveća učestalost javljanja bolesti zabeležena u regionu Vojvodine 26%, za uljanu repicu je najmanja učestalost u ovoj regiji, 17%. Najmanja učestalost javljanja bolesti kupusnjača detektovana je u zapadnoj Srbiji za kupus (22%), brokoli (15%), karfiol (14%) i kelj (21%). Za biljke kelerabe i rena, region sa najmanjom incidencom oboljenja bio je beogradski sa 18%, odnosno 30%.



Slika 1. Simptomi lisne pegavosti na uljanoj repici (A, B, C), renu (D, E), kupusu (F, G, H, I), brokoliju (J, K), karfiolu (L, M), kelerabi (N, O, P) i kelju (R, S)



Slika 2. Mapa lokaliteta sa detektovanim *Alternaria* spp. u Srbiji.

4.3. Morfološke karakteristike izolata *Alternaria* spp. na V8 hranljivoj podlozi i identifikacija

Na osnovu karakteristika kolonija i morfoloških osobina konidija i obrasca sporulacije na V8 hranljivoj podlozi, izdvojeno je 436 izolata *Alternaria* spp. podeljenih u 8 različitih grupa koje su prema Simmons (2007) identifikovane do nivoa vrste (Slika 3).

Prva grupa izolata, njih 141, formirali su beličastu do svetlobraon pamučastu miceliju, sa svetlom i kružnom ivičnom zonom (Slika 4.1). Stopa rasta micelije je umerena i iznosila je od 2,1 do 5,4 mm dan⁻¹ (3,8 ± 1,0). Konidiofori su septirani, varijabilnih dimenzija od 72,2 µm do 194,3 µm (129,3 ± 34,3). Konidije su uglavnom pojedinačne ili se nešto ređe mogu naći u kratkim negranatim nizovima od nekoliko spora (Slika 3.1.b). Dužina spora varira od 85,2 µm do 211,1 µm (148,4 ± 39,1) i 7,8 µm do 17,5 µm širine (11,9 ± 2,9). Vrat spora je dugačak, i može iznositi i polovinu ukupne dužine konidije (Slika 3.1.c). Dužina vrata konidija varirala je od 30,4 µm do 75,7 µm (51,4 ± 13,0) dok je širina iznosila od 10,8 µm do 18,5 µm (15,6 ± 6,8). Spore se odlikuju sa 5-15 transverzalnih septi i u retkim slučajevima mogu imati 1-2 longitudinalne septe. Pokazalo se da među ovim izolatima sa različitih domaćina nema statistički značajnih razlika u ispitivanim morfološkim karakteristikama. Izolati ove grupe na bazi dobijenih rezultata identifikovani su kao *A. brassicae* (Slika 3.1)

Druga grupa, sadržala je takođe 141 izolat, micelija je tamna, pamučasta, uniformnog izgleda, braon do crne boje sa kružnom, beličastom ili žućkastom ivičnom zonom (Slika 5.1).

Na površini micelije uočeni su koncentrični prstenovi formirani od brojnih konidiofora i mase spora. Stopa rasta micelije iznosila je od 4,3 do 7,0 mm dan⁻¹ (6,1 ± 1,9). Razlikovale su se dve vrste konidiofora, kratki i negranati, dužine od 26,2 µm do 86,1 µm i dugački, granati konidiofori dužine od 53,5 µm do 186,1 µm (112,8 ± 35,9). Konidije se formiraju u dugačkim lancima, često se može sresti da prvo formirane spore na početku lanca budu nešto većih dimenzija od ostalih konidija u lancu. U početku, na konidioforima se obrazuju lanci, od 10 do 20 konidija u nizu. Kako se odvija razvoj, mnogostruko granati konidiofori mogu imati i do 100 konidija (Slika 3.2.b). Spore su ovalnog oblika, dužine od 32,4 µm do 59,5 µm (44,8 ± 8,9) i širine od 6,3 µm do 13,9 µm (10,0 ± 2,3). Dužina vrata konidija je iznosila od 1,7 µm do 6,0 µm (2,6 ± 1,0), a širina od 2,1 µm do 6,3 µm (3,7 ± 1,1). Transverzalnih septi može biti od 1 do 6 sa vrlo retkim slučajevima kada se mogu uočiti 1-2 longitudinalne septe (Slika 3.2.c). Pokazalo se da među izolatima sa različitih domaćina nema statistički značajnih razlika u ispitivanim morfološkim karakteristikama. Prema svojim morfološkim karakteristikama izolati ove grupe odgovaraju karakteristikama vrste *A. brassicicola* (Slika 3.2).

Treća grupa od 12 izolata imala je pamučastu, tamno zelenu miceliju, sa beličastom ili braonkastom kružnom ivičnom linijom (Slika 6.1). Dnevni rast micelije je od 2,1 do 6,3 mm dan⁻¹ (4,1 ± 1,2). Konidiofori se u početku uzdižu pravo da bi kasnije formirali izgled nalik na mrežu. Na konidioforima se formiraju pojedinačne konidije ili nekoliko njih, koje često mogu biti priljubljene uz druge pojedinačne konidije čineći karakterističan "čvornovat" izgled obrasca sporulacije (Slika 3.3.b). Dužine konidiofora variraju od 43,2 µm do 139,2 µm (89,5 ± 24,5). Konidije su ovalnog oblika, često bez vrata, sa brojnim transverzalnim septama, dužine od 37,2 µm do 84,9 µm (61,8 ± 12,6) i širine od 15,4 µm do 29,1 µm (21,1 ± 2,9). Manji procenat spora ima uočljiv vrat dužine od 5,5 µm do 12,5 µm (8,1 ± 2,0) i širine od 2,7 µm do 6,3 µm (4,0 ± 1,1). Broj transverzalnih septi se kreće od 4 do 9, a u svakom ili u nekoliko transverzalnih segmenata, može se uočiti 1-2 longitudinalne septe (Slika 3.3.c). Među izolatima sa različitih domaćina nisu uočene statistički značajne razlike u ispitivanim morfološkim karakteristikama. Ova grupa izolata identifikovana je kao *A. japonica* (Slika 3.3).

Četvrta grupa od 114 izolata imala je pamučastu ili vazdušastu miceliju, različitih nijansi zelene, sive i braon boje, sa varijabilnim ivičnim zonama (Slika 7.1). Na površini se vrlo često mogu uočiti koncentrični krugovi kao posledica obimne sporulacije. Stopa rasta micelije iznosila je od 4,9 do 9,4 mm dan⁻¹ (7,2 ± 1,1). Konidiofori se prvobitno formiraju kao pojedinačni, sa nekoliko primarnih konidijalnih lanaca koji sadrže i do 20 konidija u nizu, i relativno su kratki, od 30,2 µm do 60,5 µm (59,0 ± 17,2). Kasnije se ovi primarni konidiofori granaju pri vrhu na veliki broj sekundarnih i tercijarnih konidiofora, koji se mogu formirati iz svake konidije na kojoj se diferencira konidiogeno mesto. Ovaj granajući klaster može imati i preko 100 konidija (Slika 3.4.b). Konidije koje se nalaze pri početku lanca najčešće su izduženo elipsoidnog oblika. Dužina konidija iznosi od 18,2 µm do 41,5 µm (32,2 ± 6,7) dok je širina od 6,3 µm do 14,7 µm (8,5 ± 2,6). Vrat konidija je dužine od 2,2 µm do 8,5 µm (4,6 ± 1,0) i širine od 1 µm do 5 µm (3,5 ± 1,5). Broj transverzalnih septi je od 1 do 7 najčešće 3, uglavnom sa 1-2 longitudinalne septe (Slika 3.4.c). Među izolatima sa različitih domaćina nisu uočene statistički značajne razlike u ispitivanim morfološkim karakteristikama. Na osnovu dobijenih rezultata ova grupa izolata je identifikovana kao *A. alternata* (Slika 3.4).

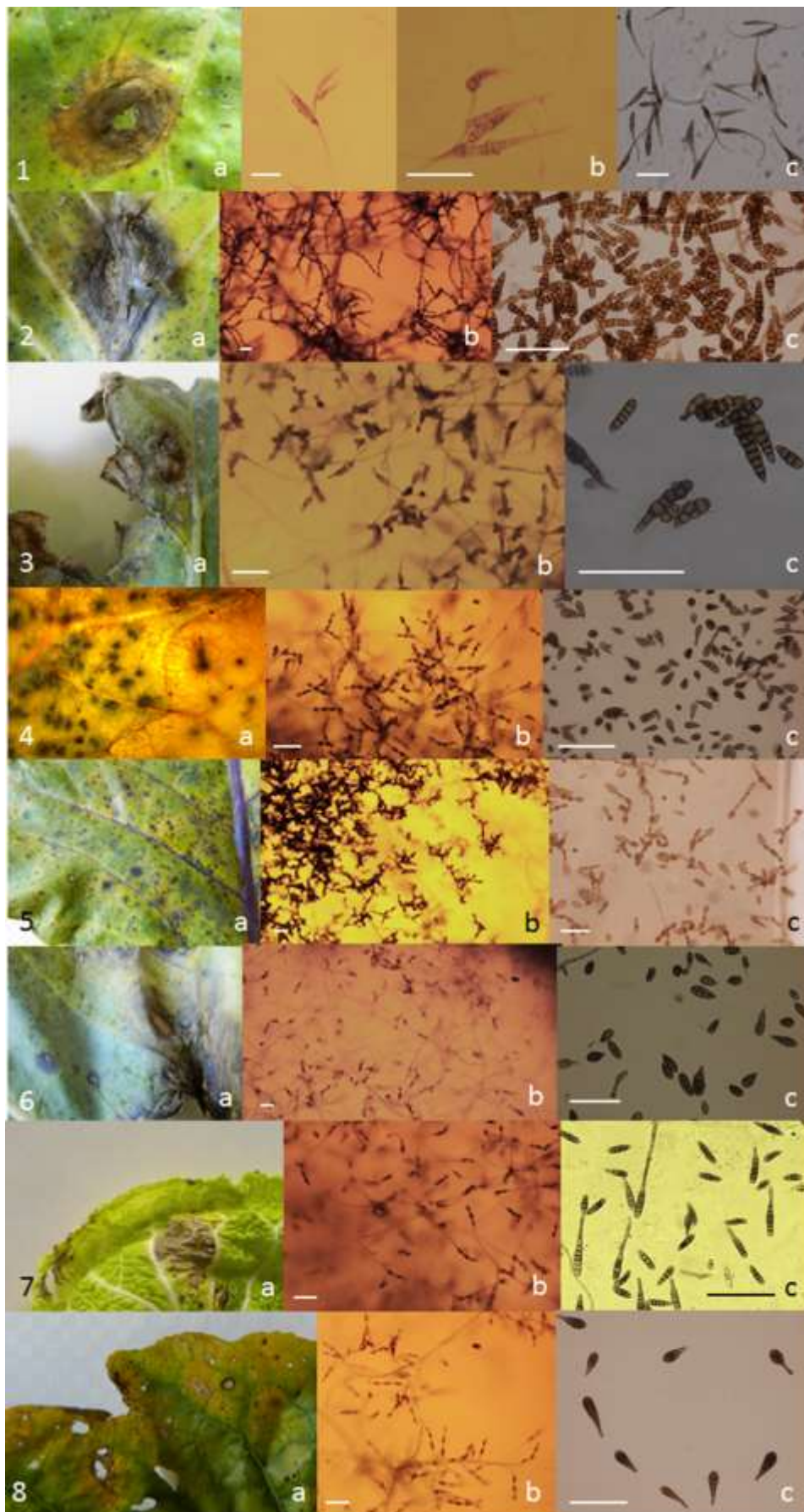
Peta grupa od 12 sitnospornih izolata imala je pamučastu miceliju, tamno zelene boje, beličastih i kružnih ivičnih zona (Slika 8.1). Stopa rasta micelije iznosila je od 4,5 do 9,0 mm dan⁻¹ (7,0 ± 1,5). Karakteristično za ovu grupu izolata su dugi konidiofori, koji se pri vrhu granaju na nekoliko grana. Svaki od ovih sekundarnih i tercijarnih konidiofora nosi granajuće lance konidija zbog čega celokupna struktura ima drvolik izgled. Glavni konidijalni lanci sadrže između 2-8 konidija i granaju se na lance koji imaju do 5 konidija u nizu (Slika 3.5.b). Dužine konidiofora su od 67,3 µm pa do 297,9 µm (180,3 ± 63,6). Oblik konidija je ovalan, dužine od 16,5 µm do 38,7 µm (29,0 ± 7,1) i širine od 6,1 µm do 15,5 µm (7,9 ± 2,0). Vrat konidija je dužine od 1,5 µm do 5,9 µm (4,1 ± 0,9) i širine od 1,2 µm do 4,3 µm (1,1 ± 0,8). Broj

transverzalnih septi je od 1-4, uglavnom bez longitudinalnih septi, a ukoliko ih ima broj nije veći od 3 (Slika 3.5.c). Među izolatima sa različitih domaćina nisu uočene statistički značajne razlike u ispitivanim morfološkim karakteristikama. Izolati ove grupe identifikovani su kao vrsta *A. arborescens* (Slika 3.5).

U šestu grupu svrstano je 8 izolata koji su formirali pamučastu, tamno zelenu miceliju beličastih kružnih ivičnih linija (Slika 9.1.a). Stopa rasta micelije iznosila je od 2,8 do 5,4 mm dan⁻¹ (3,6 ± 1,2). Primarni konidiofori su dužine do 200 µm, međutim ono što je karakteristično za ovu grupu, jesu dugački sekundarni konidiofori koji se mogu razviti iz bilo koje ćelije konidijalnog tela i mogu dostići i do 100 µm. Konidije mogu biti pojedinačne ili u nizovima do 6 konidija, mada se mogu uočiti i duži lanci do 20 konidija koje su povezane sekundarnim konidioforima (Slika 3.6.b). Dužine konidiofora su od 57,3 µm pa do 197,9 µm (184,0 ± 64,2). Dužina konidija iznosi od 4,5 µm do 86,1 µm (60,7 ± 9,7) i širine od 12,5 µm do 26,1 µm (16,5 ± 6,9). Vrat konidija je dužine od 2,5 µm do 7,6 µm (4,0 ± 0,9) i širine od 1,4 µm do 3,3 µm (1,5 ± 1,2). Broj transverzalnih septi je od 6-14, a broj longitudinalnih septi od 0-6 (Slika 3.6.c). Među izolatima sa različitih domaćina nisu uočene statistički značajne razlike u ispitivanim morfološkim karakteristikama. Sve proučavane karakteristike ove grupe izolata su u visokom stepenu podudarne sa karakteristikama vrste *A. cheiranthi* prema korišćenom ključu za identifikaciju (Slika 3.6).

Sedmu grupu činilo je 4 izolata koji su formirali sivkasto zelenu miceliju sa beličastom kružnom ivicom (Slika 9.1.b). Stopa rasta kolonija iznosila je od 4,5 do 6,8 mm dan⁻¹ (6,0 ± 2,1). Konidiofori su najčešće negranati, dužine od 60,7 µm do 179,8 µm (118,1 ± 31,9) i na vrhu uglavnom nose kratke lance do 6 konidija, dok nešto ređe se mogu uočiti pojedinačne konidije (Slika 3.7.b). Karakteristično za ovu grupu je to da najvećem broju slučajeva ne postoji apikalni vrat konidije koji je odvojen od konidijalnog tela, već vrat predstavlja cilindričan produžetak konidijalnog tela sa piramidalnom apikalnom ćelijom. Konidije dostižu dužinu od 51,2 µm do 96,9 µm (74,1 ± 13,5) i širinu od 13,2 µm do 19,5 µm (15,2 ± 4,9). Izduženje apikalne ćelije iznosi od 5,5 µm do 8,6 µm (7,3 ± 1,7). Konidije ove vrste sadrže od 5-8 transverzalnih septi i po 1-2 longitudinalne septe u jednom ili svim transferzalnim segmentima (Slika 3.7.c). Među izolatima sa različitih domaćina nisu uočene statistički značajne razlike u ispitivanim morfološkim karakteristikama. Identifikovani izolati pripadaju vrsti *A. nepalensis* (Slika 3.7).

Osmu grupu činilo je 4 izolata pamučaste micelije, svetlozelene do sivkaste boje, dok vazdušasti delovi micelije imaju sivkastu boju, ivična linija je kružna, pravilna i beličasta (Slika 9.1.c). Porast kolonija iznosio je od 2,3 do 5,5 mm dan⁻¹ (3,7 ± 1,9). Konidiofori mogu biti i pojedinačni i granati. Konidije se nalaze u kratkim nizovima do nekoliko konidija, najviše do 8 (Slika 3.8.b). Kao i kod predhodne grupe konidije nemaju zaseban segment kao vrat već je to produženje apikalne ćelije tela konidije sa konidiogenim mestom na vrhu odakle se nastavlja granjanje i formiranje konidijalnih lanaca. Baza konidija je široka i okrugla dok je vrh sužen i konusan. Dužina konidija iznosi od 25,3 µm do 91,3 µm (59,6 ± 28,3), a širina 7,1 µm do 14,9 µm (12,5 ± 4,2). Izduženje apikalne ćelije iznosi od 7,5 µm do 16,7 µm (12,3 ± 4,4). Uglavnom se može videti prisustvo od 3-14 transepti, i po 1 longisepta u 3 do 7 transverzalna segmenta (Slika 3.8.c). Među izolatima sa različitih domaćina nisu uočene statistički značajne razlike u ispitivanim morfološkim karakteristikama. Na osnovu morfoloških karakteristika ova grupa identifikovana je kao *A. malvae* (Slika 3.8).



Slika 3. Izgled (a) simptoma na listu, (b) obrazac sporulacije i (c) izgled konidija vrsta (1) *A. brassicae*, (2) *A. brassicicola*, (3) *A. japonica*, (4) *A. alternata*, (5) *A. arborescens*, (6) *A. cheiranthi*, (7) *A. nepalensis* i (8) *A. malvae* (bar –100 μm)

4.4. Ispitivanje fizioloških osobina izolata *Alternaria* spp.

4.4.1. Uticaj hranljivih podloga na rast, intenzitet sporulacije i dimenzije konidija

Zbog velike varijabilnosti do sada publikovanih taksonomskih studija zasnovanih na morfologiji *Alternaria* vrsta, ispitan je uticaj najčešće korišćenih hranljivih podloga za gajenje *Alternaria* spp. na morfološke karakteristike izolata. Odgajivačke osobine *Alternaria* izolata poreklom sa kupusnjača analizirane su posle 7 dana rasta na V8, MA, PDA i CZ podlogama.

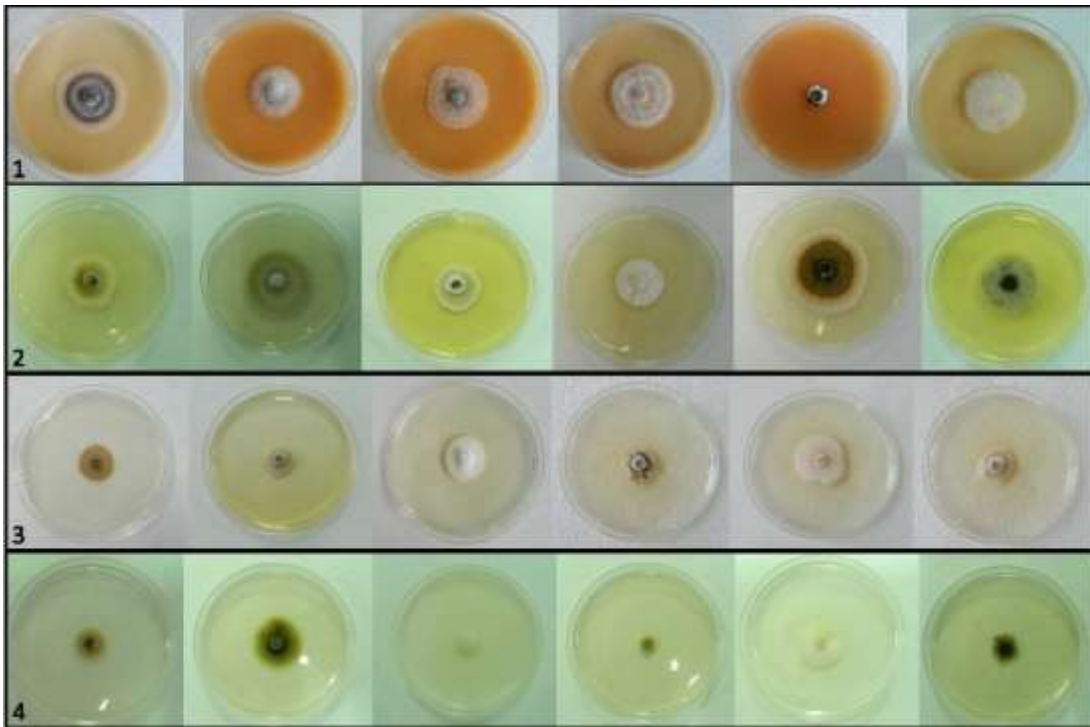
Izgled kolonija

Uticaj hranjive podloge na izgled kolonija vrsta roda *Alternaria* izolovanih sa kupusnjača pokazao se najmanji na V8 (detaljno opisan u poglavlju 4.3) i CZ podlozi (Slike 4, 5, 6, 7, 8, 9). Na MA podlozi kolonije su varijabilnijih boja nego što je to slučaj na V8 i CZ, pamučaste teksture, nešto širih i uočljivijih pravilnih svetlih ivica. Micelija ispitivanih izolata na PDA uglavnom je bujna i pamučasta po teksturi, varijabilnih boja, ivične linije i oblika. Na CZ podlozi micelija je slaba, delimično supstratnog rasta, braon, zelene i sive boje za sve vrste. Kolonije *A. brassicae* su se pokazale vrlo varijabilnih boja, bele, sive ili svetlobraon na V8, MA i PDA, dok na CZ preovladava slabo razvijena micelija braon-zelene ili bele boje (Slika 4). Skoro uniforman izgled, sa malim odstupanjima u nijansi micelije mrke boje, pokazali su izolati *A. brassicicola* na svim ispitivanim podlogama (Slika 5). Kolonije *A. japonica* su po izgledu slične kolonijama *A. brassicicola* na svim ispitivanim podlogama (Slika 6). Najvarijabilniji izgled kolonija na svim ispitivanim podlogama uočen je za vrstu *A. alternata* (Slika 7). Na V8, izdvojilo se nekoliko tipova kolonija, pamučaste ili vazdušaste micelije, bujne teksture različitih nijansi sive i zelene boje. Na CZ, kolonije *A. alternata* bile su svetlijih nijansi sive, zelene i braon, manje bujne nego na drugim podlogama. Broj sektora i zona koji se uočavaju na površini micelije *A. alternata* je najveći na PDA i MA. Boja micelije i izgled ivične linije je izrazito varijabilan na PDA, moglo se razlikovati oko 12 tipova kolonija *A. alternata*. Kolonije *A. arborescens* su na svim ispitivanim podlogama tamno zelenkaste boje i pamučaste teksture (Slika 8). Vrste *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae* se po izgledu kolonije ne mogu razlikovati od *A. alternata* (Slika 9). *A. cheiranthi* se odlikuje braon zelenom bojom micelije na V8 i PDA, dok je boja kolonije na MA i CZ, svetlo sivozelena sa beličastom širokom ivičnom linijom. *A. nepalensis* ima maslinasto zelenu do sivu miceliju na V8 i PDA, dok su na MA i CZ kolonije zelene boje. Vrsta *A. malvae* je na V8 produkovala sive do svetlo zelene kolonije, na MA i PDA svetlo maslinasto zelene, a na CZ bele pamučaste micelije sa submerznim delovima.

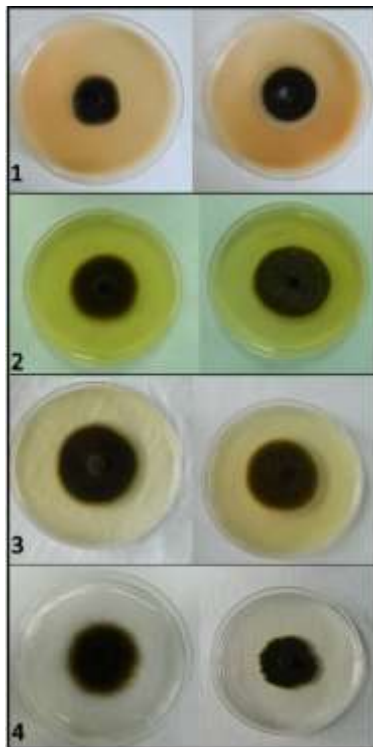
Stopa rasta kolonija

Hranljiva podloga V8 pokazala se najpogodnijom za rast kolonija većine ispitivanih vrsta *Alternaria*, zatim PDA, MA i CZ (Slika 10a) (Tabela 2). Na ispitivanim podlogama V8, MA, PDA i CZ, najbrži porast uočen je za vrste *A. alternata* (7,2 mm dan⁻¹, 7,1 mm dan⁻¹, 7,4, mm dan⁻¹ i 5,0 mm dan⁻¹), potom *A. arborescens* (7,0 mm dan⁻¹, 5,9 mm dan⁻¹, 7,0 mm dan⁻¹ i 4,5 mm dan⁻¹); nešto manji porast uočen je za *A. brassicicola* (6,1 mm dan⁻¹, 6,1 mm dan⁻¹, 6,0 mm dan⁻¹ i 3,4 mm dan⁻¹). Stopa rasta *A. japonica* bila je značajno veća na PDA (5,5 mm dan⁻¹) nego na V8 (4,1 mm dan⁻¹), ali i na CZ podlozi nije pokazala značajno smanjenje stope rasta kao druge vrste (4,0 mm dan⁻¹). Stopa rasta *A. japonica* na PDA statistički se nije značajno razlikovala u odnosu na *A. brassicicola* ($P = 0,263$), dok je na V8, MA i CZ rast kolonija bio sličan vrstama *A. brassicae*, *A. malvae* i *A. cheiranthi*. Rast *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae* ne pokazuje značajne razlike na MA ($P = 0,211$; $P = 0,36$; $P = 0,541$) i PDA podlozi ($P = 0,3$; $P = 0,114$; $P = 0,28$). Iako su kolonije izolata *A. nepalensis* imale najveću stopu rasta na V8 (6,0 mm dan⁻¹), drugi hranljivi medijumi pokazali su se značajno nepovoljniji za rast ove vrste.

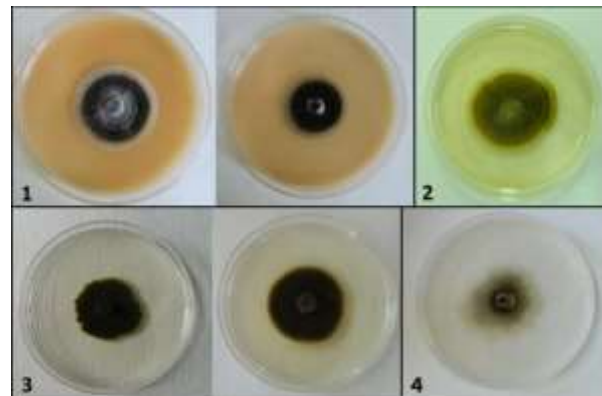
Rast kolonija na CZ bio je najslabiji za sve ispitivane vrste. Pokazano je da postoji statistički značajna interakcija između vrsta *Alternaria* i hranljive podloge sa efektom na stopu rasta kolonija ($F_{(20,686;6182,141)} = 101,855, P < 0,0005$).



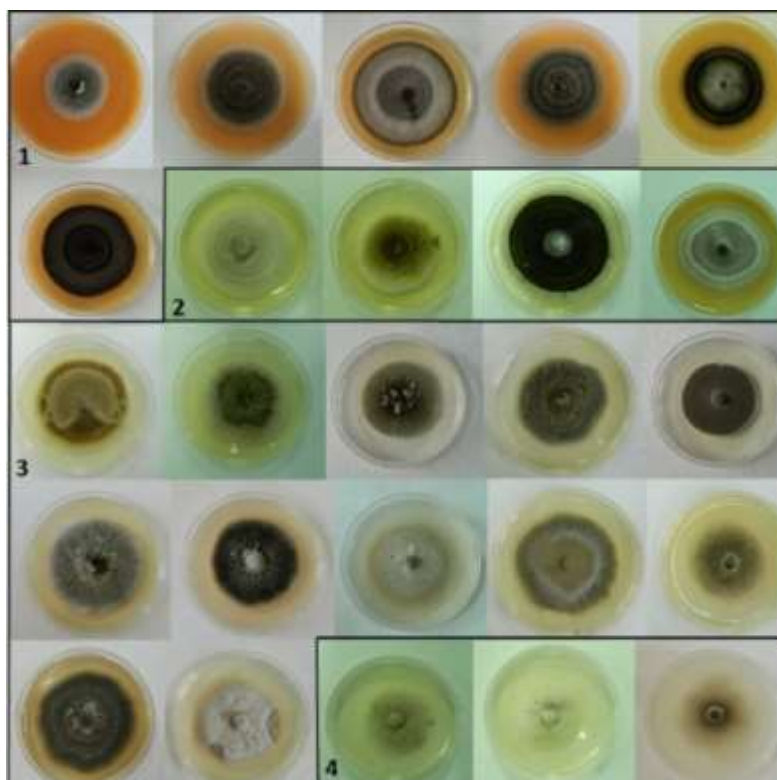
Slika 4. Različiti tipovi kolonija *Alternaria brassicae* na podlogama (1) V8, (2) MA, (3) PDA i (4) CZ.



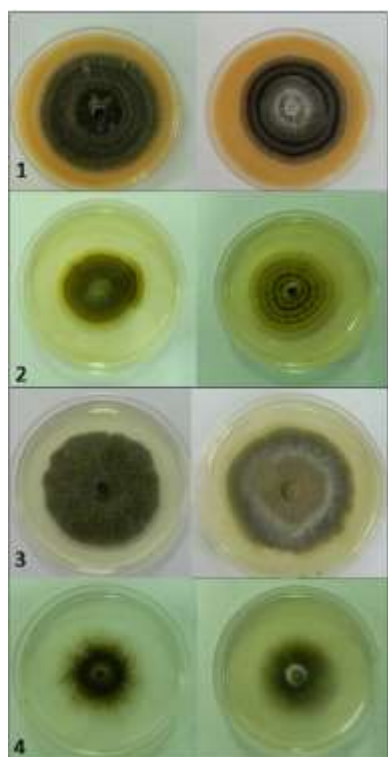
Slika 5. Različiti tipovi kolonija *Alternaria brassicicola* na podlogama (1) V8, (2) MA, (3) PDA i (4) CZ.



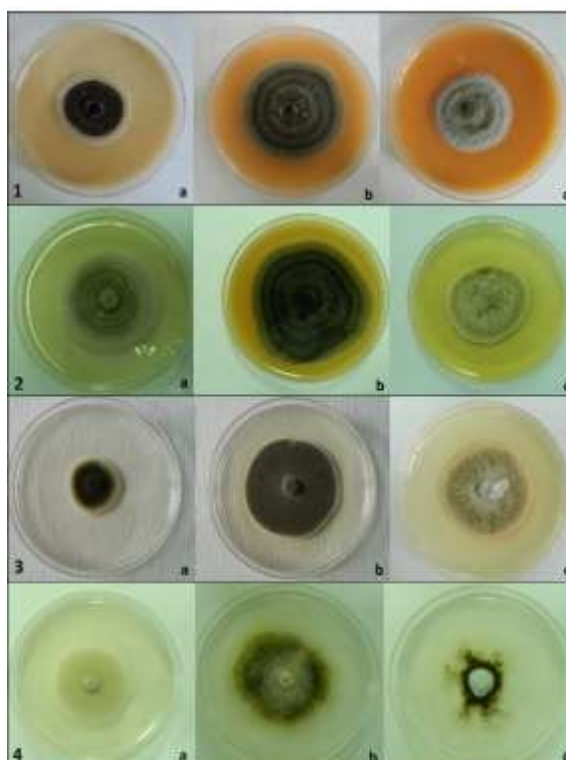
Slika 6. Različiti tipovi kolonija *Alternaria japonica* na podlogama (1) V8, (2) MA, (3) PDA i (4) CZ.



Slika 7. Različiti tipovi kolonija *Alternaria alternata* na podlogama (1) V8, (2) MA, (3) PDA i (4) CZ.



Slika 8. Različiti tipovi kolonija *Alternaria arborescens* na podlogama (1) V8, (2) MA, (3) PDA i (4) CZ.



Slika 9. Izgled kolonija (a) *Alternaria cheiranthi*, (b) *A. nepalensis* i (c) *A. malvae* na podlogama (1) V8, (2) MA, (3) PDA i (4) CZ.

Intenzitet sporulacije

Analiza je pokazala da je intenzitet sporulacije najveći na podlozi V8 za vrste *A. brassicae* ($1,9 \times 10^5$ konidija ml⁻¹), *A. brassicicola* ($32,0 \times 10^5$ konidija ml⁻¹), *A. japonica* ($19,8 \times 10^5$ konidija ml⁻¹) i *A. alternata* ($18,8 \times 10^5$ konidija ml⁻¹) (Slika 10b) (Tabela 2). Na CZ podlozi sporulacija je bila manje intenzivna za sve vrste, dok se MA podloga pokazala najnepovoljnija za sporulaciju svih ispitivanih vrsta roda *Alternaria*. Vrsta *A. brassicicola* imala je najintenzivniju sporulaciju, dok su *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi* i *A. nepalensis* pokazale nešto slabiji intenzitet sporulacije, dok je *A. brassicae* ispoljila najmanji intenzitet sporulacije. Uticaj različitih supstrata pokazao se značajan za intenzitet sporulacije ($F_{(19,187;6073,658)} = 30,709$; $P < 0,0005$). Za vrste *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae* nije bilo statističkih razlika u intenzitetu sporulacije na V8 i PDA ($P = 0,083$; $P = 0,352$; $P = 0,411$; $P = 0,107$).

Karakteristike konidija

Ispitivanje uticaja hranljivih podloga na morfološke karakteristike konidija proučavano je ispitivanjem dužine konidija i dužine vrata konidija *Alternaria* spp.

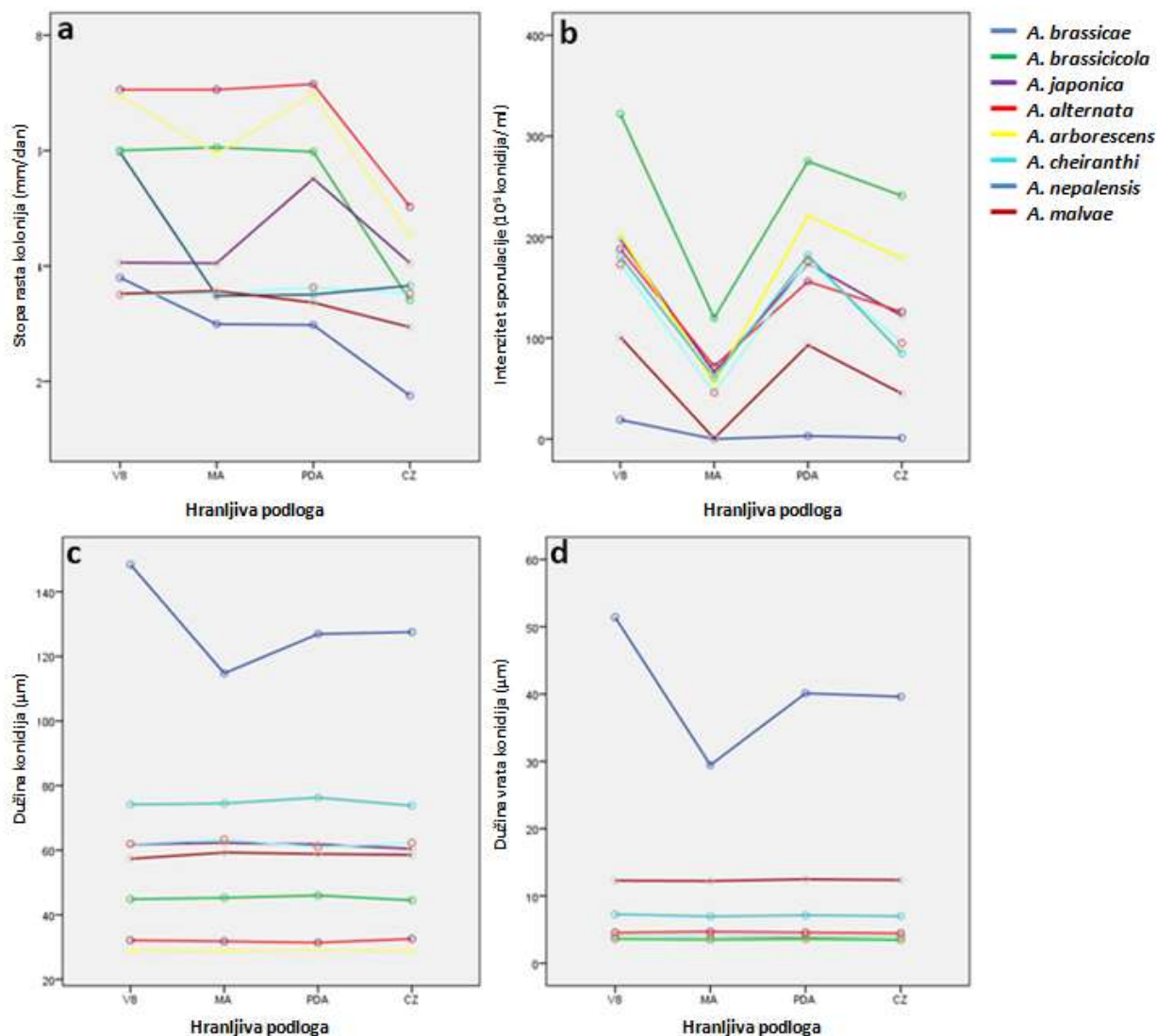
Najkrupnije konidije na korišćenim podlogama izmerene su za vrstu *A. brassicae*, i to na V8 podlozi gde su bile 148,4 μm , na PDA i CZ su iznosile 126,9 μm odnosno 127,5 μm dok su na MA dužine konidija bile najmanje, 114,8 μm (Slika 10c) (Tabela 2). Najmanja dužina konidija izmerena je za vrste *A. alternata* i *A. arborescens* i iznosila je od 31,4 μm (na PDA) do 32,5 μm (na CZ) odnosno od 28,8 μm (na MA i CZ) do 29,0 μm (na V8 i PDA). Izmerene dužine konidija za *A. brassicicola* iznosile su od 44,5 μm (na CZ) do 46,0 μm (na PDA). Dužine konidija *A. japonica*, *A. cheiranthi* i *A. malvae* su bile sličnih dimenzija, od 60,4-63,3 μm i 60,7-63,3 μm odnosno 57,3-59,3 μm . Za vrstu *A. nepalensis* dimenzije konidija bile su nešto veće i iznosile su od 73,8-76,3 μm . Statistička analiza pokazala je da ne postoje statističke razlike u dužini konidija za *A. alternata* i *A. arborescens* ($P = 0,418$; $P = 0,042$; $P = 0,440$; $P = 0,029$). Dužine konidija *A. japonica*, *A. cheiranthi* i *A. malvae* nisu pokazale značajna odstupanja na V8 ($P = 0,965$; $P = 0,124$; $P = 0,180$), MA ($P = 0,976$; $P = 0,091$; $P = 0,037$), PDA ($P = 0,997$; $P = 0,265$; $P = 0,797$) i CZ ($P = 0,842$; $P = 0,154$; $P = 0,264$). *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae* nisu značajno varirale u zavisnosti od hranljivog medijuma na kojem su gajene ($P = 0,162$; $P = 0,287$; $P = 0,188$; $P = 0,955$; $P = 0,122$; $P = 0,263$; $P = 0,786$). Za ispitivane izolate uočena je statistička razlika u dužini konidija na ispitivanim podlogama ($F_{(19,565;5844,597)} = 34,735$, $P < 0,0005$).

Analiza je pokazala da su dužine vrata konidija sitnospornih vrsta kao što su *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae* sličnih vrednosti i iznosile su od 3,5 μm do 4,7 μm (Slika 10d) (Tabela 2). Dok su za vrstu *A. nepalensis* na različitim podlogama iznosile je od 7,0 μm do 7,3 μm . Dužina vrata konidija za *A. malvae* je bila od 12,2 μm do 12,5 μm . Kao i u ispitivanju uticaja hranljivih podloga na dužinu konidija, dužina vrata konidija pokazala je značajno odstupanje samo za *A. brassicae* na V8 (51,4 μm) i MA (29,5 μm) ($P = 0,023$). Na PDA i CZ podlogama, dužina vrata spora *A. brassicae* nije varirala značajno (40,1 μm i 39,6 μm) ($P = 0,361$). Uticaj različitih supstrata na dužinu vrata konidija pokazao se značajan za ispitivane vrste *Alternaria* spp. ($F_{(20,353;6082,523)} = 142,651$; $P < 0,0005$).

Statistička analiza uticaja hranljivih podloga na ispitivane osobine Alternaria spp.

Dvostruka analiza varijanse sa ponovljenim merenjem (sa jednim među-faktorom i jednim unutrašnjim faktorom) pokazala je da postoji statistički značajan uticaj hranljivih podloga na ispitivane osobine različitih vrsta *Alternaria*. U analizi nije bilo vrednosti koje su značajno odstupale (autlajeri). Podaci su imali normalnu distribuciju kako je pokazano Šapiro Vilc-ovim testom ($P > 0,05$). U slučajevima kada Mauchly-ev test, za proveru ispunjenosti

uslova sferičnosti, nije bio zadovoljen pristupilo se postupku korigovanja stepena putem Greenhouse-Geisser-ove vrednosti. Jednostrukom analizom varijanse ispitivani su prosti efekti ispitivanih faktora (vrsta i hranljive podloge) kako bi se utvrdilo među kojim nivoima ispitivanih faktora postoji statistički značajna razlika i prilikom ove analize korišćeni su svi izolati. Unutar specifičnih vrsta nisu zabeleženi izolati sa značajnim odstupanjem od karakteristika date grupe kako na V8 tako i na MA, PDA i CZ.



Slika 10. Grafički prikaz uticaja hranljivih podloga na (a) stopu rasta kolonija, (b) intenzitet sporulacije, (c) dužinu konidija i (d) dužinu vrata konidija izolovanih *Alternaria* spp.

Tabela 2. Morfološke osobine ispitivanih *Alternaria* spp.

Ispitivane morfološke osobine izolata	Hranljiva podloga	Vrsta							
		<i>A. brassicae</i>	<i>A. brassicicola</i>	<i>A. japonica</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. arborescens</i>	<i>A. cheiranthi</i>	<i>A. nepalensis</i>	<i>A. malvae</i>
Stopa rasta micelije (mm dan ⁻¹) */**	V8	3.8 ± 1.1a	6.1 ± 1.2 bA	4.1 ± 1.2 aA	7.2 ± 1.1c A	7.0 ± 1.5cA	3.6 ± 1.2aA	6.0 ± 0.9b	3.7 ± 1.9aA
	MA	3.0 ± 0.6A	6.1 ± 1.2 aA	4.0 ± 1.2 A	7.1 ± 1.2 A	5.9 ± 1.2a	3.5 ± 1.4bA	3.5 ± 0.9bA	3.6 ± 0.9bA
	PDA	3.0 ± 0.6A	6.0 ± 1.2 A	5.5 ± 1.5	7.4 ± 1.1aA	7.0 ± 1.2aA	3.6 ± 1.4bA	3.5 ± 0.9bcA	3.4 ± 0.9cA
	CZ	1.8 ± 0.5	3.4 ± 0.9 a	4.0 ± 1.2A	5.0 ± 1.2	4.5 ± 0.8	3.5 ± 1.4abA	3.4 ± 0.8bA	2.9 ± 0.6
Intenzitet sporulacije (10 ⁴ konidijam ⁻¹)	V8	19 ± 4.11	322 ± 56.89	198 ± 38.91ab	188 ± 33.65a	202 ± 45.64abA	173 ± 37.8aA	181 ± 31.9aA	101 ± 41.7A
	MA	0,03 ± 0.01 c	120 ± 15.3	66 ± 8.05a	72 ± 6.17a	55 ± 13.9b	46 ± 11b	61 ± 27.9ab	0,6 ± 0.23c
	PDA	3,12 ± 0.72A	275 ± 35.1A	174 ± 19.6a	156 ± 15.44	221 ± 12,3A	176 ± 20.5aA	182 ± 9.67aA	93 ± 15.6A
	CZ	1,2 ± 0.3A	241 ± 46, 2A	122 ± 26.3a	126 ± 23,3a	179 ± 28.6	95 ± 20.3b	85 ± 16.8b	45 ± 18.5
Dužina konidija (µm)	V8	148.4 ± 39.1	44.8 ± 8.9	61.8 ± 12.6a	32.1 ± 6.7bA	29.0 ± 7.1b	60.7 ± 9.7a	74.1 ± 13.5	57.3 ± 20.1a
	MA	114.8 ± 14.4	45.2 ± 8.9	62.3 ± 12.6a	31.8 ± 6.6bA	28.8 ± 6.8 b	63.3 ± 10.3a	74.5 ± 13.3	59.3 ± 18.5a
	PDA	126.9 ± 24.5A	46.0 ± 8.5	61.8 ± 12.3a	31.4 ± 6.6cA	29.0 ± 7.2c	60.9 ± 9.5ab	76.3 ± 13.7	58.8 ± 19.5b
	CZ	127.5 ± 25.2A	44.5 ± 8.8	60.4 ± 12.5ab	32.5 ± 7.1	28.8 ± 6.7	62.3 ± 10.3a	73.8 ± 14.1	58.5 ± 20.1b
Dužina vrata konidija (µm)	V8	51.4 ± 13.0	3.6 ± 1.5a	4.1 ± 1.1a	4.6 ± 1.5a	4.1 ± 1.2a	4.0 ± 1.2a	7.3 ± 1.7	12.3 ± 4.4
	MA	29.5 ± 8.3	3.5 ± 1.4a	4.0 ± 1.2ab	4.7 ± 1.5b	4.1 ± 1.1ab	4.1 ± 1.1ab	7.0 ± 1.7	12.2 ± 4.3
	PDA	40.1 ± 11.2A	3.6 ± 1.5a	3.9 ± 1.1ab	4.6 ± 1.4b	4.0 ± 1.1ab	4.1 ± 1.1ab	7.1 ± 1.7	12.5 ± 4.3
	CZ	39.6 ± 11.7A	3.5 ± 1.4a	4.0 ± 1.1ab	4.5 ± 1.1b	4.0 ± 1.2ab	3.9 ± 1.1ab	7.0 ± 1.7	12.4 ± 4.2

*sve vrednosti u tabeli su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija ukoliko nije naznačeno drugačije.

**Vrednosti u okviru istog reda koje su označene istim malim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey-evom testu (p<0.001).

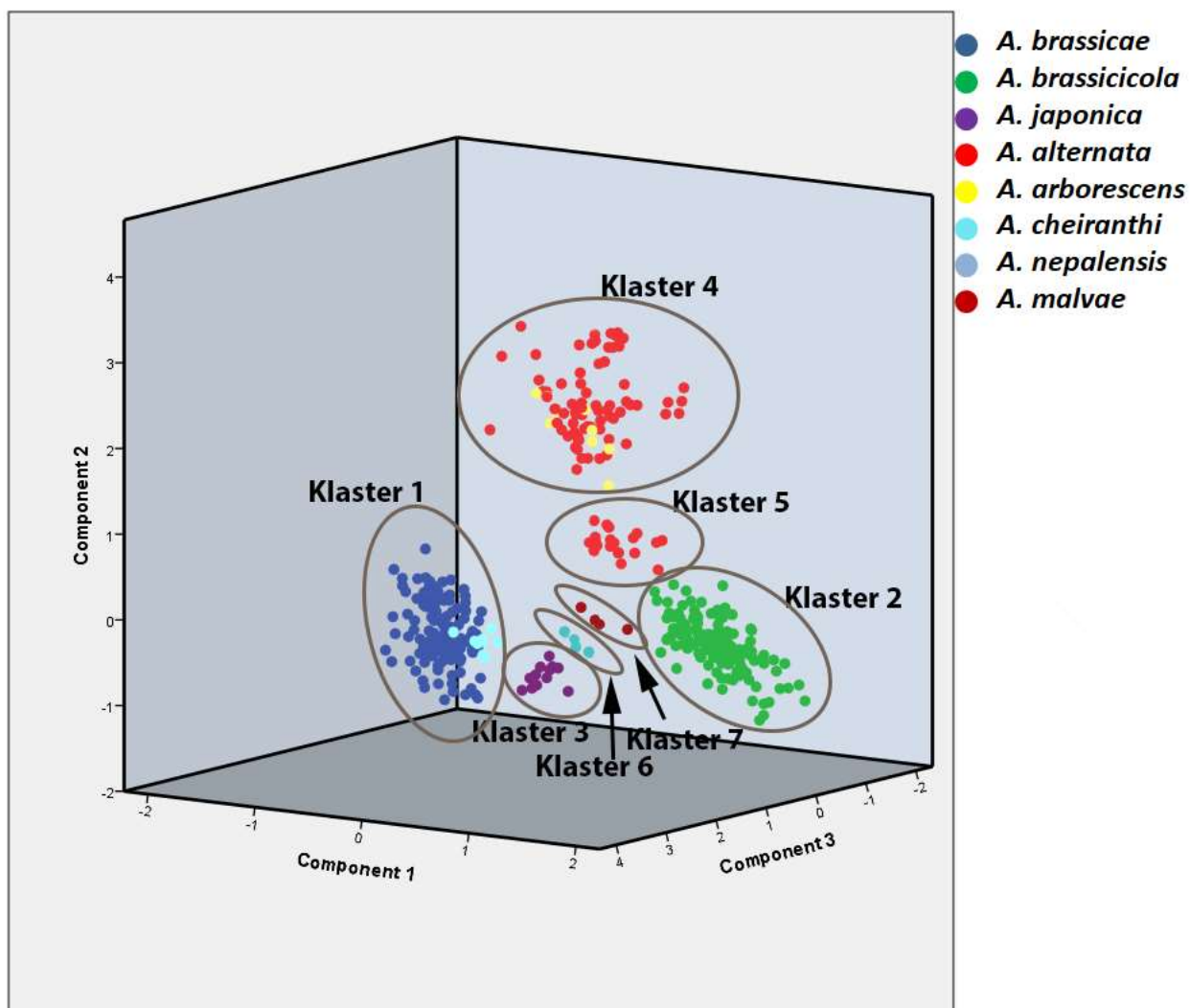
Vrednosti u okviru iste kolone koje su označene istim velikim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey-evom test (p<0.001).

4.4.2. Uticaj temperature na rast, intenzitet sporulacije i dimenzije konidija

Testiranje uticaja temperature na rast izolata *Alternaria* spp. izolovanih sa kupusnjača Srbije vršeno je na 9 različitih temperatura u rasponu od 0 do 40 °C (0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C). Na temperaturama 0°C i 40°C nijedna od ispitivanih vrsta nije pokazala rast. Temperature pri kojima su zabeleženi najveći rast i intenzitet sporulacije za sve vrste bile su u opsegu 20-30 °C, a najbrži rast izmeren je za izolate *A. alternata* i *A. arborescens* dok su ostale vrste imale umereniju stopu rasta. Najveći intenzitet sporulacije izmeren je za *A. brassicicola*, a najmanji za *A. brassicae*. Za sve vrste uočeno je da se dužina konidija i vrata konidija smanjuje sa rastom temperature, a najveće razlike na testiranim temperaturama uočene su za *A. brassicae*.

Zbog velikog obima podataka u ovom eksperimentu, u cilju identifikacije promenljivih koje su najbitnije odnosno koje najviše doprinose varijabilnosti, korišćena je analiza glavnih komponenti (PCA, *Principal Component Analyses*). Parametri korišćeni u analizi su stopa rasta kolonije, intenzitet sporulacije, dužina konidija i vrata konidija na svim testiranim temperaturama. Rezultat PCA analize prikazan je kao projekcija tri glavne komponente u prostoru na osnovu čega je izdvojeno 7 klastera. Prvi klaster, sačinjen je od izolata *A. brassicae* i *A. cheranthi*; drugi klaster čine izolati *A. brassicicola*; izolati *A. japonica* svrstani su u treći klaster; četvrti klaster čine izolati *A. alternata* i *A. arborescens*; dok peti klaster takođe čine izolati *A. alternata*; šesti klaster, *A. nepalensis*, pokazala se vrlo bliska sedmom klasteru izolata na grafiku, grupi *A. malvae* (Slika 11).

Pogodnost PCA metode proveravana je ispitivanjem koeficijenata korelacije koji su pokazali da sve varijable imaju barem jedan koeficijent korelacije veći od 0,3. Bartlett-ov test sferičnosti se pokazao statistički značajan za vrednost $P < 0,005$. Stepenn korelacije između varijabli i opravdanost faktorske analize potvrđena je i opštim KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) koeficijentom koji je iznosio 0,925, dok je za svaku varijablu posebno bio veći od 0,7. Za izbor broja faktora koji će biti uzeti u obzir korišćen je kriterijum latentnog korena (*latent root criterion*), prema kojem se u obzir uzimaju samo oni faktori koji imaju ajgen vrednost veću od 1. Analiza glavnih komponenti pokazala je postojanje tri komponente kojima je objašnjena varijansa od 73,523%, što je potvrđeno i *Scree* testom. Najveće faktorsko opterećenje je za komponentu jedan, dva i tri, sa 42,224%, 20,845% i 2,404% udela ukupnog varijabiliteta. Glavne varijable komponente jedan su dužina konidija na 5 °C, intenzitet sporulacije na 25 °C, 20 °C, 15 °C, 30 °C, dužina vrata konidija na 5 °C, intenzitet sporulacije na 10 °C i 5 °C. Glavne varijable komponente dva su stopa rasta kolonije na 10 °C, 30 °C, 5 °C, 25 °C, 20 °C, 35 °C i 15 °C. Glavne varijable komponente tri su dužina vrata konidija na 35 °C, 30 °C, 25 °C, 15 °C, 20 °C i 10 °C.



Slika 11. PCA analiza *Alternaria* spp. sa kupusnjača

Stopa rasta kolonija

Na temperaturi 5 °C, *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica* imale su najmanju stopu rasta (0,3 mm dan⁻¹; 0,4 mm dan⁻¹; i 0,45 mm dan⁻¹). Umerenu stopu rasta od 1 mm dan⁻¹ pokazale su kolonije *A. alternata* klaster 5, *A. cheiranthi*, i *A. malvae*, a nešto intenzivnija stopa rasta, 1,15 mm dan⁻¹, je zabeležena kod *A. nepalensis*. Najbrži rast pokazale su kolonije *A. alternata* klaster 4 i *A. arborescens*, 1,46 mm dan⁻¹ i 1,42 mm dan⁻¹ (Slika 12a).

Na 10 °C, sličan trend rasta je nastavljen, *A. brassicae* i *A. brassicicola* su najsporije rasle (1,5 mm dan⁻¹ i 1,6 mm dan⁻¹), *A. malvae* slično (1,9 mm dan⁻¹) dok su umeren rast pokazale kolonije *A. japonica*, *A. alternata* klaster 5, *A. cheiranthi* i *A. nepalensis* (2,5 mm dan⁻¹; 2,8 mm dan⁻¹; 2,5 mm dan⁻¹; 2,6 mm dan⁻¹). Rast *A. alternata* klaster 4 i *A. arborescens* bio je skoro dvostruko brži (3,9 mm dan⁻¹ i 4,9 mm dan⁻¹).

U opsegu 15-20 °C, najsporiji rast pokazale su *A. brassicae*, *A. japonica*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae* (3,6–4,4 mm dan⁻¹; 3,2–4,2 mm dan⁻¹; 3,3–3,8 mm dan⁻¹; 3,6–4,1 mm dan⁻¹; 3,2–3,7 mm dan⁻¹); dok je umerena stopa rasta zabeležena za *A. brassicicola* i *A. alternata* klaster 5 (4,7–5,5 mm dan⁻¹; 4,5–5,9 mm dan⁻¹); izolati *A. alternata* klaster 4 i *A. arborescens* su i na ovoj temperaturi pokazali najbrži rast (5,5–8,3 mm dan⁻¹ i 5,6–7,6 mm dan⁻¹).

Temperature 20-30 °C pokazale su se optimalnim za rast *Alternaria* spp. Tako, optimalna temperatura za rast *A. brassicae* je 20 °C (4,4 mm dan⁻¹) dok se rast na 15 °C i 25 °C

nije razlikovao. Izolati *A. brassicae* sa uljane repice imali su značajno veću stopu rasta kolonija od izolata sa drugih domaćina. Optimalne temperature za rast *A. brassicicola* zabeležene su na 20-25 °C (3,7-5,5 mm dan⁻¹). Izolati *A. brassicicola* sa rena pokazali su nešto nižu stopu rasta na 10 °C, a izolati sa kupusa na 15 °C. Kolonije *A. japonica* imale su maksimalan rast na 20-25 °C (4,2-4,4 mm dan⁻¹). Izolati ove vrste sa brokolija imali su značajno manju stopu rasta na 20-25 °C nego izolati sa ostalih domaćina. *A. alternata* je na svim temperaturama pokazala statističke razlike u rastu izolata klastera 4 i klastera 5. Najveći rast za *A. alternata* klaster 4 izmeren je u opsegu 20-30 °C (8,3 mm dan⁻¹; 9 mm dan⁻¹; i 7,9 mm dan⁻¹). Peti klaster, *A. alternata* izolati najbrži rast imali su na 25-30 °C (6,7-6,6 mm dan⁻¹). Izolati *A. alternata* klaster 5, izolovani sa rena pokazali su značajno brži rast od izolata sa uljane repice i kupusa. Stopa rasta *A. arborescens* sa različitih domaćina nije se značajno razlikovala. Za *A. cheiranthi* i *A. nepalensis* nije bilo razlike u rastu na 10 °C i 30 °C, dok je najbrži rast zabeležen na 25 °C (4,4 mm dan⁻¹ i 4,8 mm dan⁻¹). Stopa rasta *A. cheiranthi* sa različitih domaćina nije se značajno razlikovala, dok je optimalna temperatura za rast *A. malvae* bila 25 °C (4,3 mm dan⁻¹).

U opsegu 30-35 °C, kolonije *A. brassicae* nisu rasle. Neznatan rast na ovoj temperaturi zabeležen je za izolate *A. japonica* od 0,7 mm dan⁻¹ i samo 0,4 mm dan⁻¹ za izolate *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae*. Nešto brži rast od 1,2 mm dan⁻¹ izmeren je kod *A. brassicicola* i *A. alternata* klaster 5, dok je rast *A. alternata* klaster 4 i *A. arborescens* bio skoro dvostruko brži (2,6 mm dan⁻¹ i 2,8 mm dan⁻¹).

Statičke analize uticaja temperature na stopu rasta kolonija spovedene su dvofaktorijalnom ANOVA analizom mešovito dizajna sa reprezentativnim izolatima. Rezultati analize pokazali su da temperatura značajno utiče na stopu rasta kolonija *Alternaria* spp. ($F_{(38,192;310,307)} = 24,494, P < 0,005$).

Intenzitet sporulacije

Za sporulaciju *A. brassicae* optimalne temperature bile su u opsegu 15-20 °C (0,21-0,23 × 10⁶ konidija ml⁻¹), dok na 5 °C, 30° i 35 °C ova vrsta nije sporulisala. Pokazalo se da izolati *A. brassicae* sa uljane repice imaju značajno veći intenzitet sporulacije od izolata ove vrste sa drugih domaćina. Za sporulaciju *A. brassicicola* optimalne temperature bile su između 20-25 °C (2,8-2,9 × 10⁶ konidija ml⁻¹) dok se na 30 i 35 °C intenzitet sporulacije se naglo smanjuje (1,5 × 10⁶ konidija ml⁻¹ i 0,7 × 10⁶ konidija ml⁻¹). Izolati *A. brassicicola* sa rena i uljane repice imali su nešto smanjen intenzitet sporulacije u opsegu optimalnih temperatura u odnosu na *A. brassicicola* izolate sa drugih domaćina (Slika 12b).

Na 10 °C, zabeležen je umeren intenzitet sporulacije koji se kretao od 0,54 × 10⁶ konidija ml⁻¹ do 0,67 × 10⁶ konidija ml⁻¹ kod *A. japonica*, *A. alternata* klasteri 4 i 5, *A. arborescens*, *A. cheiranthi* i *A. malvae* sa nešto nižom vrednošću kod *A. nepalensis* od 0,44 × 10⁶ konidija ml⁻¹.

Na 15 °C, vrednost intenziteta sporulacije *A. arborescens* se statistički izdvojila od vrednosti za ostale vrste, dok su za *A. malvae* vrednosti sporulacije bile značajno manje u odnosu na *A. japonica*, *A. alternata* klaster 4 i 5, *A. cheiranthi* i *A. nepalensis*.

Temperature 20-25 °C bile su optimalne za sporulaciju *A. japonica* (1,7-1,8 × 10⁶ konidija ml⁻¹) *A. alternata* klaster 4 (1,5-1,6 × 10⁶ konidija ml⁻¹) i *A. malvae* (0,9-1,0 × 10⁶ konidija ml⁻¹). Populacija *A. japonica* sa uljane repice nije proizvela spore na 5 °C, na ostalim nižim temperaturama (10 °C, 15 °C i 20 °C) u poređenju sa populacijama sa drugih domaćina, imala je intenzivniju sporulaciju, dok je na višim temperaturama (30 °C i 35 °C) manje sporulisala od populacija izolovanih sa drugih domaćina. Izolati *A. alternata* klaster 4 pokazali su statistički vrlo slične vrednosti sporulacije za sve domaćine. Za *A. alternata* klaster 5, optimalne temperature za sporulaciju bile su 20, 25 i 30 °C (1,3 × 10⁶ konidija ml⁻¹; 1,4 × 10⁶ konidija ml⁻¹ i 1,3 × 10⁶ konidija ml⁻¹). Izolati *A. alternata* klaster 5 pokazali su značajne razlike u intenzitetu sporulacije među izolatima sa uljane repice, rena i kupusa. Za *A. arborescens* optimalne temperature bile su u opsegu 25-30 °C (2,1-2,3 × 10⁶) pri čemu nisu

primećene značajne razlike u sporulaciji populacija sa različitih domaćina. Najveći intenzitet sporulacije za *A. nepalensis* i *A. cheiranthi* izmeren je na 25 °C ($2,1 \times 10^6$ konidija ml⁻¹ i $1,8 \times 10^6$ konidija ml⁻¹). Populacije *A. cheiranthi* sa različitih domaćina pokazali su slične vrednosti sporulacije.

Rezultati analize pokazali su da temperatura značajno utiče na intenzitet sporulacije ispitivanih izolata *Alternaria* spp. ($F_{(31,882; 259,045)} = 12,138, P < 0,005$).

Karakteristike konidija

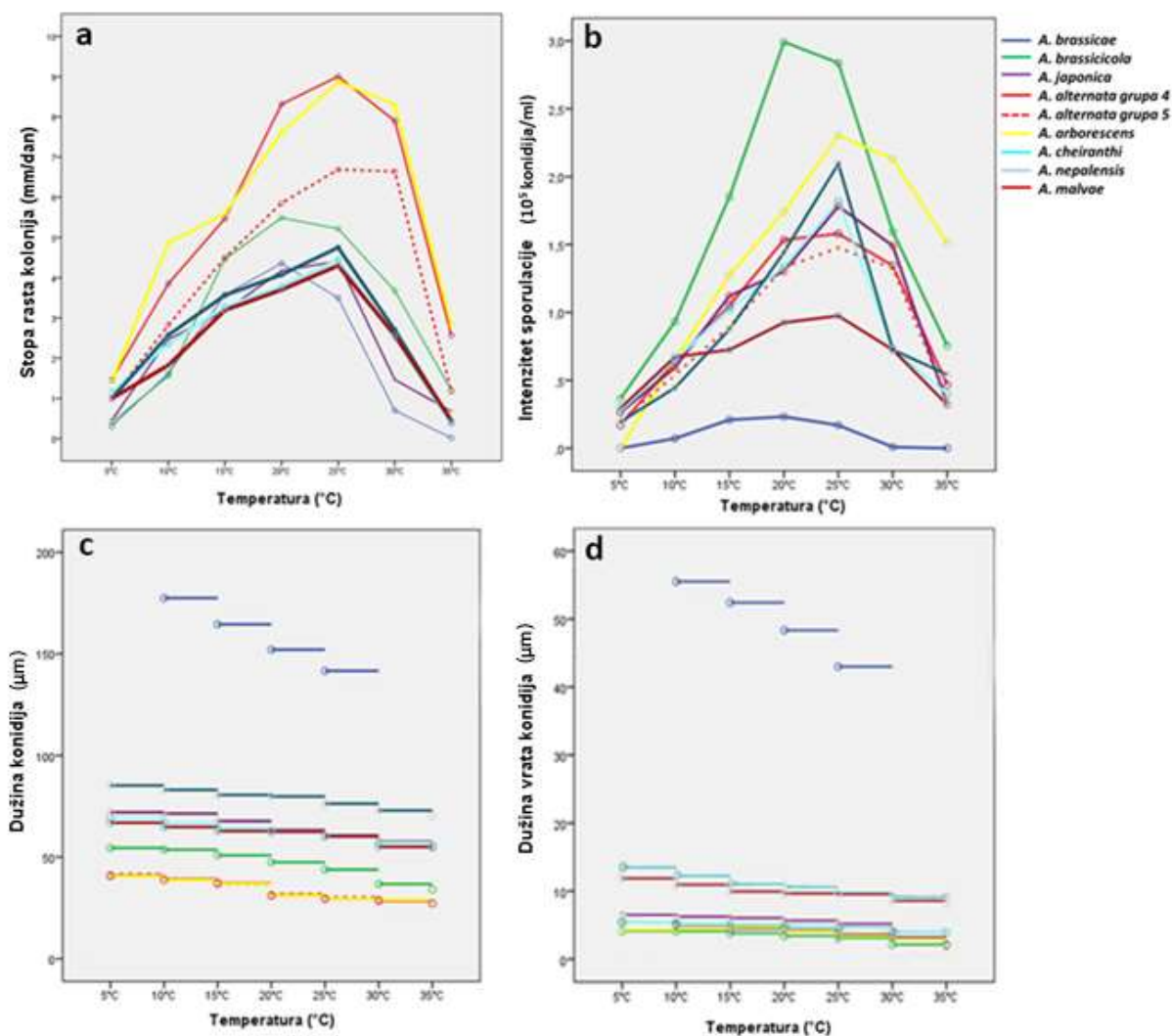
Uticaj temperature na morfološke osobine konidija *Alternaria* spp. praćen je posmatranjem dužine konidija i dužine vrata konidija.

Ispitivanjem uticaja temperature na dužinu konidija izmereno je da je dužina konidija veća na nižim temperaturama za sve testirane vrste (Slika 12c). Prema dužini konidija izdvojeno je pet grupa. Prvu grupu činili su izolati *A. alternata* i *A. arborescens*. Izmerena dužina konidija za *A. alternata* klastere 4 i 5, bila je najveća na 5 °C (41,6 µm i 41,7 µm), a najmanja na 35 °C (27,3 µm i 27,0 µm). Za izolate *A. arborescens* dužina konidija nije se razlikovala na 5 i 10 °C (41,0 i 39,1 µm) kao i u opsegu 20-30 °C (30,0-28,1 µm). Za izolate *A. brassicicola*, dužina konidija bila najveća u opsegu temperatura 5-15 °C (55,1-50,6 µm), a najmanja na 35 °C (36,4 µm). Najveća dužina konidija *A. japonica* izmerena je na 5 i 10 °C (70,4 i 68,5 µm), a najmanja na 35 °C (56,1 µm). Između dužine konidija izolata *A. cheiranthi* i *A. malvae* nisu zabeležene statističke razlike pa je na 5 °C dužina konidija iznosila 70,3 µm i 67,9 µm, a na 35 °C, 57,7 µm i 54,2 µm za *A. cheiranthi* i *A. malvae*. Za *A. malvae* dužina konidija nije se razlikovala na testiranim temperaturama od 10 do 20 °C kao i na 30 i 35 °C. Izolati *A. nepalensis*, dužina konidija nije se razlikovala na 5 i 10 °C (85,2 i 83,1 µm) i 20 i 25 °C (79,8 i 77,3 µm). Najmanja dužina konidija izmerena je na 35 °C i iznosila je 70,1 µm. Najveće razlike u dužini konidija na ispitivanim temperaturama uočene su *A. brassicae*. Najveća izmerena dužina konidija izmerena je na 10 °C (177,3 µm) i srazmerno se smanjivala sa porastom temperature, 15 °C (177,3 µm), 20 °C (160,3 µm) i 25 °C (120,3 µm).

Statistička analiza je pokazala da postoji značajan uticaj temperature na dužinu konidija ispitivanih vrsta *Alternaria* ($F_{(20,255; 164,572)} = 1211,322, P < 0,005$).

Za sve vrste, kao i za dužinu konidija, utvrđeno je da se dužina vrata konidija smanjuje sa povećanjem temperature (Slika 12d). Najveće razlike u dužini vrata konidija uočene su na temperaturama 5 °C i 35 °C, kako za *A. brassicicola* (5,0 µm i 3,4 µm) tako i za *A. japonica* (6,7 µm i 4,5 µm), *A. alternata* klaster 4 (5,4 µm i 4,0 µm), *A. alternata* klaster 5 (4,5 µm i 4,0 µm), *A. arborescens* (4,5 µm i 4,0 µm) i *A. cheiranthi* (4,7 µm i 4,0). Za vrste *A. nepalensis* i *A. malvae* dužina vrata konidija izmerena na 5 °C iznosila je 13,7 µm i 12,9 µm, dok je na 35 °C bila smanjena na 9,5 µm i 8,5 µm. Najveće razlike u dužini vrata konidija na ispitivanim temperaturama uočene su za *A. brassicae*. Najveća izmerena dužina vrata konidija izmerena je na 10 °C (57,6 µm) koja se potom srazmerno smanjivala na temperaturama 15 °C (53,7 µm), 20 °C (46,3 µm) i 25 °C (44,1 µm).

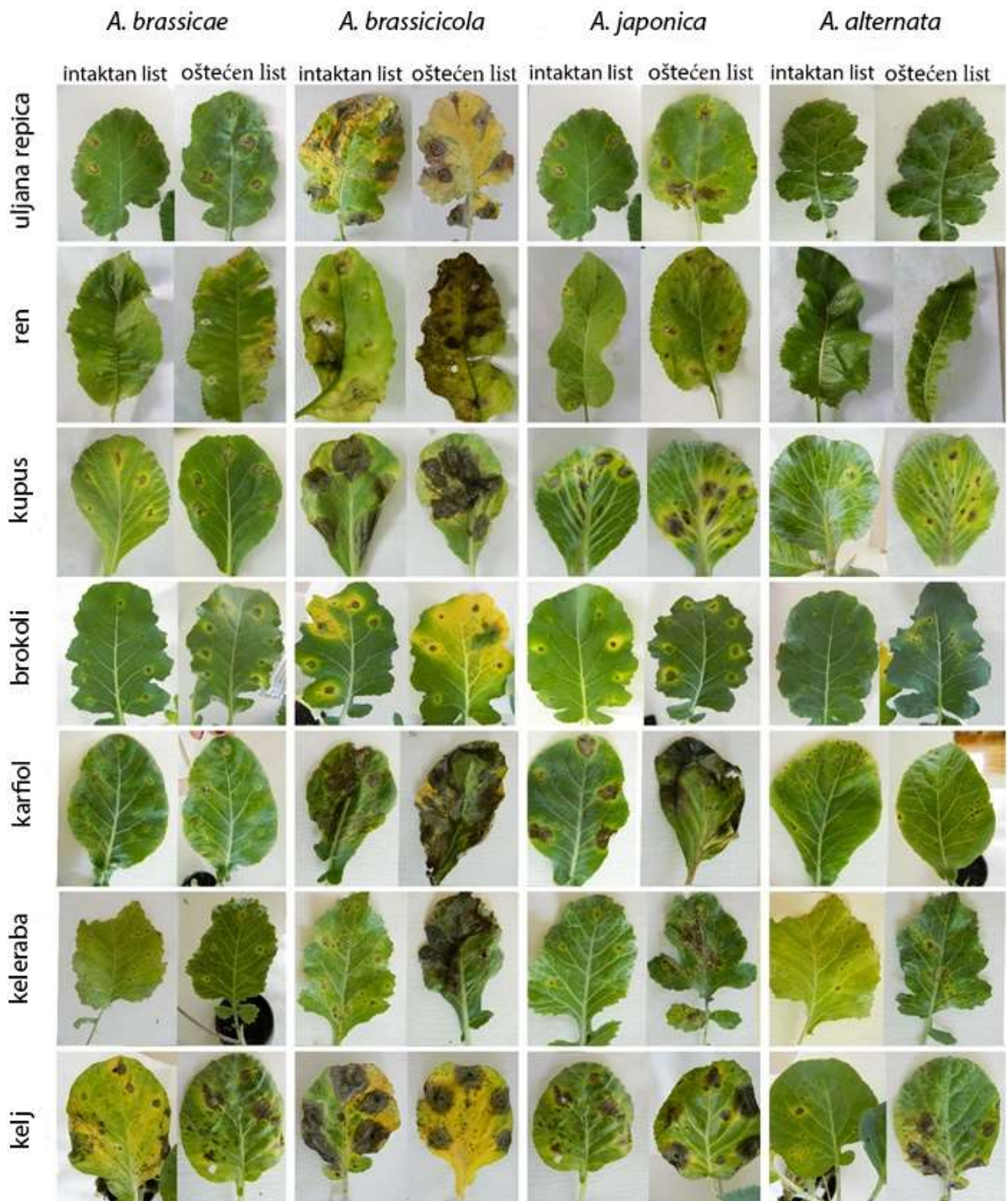
Utvrđeno je da postoji značajan statistički uticaj temperature na dužinu vrata konidija ispitivanih izolata ($F_{(21,818; 177,275)} = 4267,052, P < 0,005$).

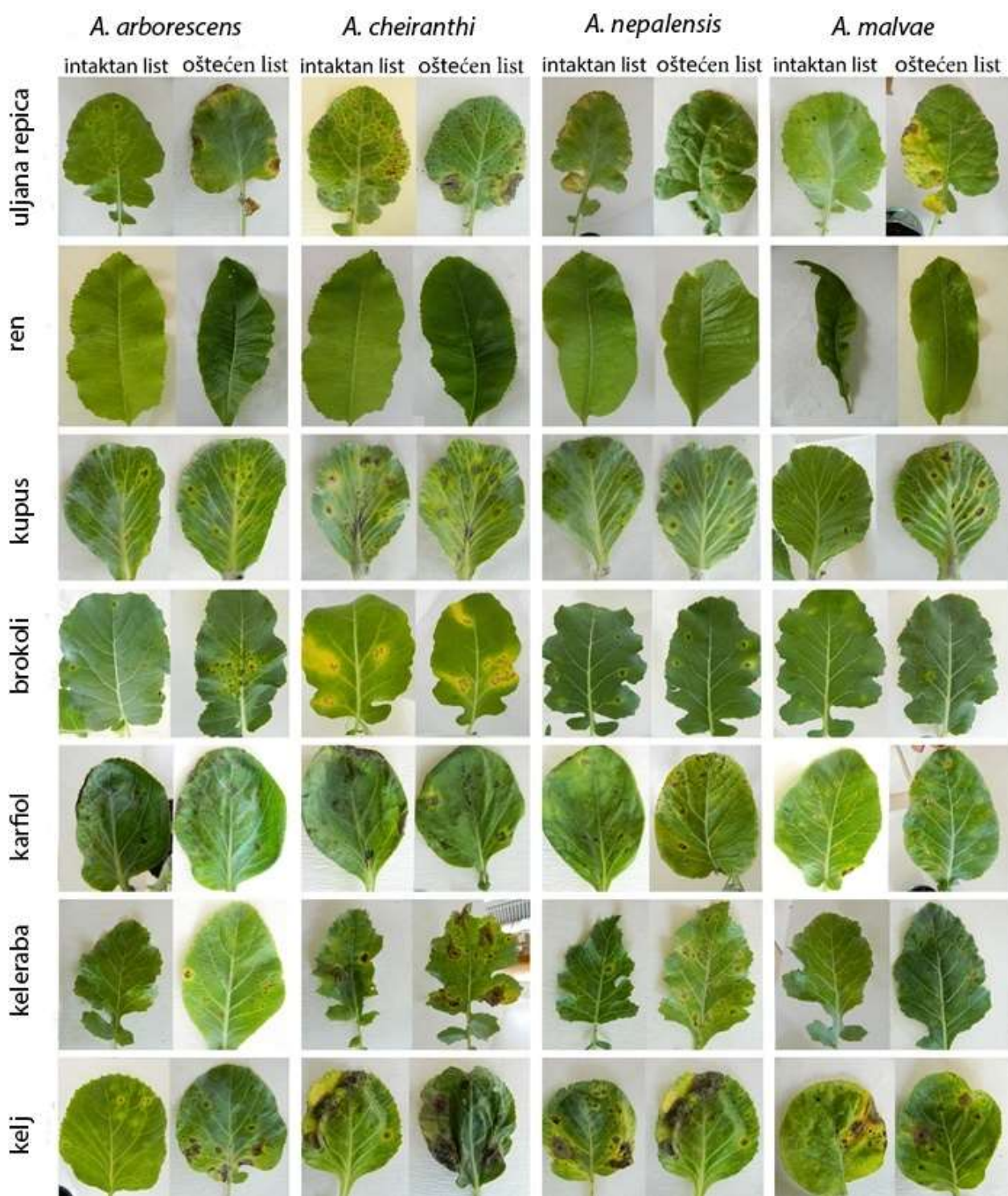


Slika 12. Grafički prikaz uticaja temperature na (a) stopu rasta kolonija, (b) intenzitet sporulacije, (c) dužinu konidija i (d) dužinu vrata konidija izolovanih *Alternaria* spp.

4.5. Patogenost ispitivanih *Alternaria* spp.

Nakon četiri dana od dana inokulacije, na svim ispitivanim domaćinima mogle su se uočiti braonkaste pege, karakteristične za lisnu pegavost koju prouzrokuju *Alternaria* spp. (Slika 13). Nakon 7 dana, pege su bile okrugle, dijametra od 2 do 35 mm, vrlo sličnog izgleda kao što je zabeleženo u zasadima kupusnjača. Određene razlike u boji pega primećene su između vrsta: tamnija boja pega primećena je za vrste *A. brassicicola* i *A. japonica* dok su pege kod ostalih vrsta bile nešto svetlije braon. Od ukupno 114 izolata *A. alternata*, 19 izolata (8 sa uljane repice, 7 sa kupusa, 3 sa karfiola i 1 sa brokolija) pokazalo se nepatogeno (nekrozom zahvaćeno >2% nekrotične površine lista) i oni su isključeni iz daljih statističkih analiza za ovaj test. Prema tome, Kohovi postulati za sve *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. alternata* klaster 4, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae* su zadovoljeni uspešnim reizolacijama sa inokulisanih listova i morfološkom proverom i potvrdom originalnosti kolonija. Nakon 14 dana, uočeno je uvećanje pega a zatim i njihovo međusobno spajanje na istom listu, što je vodilo potpunom uništenju fotosintetičke površine i defolijaciji biljke.





Slika 13. Rezultati testa patogenosti izolata *Alternaria* spp. iz Srbije na biljkama familije Brassicaceae

4.5.1. Patogenost *A. brassicicola*

Vrsta koja je pokazala najveću patogenost za inokulisane biljke bila je *A. brassicicola* (Slike 13,14; Tabela 3).

Na uljanoj repici, *A. brassicicola* izolati sa uljane repice, rena, kupusa, brokolija, karfiola, kelerabe i kelja nisu se značajno razlikovale u patogenosti na intaktnim listovima i na prethodno povređenom tkivu lista. Procenat nekrotične površine intaktnog lista se kretao od 39,6% kod izolata sa uljane repice do 45,2% kod izolata sa karfiola, dok je na povređenom listu bio od 58,3% kod izolata sa kelja do 67,3% kod izolata sa rena.

Inokulacijom na renu, pokazana je znatno manja sposobnost ove vrste za izazivanje infekcije. Razlike u patogenosti populacija *A. brassicicola* sa proučavanjih kupusnjača nisu uočene na renu, kako na intaktnom tako i na prethodno povređenom tkivu. Procenat nekrotične površine intaktnog lista se kretao od 6,5% kod izolata sa kupusa do 9,8% kod izolata sa rena, dok je na povređenom listu bio od 11,8% kod izolata sa kupusa do 13,9% kod izolata sa rena. Ispitivanja na kupusu sugerišu da su populacije ove vrste sa uljane repice i kupusa patogenije kako za intaktne (56,7% i 54,2%) tako i povređene listove kupusa (73,4% i 75,3%) od drugih populacija. Izolati ove vrste sa rena pokazali su najmanju patogenost na intaktnim i prethodno oštećenim listovima kupusa (37,4% i 48,4%).

Na intaktnim listovima brokolija, populacija *A. brassicicola* sa rena bila je manje patogena (39,1%) dok za druge populacije, nisu uočene značajne razlike (kretala se od 45,2% za izolat sa kelja, do 49,6% za izolat sa rena). Na prethodno povređenim listovima brokolija nije bilo značajne razlike (59,4% za izolat sa rena do 64,4% za izolat sa kelja).

Patogenost populacija *A. brassicicola* bila je bez značajnih razlika na intaktnim listovima karfiola, od 41,4% za izolate sa uljane repice do 49,7% za izolate sa rena. Na prethodno povređenim listovima karfiola takođe nisu uočene značajne razlike, najveću patogenost ispoljila je populacija sa rena, 62,8% dok je populacija patogena izolovana sa uljane repice i kelja bila manje patogena 60%.

Na kelerabi, najveću patogenost, kako na intaktnoj tako i na povređenoj lisnoj površini, pokazali su izolati *A. brassicicola* sa uljane repice i kupusa (50,8% i 60,6%, 51,7% i 62,3%,), zatim izolati sa brokolija, karfiola, kelerabe i kelja (42,5%, 42,9%, 46,6%, 43,2% za intaktne; i 55,8%, 56,2%, 56,3%, 56,3%, za prethodno povređene listove), dok su izolati sa rena bili su najmanje patogeni na intaktnim listovima (38,3%).

Na intaktnim kao i na povređenim listovima kelja patogenost različitih populacija *A. brassicicola* bila je bez značajnih razlika i kretala se u opsegu od 42,9% (ren) do 49,8% (kupus) kod intaktnih dok je kod povređenih biljaka bila od 61,7% (uljana repica) do 69,5% (kelj) (Tabela 3).

4.5.2. Patogenost *A. japonica*

Posle *A. brassicicola* najpatogenijom se pokazala vrsta *A. japonica* (Slike 13,14; Tabela 3). Iako je *A. japonica* izolovana samo sa uljane repice, brokolija, karfiola i kelja, pokazalo se da ovaj patogen izaziva simptome i na renu, kupusu i kelerabi. Ova vrsta je bila najpatogenija na listovima kupusa, kako intaktnim (26,9%, 27,0%, 23,9%, 22,5%) tako i prethodno oštećenim listovima (33,6%, 38,4%, 31,7%, 32,5%), za izolate sa uljane repice, brokolija, karfiola i kelja. Najmanja izmerena nekroza listova je bila na intaktnim i oštećenim listovima rena i kretala se od 3,0% (izolat sa kelja) do 7,7% (izolat sa karfiola).

4.5.3. Patogenost *A. brassicae*

Na intaktnoj površini lista uljane repice, najpatogenijim su se pokazale populacije *A. brassicae* sa uljane repice (15,6%) i rena (21,1%), dok se populacije ovog patogena sa kupusa, brokolija, karfiola, kelerabe i kelja nisu mnogo razlikovale (6,8-8,8%). Na povređenim listovima uljane repice najveću patogenost pokazale su ponovo populacije sa uljane repice i

rena (27,1% i 30,3%), dok se izolati ove vrste sa ostalih kupusnjača nisu međusobno značajno razlikovale (12,9% sa kupusa; 15,8% sa brokolija; 14,0% sa karfiola; 16,5% sa kelerabe i 16,2% sa kelja) (Slike 13, 14; Tabela 3).

Prilikom inokulacija izolata *A. brassicae* na ren nije bilo razlika u patogenosti izolata izolovanih sa testiranih kupusnjača. Procenat nekrotične površine intaktnog lista se kretao od 3,6% kod izolata sa rena do 4,4 % kod izolata sa karfiola, dok je na povređenom listu bio od 6,3% kod izolata sa brokolija do 12,2%, kod izolata sa kupusa.

Prilikom inokulacija *A. brassicae* na neoštećene listove kupusa nisu uočene značajne razlike u patogenosti izolata sa uljane repice, rena i kupusa (14,2%, 15,1% i 19,1%), ali su populacije sa brokolija, kelja, karfiola i kelerabe bile manje patogene za kupus (od 5,5% do 8,8%). Rezultati testa sa prethodnim povređivanjem tkiva lista su bili analogni, najpatogenija grupa izolata ponovo je bila sa uljane repice, rena i kupusa (27,1%, 24,0% i 27,2%), dok se patogenost ostalih populacija nije značajno razlikovala (14,0% sa brokolija; 9,2% sa karfiola; 13,9% sa kelerabe i 14,7% sa kelja).

Ispitivanja patogenosti na intaktnim i oštećenim listovima brokolija pokazala su da su najpatogeniji bili izolati *A. brassicae* sa rena (14,1% i 29,5%), dok se patogenost izolata sa ostalih proučavanih kupusnjača nije značajno razlikovala. Procenat nekrotične površine kod intaktnih listova se kretao od 6,4% (uljana repica) do 9,8% (karfiol), a kod povređenih od 12,7% (uljana repica) do 18,0% (karfiol). Prilikom inokulacija *A. brassicae* na intaktne i oštećene listove karfiola najpatogeniji su bili izolati sa rena (15,7% i 26,8%), dok je patogenost populacija izolata sa ostalih kupusnjača bila bez značajnih razlika, od 7,7% do 10,6% kod intaktnih biljaka, a 13,8% do 17,0% kod povređenih.

Izolati *A. brassicae* inokulisani na kelerabu potvrdili su prethodne rezultate. Najpatogeniji izolati bili su sa rena (15,5% i 26,5% za intaktne odnosno oštećene listove). Ostali izolati su bili bez značajnih razlika u patogenosti kako na intaktnom tako i povređenom tkivu lista (maksimalno 8,6%, izolat sa kelerabe kod zdravih listova i 16,1%, izolat sa karfiola kod povređenih).

Inokulacija na kelju dala je slične rezultate. Populacije *A. brassicae* sa rena bile su najpatogenije (14,2% i 25,3%, za intaktne odnosno oštećene listove), dok su izolati sa uljane repice, kupusa, brokolija, karfiola, kelerabe i kelja bili bez značajnih razlika u patogenosti metodom bez povrede (7,8%, 9,2%, 7,5%, 8,1%, 7,2%, 7,5%), ali i sa povredom lista (15,4%, 16,4%, 14,1%, 14,8%, 15,3%, 16,5%) (Tabela 3).

Test patogenosti je pokazao da ne postoje statističke razlike između patogenosti populacija *A. brassicae* i *A. japonica* izolovanih sa rena i kupusa za intaktne i oštećene listove ($P = 0,764$ i $P = 0,841$). Između populacija *A. brassicae* i *A. alternata* izolovanih sa uljane repice, nisu zabeležene statističke razlike u patogenosti kako na intaktnim tako i na oštećenim listovima brokolija ($P = 0,112$ i $P = 0,651$) i kelerabe ($P = 0,684$ i $P = 0,254$). Od vrsta izolovanih sa kelerabe, za *A. brassicae* i *A. cheiranthi* nije bilo statističkih razlika u patogenosti na inokulisanim biljkama.

4.5.4. Patogenost *A. alternata*

Izolati *A. alternata* sa uljane repice, rena, kupusa, brokolija, karfiola i kelerabe nisu pokazali značajne razlike u patogenosti na ispitivanim biljkama osim na biljkama rena gde nisu pokazali patogenost (Slike 13, 14; Tabela 3). *A. alternata* je najveću patogenost ispoljila na listovima kupusa. Procenat nekrotične površine intaktnog lista kupusa se kretao od 5,9% kod izolata sa rena do 8,3% kod izolata sa kupusa, dok je na povređenom listu bio od 12,6% kod izolata sa karfiola do 15,6%, kod izolata sa keleraba.

4.5.5. Patogenost *A. arborescens*

Patogenost *A. arborescens* sa kupusa, karfiola i kelja se nije međusobno razlikovala, dok za biljke rena nije zabeležena patogenost ovih izolata (Slike 13, 14; Tabela 3). Uočena

patogenost ovih izolata na intaktnim listovima iznosila je od 5,6% (na uljanoj repici) do 9,05% (na kupusu), a za prethodno povređene listove od 13,2% (na brokoliju) do 16,02% (na kelerabi).

4.5.6. Patogenost *A. cheiranthi*

Izolati *A. cheiranthi* nisu bili patogeni za biljke rena (Slika 13, 14; Tabela 3). Najpatogenije populacije *A. cheiranthi* su bile sa kupusa kako za intaktne tako i oštećene listove uljane repice, kupusa, brokolija, karfiola, kelerabe i kelja, gde se izdvaja uljana repica kao najosetljivija (intaktne biljke 11.7% a oštećene 22.7%), a karfiol kao najrezistentniji (intaktne biljke 9.9%, a oštećene 16.8%). Izolati *A. cheiranthi* sa kelerabe bili su manje patogeni za ostale domačine (od 7.6% do 8.6% za intaktne i od 14.2% do 17.8% za prethodno oštećene listove).

4.5.7. Patogenost *A. nepalensis*

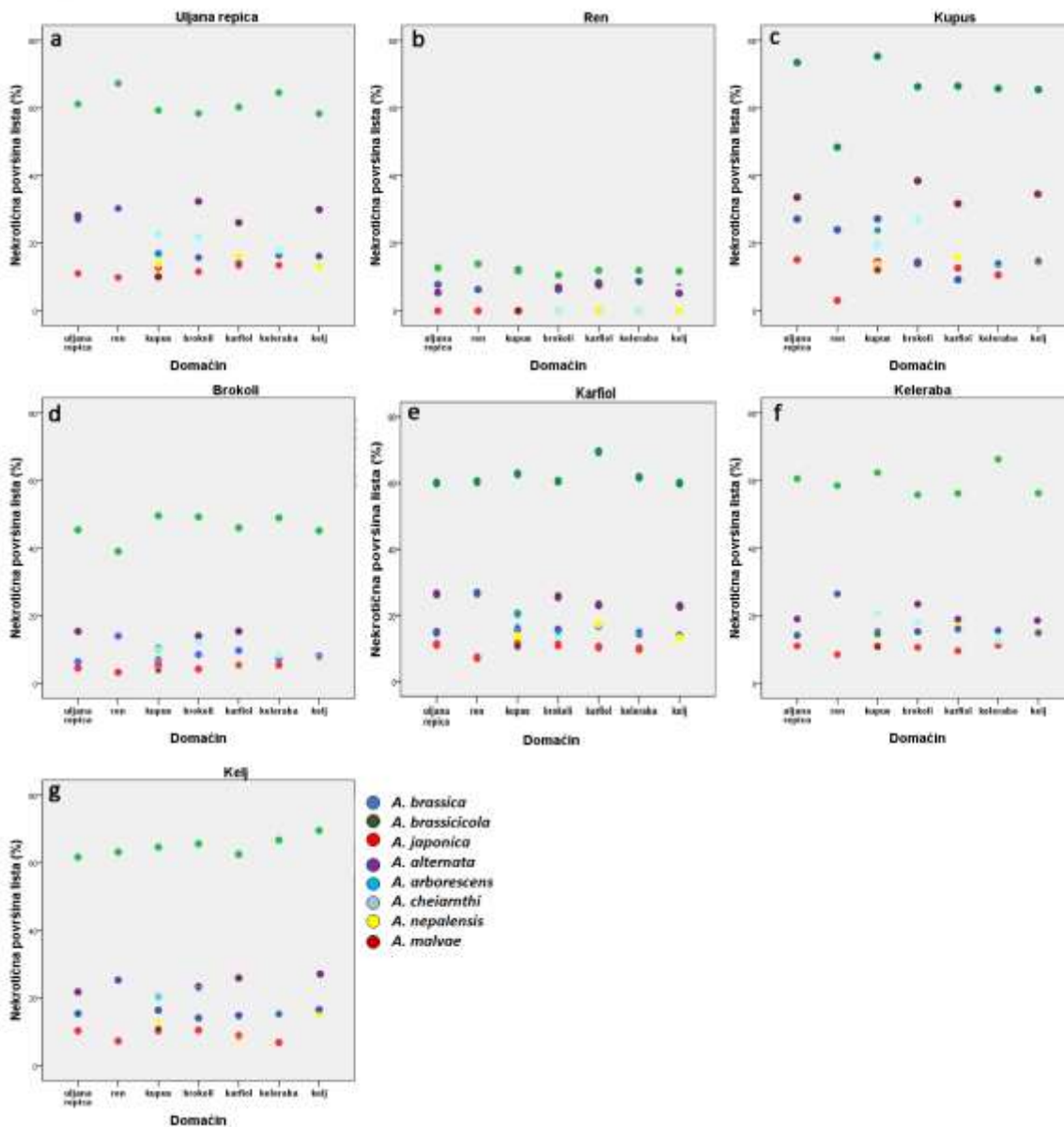
Iako je u Srbiji izolovana samo jedna populacija *A. nepalensis*, sa kupusa, patogenost je pokazana i na ostalim ispitivanim domačinima, osim na biljkama rena (Slika 13, 14; Tabela 3). Ispitivanja su pokazala da je ova vrsta bila najpatogenija upravo za listove kupusa (13,8% i 23,8%, za intaktne odnosno oštećene listove). Na ostalim inokulisanim biljkama, nije bilo značajnih razlika u patogenosti na intaktnim listovima (9,5% do 10,5%), kao ni na prethodno oštećenim (15,5% do 16,9%).

4.5.8. Patogenost *A. malvae*

A. malvae izolovana je samo sa kupusa i pokazalo se da je kao i vrsta *A. nepalensis* najpatogenija za intaktne i oštećene listove kupusa (7,8% odnosno 13,1%). Na listovima rena *A. malvae* nije pokazala patogenost (Slika 13, 14; Tabela 3). Nešto manja patogenost ove vrste uočena je na intaktnim i oštećenim listovima uljane repice (5,7% i 10,1%), brokolija (3,9% i 9,3%), karfiola (5,5% i 10,8%), kelerabe (4,1% i 10,9%) i kelja (5,1% i 10,8%).

4.5.9. Statistička analiza testa patogenosti

U analizi testa patogenosti korišćena je faktorijalna ANOVA (dva među i dva inter faktora) kako bi se razjasnio uticaj i interakcija više faktora na patogenost (površina nekrotičnog lisnog tkiva): vrste (*A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. alternata* klaster 4, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis*, *A. malvae*); domaćina sa kog populacije patogena potiču (uljana repica, ren, kupus, brokoli, karfiol, keleraba i kelj); inokulisane biljke domaćina; i inokulacione metode (intaktna i oštećena površina lista). Šapiro Vilko-v test pokazao je odstupanja od normalne distribucije podataka, zbog čega su korišćene odgovarajuće transformacije koje su normalizovale distribuciju. Usled toga što se broj izolata kao i broj vrsta *Alternaria* razlikovao među domačinima, homogenost varijanse za testirani uzorak nije mogla biti zadovoljena u svim slučajevima poređenja pa su neparametarski testovi (Kruskal-Walis-ov i Fridman-ov test) korišćeni uporedo sa parametarskim kako bi se proverila ispravnost dobijenih rezultata parametarskih analiza. Pošto se rezultati nisu značajno razlikovali između ove dve grupe testova, rezultati parametarskih ANOVA testova su zadržani. Statistički značajne interakcije faktora prikazane su u Tabeli 4.



Slika 14. Patogenost vrsta roda *Alternaria* izolovanih sa različitih domačina (x osa) na biljkama (a) uljane repice, (b) rena, (c) kupusa, (d) brokoli, (e) karfiola, (f) kelerabe i (g) kelja.

Tabela 4. Statistički parametri faktorijalne ANOVA analize patogenosti *Alternaria* spp.

Varijabla	Stepeni slobode		Količnik	Nivo značajnosti
	df	Error	F	Sig.
Inokulisana biljka*Inokulaciona metoda*Domaćin*Vrsta	78,7	1551,2	2,3	0,000
Inokulisana biljka*Domaćin*Vrsta	86,3	1700,2	8,6	0,000
Inokulaciona metoda*Domaćin*Vrsta	17	335	2,2	0,004
Inokulisana biljka*Inokulaciona metoda*Domaćin	27,8	1551,2	1,7	0,016
Inokulisana biljka*Inokulaciona metoda*Vrsta	32,4	1551,2	2,5	0,000
Inokulisana biljka*Domaćin	30,4	1700,8	8	0,000
Inokulisana biljka*Vrsta	35,5	1700,8	104,5	0,152
Inokulaciona metoda*Domaćin	6	335	1,6	0,000
Inokulaciona metoda*Vrsta	7	335	83,4	0,000
Domaćin*Vrsta	17	335	65,3	0,000
Inokulisana biljka	5,1	1700,8	217,6	0,000
Inokulaciona metoda	1	335	795,6	0,000
Domaćin	6	335	3,52	0,002
Vrsta	7	335	5503,9	0,000

4.6. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata *Alternaria* spp.

4.6.1. Molekularna identifikacija izolata

Primenom metode lančane reakcije polimeraze, koristeći parove specifičnih prajmera, uspešno su umnoženi *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* genski regioni, koji su dalje korišćeni za identifikaciju i molekularnu karakterizaciju izolata *Alternaria* spp. sa kupusnjača. Iako je za genske regione koji sporo evoluiraju, kao što je to *RPB2*, utvrđeno da mogu biti vrlo korisni, u ovom konkretnom slučaju za ispitivane *Alternaria* spp. ovaj genski region je isključen iz daljih molekularnih analiza zato što se informativnost ovog markera pokazala kao nedovoljna odnosno broj sekvenci ovog gena u *NCBI* bazi dao je nepotpune rezultate. Dužine sekvenci *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* regiona za sve vrste u ovoj studiji prikazane su u Tabeli 5. U Tabeli 6. prikazane su šifre referentnih izolata iz *NCBI* baze gena korišćenih u analizama molekularne karakterizacije. Pristupne šifre izolata *Alternaria* spp. sa kupusnjača u Srbiji koje su do sada objavljene u radovima iz ove disertacije i sačuvane u *NCBI* bazi gena date su u Tabeli 7 (Blagojević i sar., 2015; 2019; 2020). Poređenjem sekvenci *BLAST* pretragom GenBank baze, na osnovu ispitivanih sekvenci, izolati iz Srbije su se mogli grupisati u 8 grupa što je bilo u skladu sa rezultatima identifikacije na osnovu morfoloških karakteristika:

- prva grupa imala je 141 izolat i identifikovana je kao vrsta *A. brassicae*. Za svaki umnoženi genski region *A. brassicae* identifikovan je samo po jedan haplotip koji je pokazao 100% homologije sa *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* genskim regionima referentnog izolata EGS 38-032.
- za drugu grupu, koja je obuhvatala 141 izolat, ustanovljeno je da pripada vrsti *A. brassicicola*. Sekvence *ITS* regiona su pokazale 100% homologije sa sekvencama referentnog izolata EEB 2232. Poređenjem sekvenci *A. brassicicola* izolovanih iz Srbije sa ostalim *A. brassicicola* sekvencama iz *NCBI* baze gena, *GAPDH* genski regioni definisali su tri haplotipa. Sekvence prvog haplotipa *A. brassicicola* iz Srbije pokazale su 100% sličnosti sa *GAPDH* sekvencama referentnog izolata EEB 2232 i 100% sličnosti sa sekvencama *A. brassicicola* izolovanih sa kupusnjača u Južnoj Koreji (MG 250616) i Južnoj Africi (KT 895950). Drugi haplotip imao je 99,82% sličnosti sa *GAPDH* sekvencama izolata EEB 2232 i 100% homologije sa *GAPDH* sekvencama *A. brassicicola* izolovanih sa biljaka iz fam. Araliaceae u Južnoj Koreji (MG 250614) i sa kupusnjača u Kini (KY 990390). Za *GAPDH* sekvence trećeg haplotipa izolata *A. brassicicola* nije

ustanovljena 100% sličnost ni sa jednom sekvencom dostupnom u GenBank bazi podataka. Sličnost ovog haplotipa sa sekvencama prvog i drugog sekvenciranog haplotipa *GAPDH* gena *A. brassicicola* iznosila je 99,82% i 99,64%.

- treća grupa od 12 izolata identifikovana je kao vrsta *A. japonica*. Sekvence *ITS* pokazale su 100% homologije sa referentnim izolatima *A. japonica* CBS 118390 kao i sa *ITS* sekvencama *A. japonica* iz Južne Koreje (MG 250606), Japana (LC 440596), Irana (KY788039) i Kalifornije (KJ 126846). Ove sekvence su takođe pokazale 100% sličnosti sa *ITS* sekvencama *A. raphani* (ARU 05200) i *A. nepalensis* (NR 136046). Analizom nukleotidnih sekvenci utvrđena je i visoka sličnost od preko 99% sa sekvencama *A. japonica* iz Sjedinjenih Američkih Država, Kine, Katra i Irana dostupnih u GenBank bazi podataka. Sekvence *Alt a1* pokazale su 100% sličnosti sa referentnim izolatom *A. japonica* CBS 118390 i izolatom *A. japonica* iz Južne Koreje (MG250643). Region *GAPDH* se pokazao kao najvarijabilniji, izdvajajući dve haplotipske grupe sekvenci. Prva grupa pokazala je 100% homologije sa sekvencom referentnog izolata *A. japonica* CBS 118390. Druga haplotipska grupa pokazala je 100% sličnosti sa *A. japonica* iz Južne Koreje (MG250618) i Brazila (MK510950). Genski region ATP pokazali su 100% homologije sa referentnim izolatom *A. japonica* CBS 118390.
- četvrta grupa od 114 izolata identifikovana je kao vrsta *A. alternata*. Regioni *ITS* gena pokazali su 100% sličnosti sa referentnim izolatom *A. alternata* EGS 34-016. Sekvence *Alt a1* imale su 100% sličnosti sa preko 50 sekvenci izolata *A. alternata* sa različitim domaćina. Za sekvence *GAPDH* gena *A. alternata* uočeno je od 99-100% homologije sa *A. alternata*, *A. arborescens* i *A. tenuissima*. Genski region ATP pokazivao je 99-100% sličnosti sa sekvencama *A. alternata* i *A. tenuissima*.
- peta grupa od 12 izolata identifikovana je kao *A. arborescens*. Sekvence *ITS* regiona pokazivale su 100% sličnosti sa sekvencama vrsta *A. arborescens*, *A. alternata*, *A. destruens*, *A. tenuissima*, *A. alstroemeriae*, *A. gossypina* i *A. eichhorniae*. Region *Alt a1* gena *A. alternata* imao je 100% sličnosti sa *A. alternata* i *A. arborescens* izolatima. Sekvence *GAPDH* izolata iz Srbije pokazivale su 100% sličnosti sa sekvencama *A. alternata* i *A. arborescens*. Za sekvence *ATP* gena *A. alternata* iz Srbije uočena su dva haplotipa. Prva grupa sekvenci pokazala je 100% homologije sa referentom sekvencom *A. arborescens* EGS 38-128 i jednim izolatom sa paradajza u Kaliforniji (KY626525). Sekvence druge grupa izolata pokazale su 100% sličnosti sa izolatom *A. arborescens* sa jabuke iz Čilea (MH740635), *A. arborescens* iz Kalifornije izolovane sa suncokreta, krompira, paradajza, pistaća i šargarepe (KY6265526-529), *A. arborescens* sa borovnice (KJ908224) i *A. arborescens* izolata iz vazduha (JQ811990).
- šesta grupa sekvenci od 8 izolata identifikovana je kao vrsta *A. cheiranthi*. Sekvence *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* su pokazale 100% sličnosti sa sekvencama referentnog izolata *A. cheiranthi* CBS 109384.
- sekvence 4 izolata svrstane su u sedmu grupu koja je identifikovana kao vrsta *A. nepalensis*. *ITS* genska sekvenca izolata ove vrste pokazala je 100% sličnosti sa *ITS* sekvencama *A. japonica* CBS 118390 i referentnog izolata *A. nepalensis* CBS 118700. Sekvenca *Alt a1* pokazala je 100% sličnosti sa *Alt a1* sekvencom referentnog izolata *A. japonica* CBS 118390. *GAPDH* sekvencirani genski region imao je 100% sličnosti sa referentnim izolatom *A. nepalensis* CBS 118700. Region *ATP* gena ove grupe sekvenci pokazao je 100% sličnosti sa referentnim izolatom *A. japonica* CBS 118390.

- osma i poslednja grupa od 4 izolata identifikovana je kao *A. malvae*. Sekvence *ITS* regiona su pokazale 100% sličnosti sa referentnim izolatom *A. malvae* CBS 447.86. Za sekvence *Alt a1* regiona takođe je uočeno 100% poklapanje sa sekvencama CBS 447.86. Sekvence *GAPDH* genskih regiona ove grupe izolata bile su identične *GAPDH* regiona vrste *A. alternata* EGS 34-016. Na osnovu analiza *ATP* genskih sekvenci uočena je 100% sličnost sa referentnim izolatom *A. malvae* CBS 447.86.

Tabela 5. Dužine sekvenci ispitivanih gena *Alternaria* spp.

Gen	Vrsta							
	<i>A. brassicae</i>	<i>A. brassicicola</i>	<i>A. japonica</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. arborescens</i>	<i>A. cheiranthi</i>	<i>A. nepalensis</i>	<i>A. malvae</i>
	Amplicon length (bp ^a)							
<i>ITS</i>	506-531	490-535	495-555	504-549	512-578	500-550	493-525	501-576
<i>Alt a1</i>	412-465	365-455	410-470	450-482	432-461	410-496	409-451	451-498
<i>GAPDH</i>	559-586	530-565	571-603	549-590	545-594	515-576	505-568	508-568
<i>ATP</i>	1090-1114	1141-1165	1142-1228	1170-1196	1105-1197	1087-1112	1158-2220	1154-1185

^abp- bazni par

Tabela 6. Sekvence referentnih izolata korišćene u filogenetskoj analizi, poreklo izolata i pristupna šifra u GenBank bazi podataka

Vrsta	Poreklo ^a	GenBank šifra sekvence			
		<i>ITS</i>	<i>Alt a1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>PM-ATP</i>
<i>A. alternata</i>	EGS 34-016	AF 347031	KP 275691	AY 278808	JQ 671874
<i>A. arborescens</i>	EGS 39-128	AF 347033	AY 563303	AY 278810	JQ 671880
<i>A. brassicae</i>	EGS 38-032	JQ 693663	AY 563309	AY 562414	JQ 671847
<i>A. brassicicola</i>	EEB 2232	AF 229652	AY 563311	AY 278813	JQ 671843
<i>A. cheiranthi</i>	CBS 109384	AF 229457	JQ 905106	KC 584107	JQ 671830
<i>A. dauci</i>	CBS 117097	AF 229466	AY 563292	AY 278803	JQ 671907
<i>A. gypsophilae</i>	CBS 107.41	KC 584199	KJ 718688	KC 584118	JQ 671859
<i>A. infectoria</i>	CBS 196.86	AF 347034	FJ 266502	AY 278793	JQ 646454
<i>A. japonica</i>	CBS 118390	AF 229474	AY 563312	AY 278814	JQ 671840
<i>A. longipes</i>	CBS 540.94	AY 278835	AY 278811	AY 278811	JQ 671864
<i>A. malvae</i>	CBS 447.86	KP 124318	JQ 646397	JQ 646314	JQ 671878
<i>A. nepalensis</i>	CBS 118700	KC 584207	-	KC 584126	-
<i>A. porri</i>	CBS 116698	AF 229470	AY 563296	AY 278797	JQ 671901
<i>A. radicina</i>	CBS 245.67	AF 229472	AY 563286	AY 278797	JQ 671851
<i>A. selini</i>	CBS 109380	AF 229455	FJ 266504	AY 278800	JQ 671853
<i>A. smyrmii</i>	CBS 109380	AF 229456	AY 563289	AY 278801	JQ 671852
<i>A. solani</i>	CBS 116651	AF 229456	AY 563299	AY 278807	JQ 671898
<i>A. tenuissima</i>	EGS 34-015	AF 347032	KP 275690	AY 278809	JQ 671875
<i>A. tomatophila</i>	ATCC 10915	AM 237289	JQ 646431	JQ 646047	JQ 671748
<i>A. zirmae</i>	CBS 118.44	KJ 718264	KJ 718771	JQ 646361	JQ 671937
<i>Stemphylium callistephi</i>	EEB 1055	AF 229482	AY 563276	AY 278822	JQ 671769

^a ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia 20108; EEB, EE Butler, Department of Plant Pathology, University of California, Davis, California 95616; EGS, EG Simmons, Mycological Services, Crawfordsville, Indiana 47933; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Uppsalalaan 8,3584 CT Utrecht, the Netherlands

Tabela 7. Pregled publikovanih sekvenci izolata *Alternaria* spp. sa kupusnjača u Srbiji

Vrsta	Domaćin	Šifra izolata	GenBank pristupni brojevi				Haplotipovi
			<i>ITS</i>	<i>Alt a 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>ATP</i>	
<i>A. brassicae</i>	uljana repica	101/2	MN173822	MN173503	MN175513	MN175523	1
	ren	352/1	KP993532	KR051383	KR051391	MF741793	
		433	KP993533	KR051384	KR051392	MF741794	
		434/1	KP993534	KR051385	KR051393	MF741795	
		436	KP993531	KR051382	KR051390	MF741796	
<i>A. brassicicola</i>	uljana repica	106/4	MN173823	MN173504	MN175514	MN175524	1
		101/1	MN173824	MN173505	MN175515	MN175525	2
		107/2	MN173825	MN173506	MN175516	MN175526	3
	ren	408/3	KP993530	KP993537	KR051388	MF741797	1
		434/2	KP993529	KP993538	KR051389	MF741799	
		435	KP993528	KP993536	KR051387	MF741800	
		429/3	KP993527	KP993535	KR051386	MF741798	
<i>A. japonica</i>	uljana repica	270	MN173826	MN173507	MN175517	MN175527	1
<i>A. alternata</i>	uljana repica	719	MN173830	MN173511	MN175521	MN175531	13
		400/2	MN173828	MN173509	MN175519	MN175529	11
		103/5	MN173827	MN173508	MN175518	MN175528	14
		104/3	MN173829	MN173510	MN175520	MN175530	12
		103/4	MN173831	MN173512	MN175522	MN175532	20
	ren	411/3	KR051269	KR051265	KR051397	MF741783	1
		400/4	MF741805	MF741811	MF741817	MF741790	10
		400/3	MF741803	MF741809	MF741815	MF741789	19
		372/3	MF741804	MF741810	MF741816	MF741785	15
		368/1	MF741802	MF741808	MF741814	MF741787	16
		429/2	KR051266	KP993539	KR051394	MF741788	5
		982/3	KR051267	KP993540	KR051396	MF741792	2
		982/2	KR051268	KP993541	KR051395	MF741791	4
		986a	MF741806	MF741812	MF741818	MF741784	
		452	MF741801	MF741807	MF741813	MF741786	

*Osenčena polja u tabeli sugerišu na osnovu varijabilnosti kog genskog regiona su izdvojeni haplotipovi.

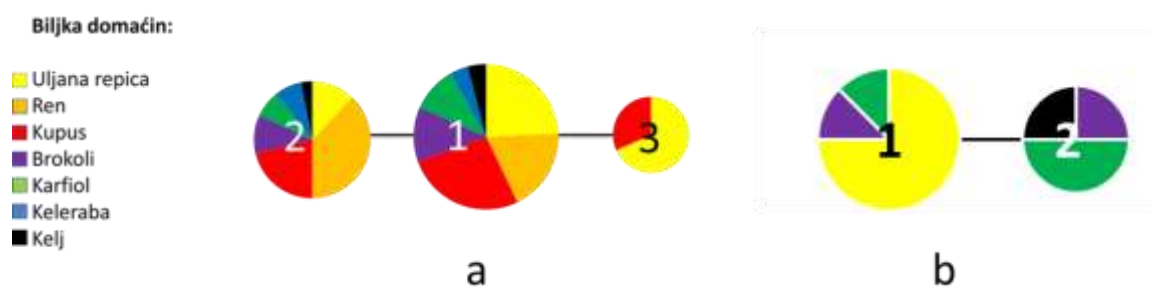
4.6.2. Konstrukcija haplotipskih mreža

Haplotipska mreža konstruisana je statističkom parsimonijom kako bi se poređenjem ustanovile evolutivne razlike *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* genskih regiona 436 izolata *Alternaria* spp. izolovanih sa uljane repice, rena, kupusa, brokolija, karfiola, kelerabe i kelja iz Srbije. Analiza genskih sekvenci *ITS* i *Alt a1* nije pokazala postojanje haplotipova unutar bilo koje od identifikovanih grupa pa je informativnost ovih gena potvrđena samo za konstrukciju filogenetskih stabala u okviru roda *Alternaria*. Genealoška analiza filogenetskih intraspecijskih odnosa unutar vrsta *A. brassicicola* i *A. japonica* na osnovu *GAPDH* sekvenci pokazale su postojanje 3 odnosno 2 haplotipa (Slika 15). Za vrstu *A. brassicicola* najrasprostranjeniji je haplotip 1, identifikovan kod 67 izolata iz cele Srbije na svim domaćinima (9 sa uljane repice, 26 sa rena, 14 sa kupusa, 5 sa brokolija, 6 sa karfiola, 5 sa kelerabe i 2 sa kelja). Haplotip 2, prisutan je kod 53 izolata koji potiču sa svih proučavanih domaćina i iz svih geografskih regija Srbije (12 sa uljane repice, 11 sa rena, 13 sa kupusa, 5 sa brokolija, 5 sa karfiola, 2 sa kelerabe i 5 sa kelja). Haplotip 3, prisutan je kod 21 izolata, 14 sakupljenih sa uljane repice i 7 sa kupusa, takođe prisutan u svim glavnim regijama Srbije.

Haplotip 1 vrste *A. brassicicola* određen je kao centralni ili predački haplotip koji se od haplotipa 2 razlikuje u jednoj mutaciji nukleotida G (guanin) u A (adenin) na mestu 481. Haplotip 3, *A. brassicicola* se razlikuje od centralnog haplotipa 1 takođe za jednu mutaciju na nukleotidnom mestu 304 mestu, T (timin) je zamenjen sa C (citozin) (Slika 15a).

Varijabilnost analiziranog *GAPDH* regiona vrste *A. japonica* ukazala je na postojanje 2 haplotipa (Slika 15b). Haplotip 1 vrste *A. japonica* detektovan je kod 6 izolata sa uljane repice, 1 izolata sa brokolija i 1 izolata sa karfiola i dominantan je u Srbiji. Haplotip 2, nađen je kod 4 izolata, 2 sa karfiola, 1 sa brokolija i 1 sa karfiola. Broj izolata bio je nedovoljan da bi se ispitala geografska uslovljenost distribucije opisanih haplotipova (Tabela 8).

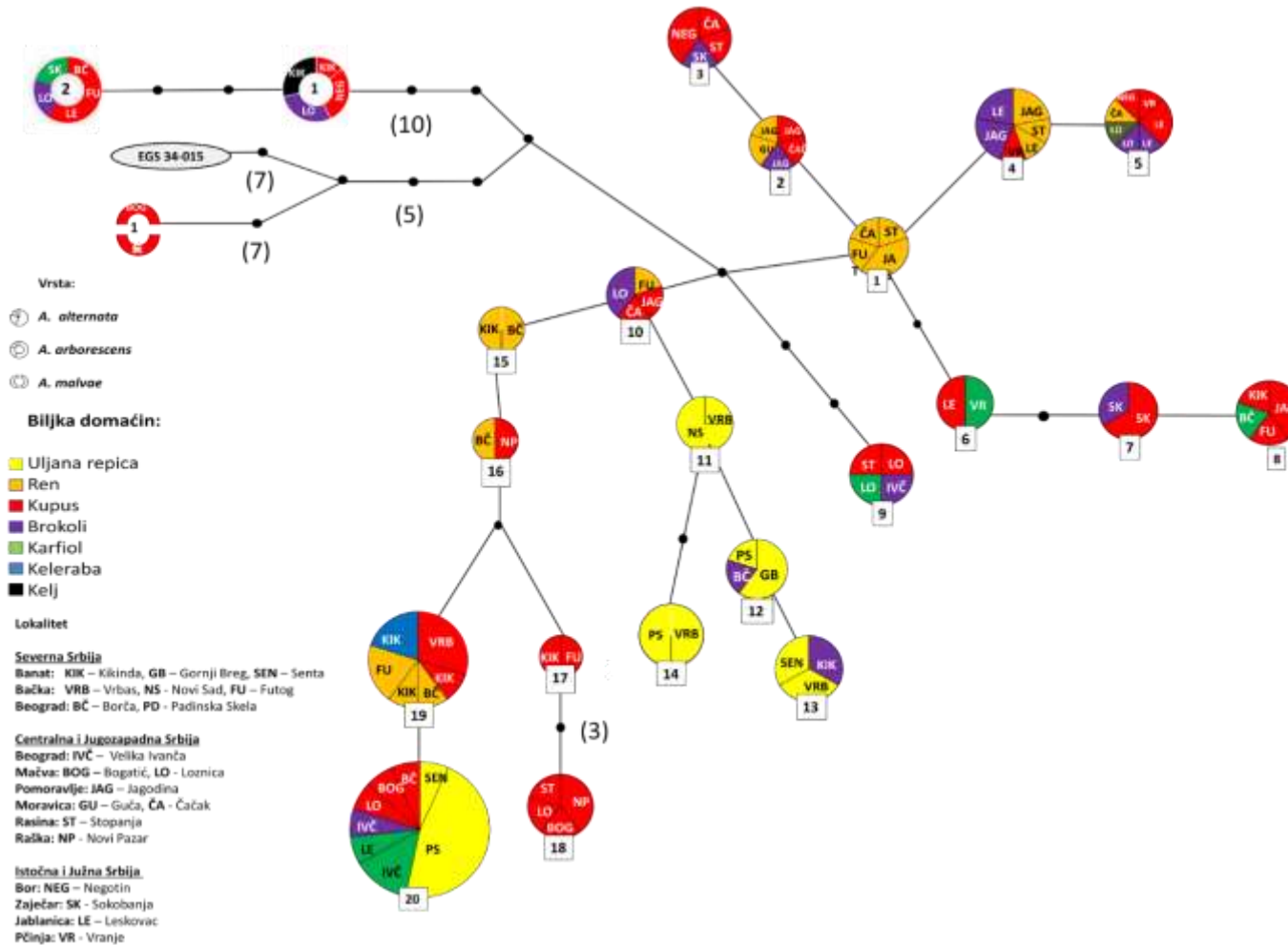
Genealoška analiza na osnovu sekvenci *ATP* gena vrste *A. alternata* ukazala je na postojanje 20 haplotipova (Tabela 8). Haplotip 1, određen je kao centralni ili predački haplotip i detektovan je kod pet izolata izolovanih sa biljaka rena sa teritorije cele Srbije (Slika 16). Haplotip 2 zabeležen je kod pet izolata *A. alternata* izolovanih sa rena, kupusa i brokolija u centralnoj Srbiji (Čačak, Guča, Jagodina). Haplotip 3, izolovan je sa biljaka kupusa u centralnoj i istočnoj Srbiji (Čačak, Stopanja i Negotin) i brokolija u istočnoj Srbiji (Sokobanja). Kao što se može videti haplotip 4 i 5 predstavljaju drugo odvajanje od centralnog haplotipa 1 (Slika 16). Devet izolata haplotipa 4, uzorkovano je sa biljaka rena, kupusa i brokolija, a 8 izolata haplotipa 5 je osim sa ovih domaćina izolovano i sa karfiola. Haplotipovi 4 i 5 su detektovani na različitim domaćinima u Srbiji, ali nisu potvrđeni na severu Srbije. Treće odvajanje haplotipova pokazano je za *A. alternata* haplotip 6, 7 i 8. Haplotip 6 je izolovan sa biljaka kupusa i karfiola u južnoj Srbiji (Vranje, Leskovac), haplotip 7 sa kupusa i brokolija istočne Srbije, dok je haplotip 8 detektovan na istim domaćinima kao haplotip 6 (kupusu i karfiolu) na dva lokaliteta u Vojvodini i beogradskoj regiji. Četvrto razdvajanje u mreži haplotipova *A. alternata* sa kupusnjača čini 4 izolata haplotipa 9, izolovanog sa kupusa, brokolija i karfiola iz centralne i zapadne Srbije. Haplotip 10 predstavlja haplotip od kog se odvajaju dve grupe *A. alternata* haplotipova, haplotipovi 11, 12, 13, 14 i haplotipovi 15, 16, 17, 18, 19 i 20. Haplotip 10 izolovan je sa rena, kupusa i karfiola, sa lokaliteta u severnoj, centralnoj i zapadnoj Srbiji. Deo mreže koji čine haplotipovi 11, 12, 13 i 14 su pretežno izolovani sa uljane repice, osim *A. alternata* haplotipa 12 koji je izolovan sa karfiola u beogradskoj regiji, i haplotipa 13 izolovanog sa brokolija u Kikindi. Ovi haplotipovi, kako se može videti, detektovani su samo u Vojvodini i beogradskoj regiji, odnosno severnoj regiji Srbije. Haplotipovi 16, 17, 18, 19 i 20 se granaju od haplotipa 15. Haplotip 15 čini svega dva izolata koji su izolovani sa biljaka rena u Vojvodini i beogradskoj regiji. Izolati *A. alternata* haplotip 16, detektovani su na kupusu i renu u Borči i Novom Pazaru, dok su haplotipovi 17 i 18 izolovani samo sa biljaka kupusa iz severne, zapadne i centralne Srbije. Izolati *A. alternata*



Slika 15. Mreža haplotipova (a) *Alternaria brassicicola* i (b) *A. japonica*

koji pripadaju haplotipu 19 pronađeni su na renu, kupusu i kelerabi iz severne Srbije. Grupa izolata označena kao haplotip 20 izolovana je sa uljane repice, ali se može naći i na kupusu, brokoliju i karfiola u celoj Srbiji. Treba napomenuti da su se izolati haplotipa 20, kao i ranija 4 izolata sa kupusa haplotipa 4, pokazala kao nepatogena na svim testiranim domaćinima. U ispitivanjima uticaja temperature na rast, sporulaciju i dužinu konidija, ovi nepatogeni izolati izdvojili su se u *A. alternata* klaster 5.

Izdvojeni deo mreže čini sekvenca referentnog izolata *A. tenuissima* EGS 34-015 i sekvenca izolata *A. malvae*. Dva haplotipa *A. arborescens* su grupisana na istoj genskoj liniji. *A. arborescens* haplotip 1 izolovan je sa kupusa (3 izolata), brokolija (2 izolata) i kelja (2 izolata) severne i istočne Srbije. Haplotip 2 razlikuje se za dva mutacijska koraka i izolovan je sa kupusa (3 izolata), brokolija (1 izolat) i karfiola (1 izolat) iz severne i centralne Srbije.



Slika 16. Haplotipska mreža* regiona *ATP* gena vrsta *Alternaria alternata*, *A. arborescens* i *A. malvae* izolovanih sa kupusnjača u Srbiji.

*Haplotipovi *A. alternata* predstavljeni su kao ispunjeni krugovi označeni brojem za haplotip, određenom bojom za domaćina sa kog su izolovani kao i slovnim skraćenicom za lokalitet gde su detektovani, Za vrste *A. arborescens* i *A. malvae* haplotipovi su označeni kako je navedeno u legendi. Veličina krugova određena je brojem izolata. Tačke na slici predstavljaju intermedijarne haplotipove ili haplotipove koji nisu detektovani. Svaka tačka obeležava intermedijarni haplotip koji se razlikuje u jednoj nukleotidnoj mutaciji, ili više njih ako je navedeno u zagradi ispod tačke na mreži.

Tabela 8. Pregled izolata *Alternaria* spp. izolovanih sa kupusnjača na području Srbije.

Oblast	Region	Lokalitet	Biljka domaćin	Vrsta																
				<i>A. brassicae</i>		<i>A. brassicicola</i>		<i>A. japonica</i>		<i>A. alternata</i>		<i>A. arborescens</i>		<i>A. cheiranti</i>		<i>A. nepalensis</i>		<i>A. malvae</i>		
				izolat	hp*	izolat	hp	izolat	hp	izolat	hp	izolat	hp	izolat	hp	izolat	hp	izolat	hp	
S e v e r n a S r b i j a	Banat	Kikinda	Ren	341/4	1	186/2	1		973	15										
				342/3		183/2												194/1		
				349		185/1												194/1		
				351/2																
			352/1																	
			Kupus	362/2	1	199/4	1		160/2	8	905/1	1	903/4	1						
		364/5		195/5		155/2														
		363/5		191/1		158/3														
		366/3																		
		362/4																		
		Brokoli	387/1	1	203/4	1		153/2	13											
			390/6		147/2															
	Kelj	301/2	1	201/6	1				911/1	1										
		306/4		205/4					914/2											
	Karfiol	310/2	1	202/4	1															
	Keleraba	393/2	1	195/1	1		162/3	19												
		385/2		191/2			170/3													
	Bogaraš	Uljana repica	229	1	218/2	1	207													
					242/3														219/3	205/3
					236														209/2	210/5
					231/1														223	
																			229/2	
					238/8														241/3	
			Gornji breg	222/4	1	201/4	2				211	12								
				232/2							213/3									
				241							231/2									
247/1																				
247/3																				
Senta	Uljana repica	214	1	738/1	2			724	13											
		224/4		750/2														726		
		232/1		736/1														736/2		
		232/4		740																
		232/5		744/3																
				728																
Ostojićevo	Uljana repica	251	1	254/1	1			267	1											
		255		259/3														259/3		
		257/3		260/1														260/1		
		269/1		262/1														262/1		
Idoš	Uljana repica	272	1	291/1	3															
		278																		
		287/1																		
		291/3																		
Vrbas	Uljana repica	715/1	1	714	1			716/5	14											
		715/2						717/2												
		176/1						718/1												
		719/1						718/3												
								719												
		725						722/2												
	Kupus	687/2	1	700/2	1				699/3	19										
		674/2							690/4											
		690/1							696/3											
		682/5																		
696/2																				

t
r
a
l
n
a

i

J
u
g
o
z
a
p
a
d
n
a

S
r
b
i
j
a

Pomoravlje	Jagodina	Ren	420/1	1	207/2			982/2	4																					
					208				982/3																					
			420/2					2			51/3	2																		
																							207/1							
										205/2																				
		Kupus	404/1	1	407/3			2		172/5	2																			
										182/3	8																			
								3		185/4																				
										224/1	9																			
		Karfiol	404/3	1				2																						
																						199/3								
								2																						
																						195/2								
		Brokoli	214/1	1	214/5			1		214/2	2																			
214/4										4																				
											188/5																			
						2		191/3																						
								214/5																						
Kelj	403/3	1	195/3	1	215/4	2																								
Moravica	Guča	Ren	179/2	1	409/1	1		986	2																					
			180/1		433																									
																					181/3	410								
	Ren	442/1	1	444/1			1		429/1	1																				
																					414/2									
																					414/3									
																					420									
																					421									
																					422									
	429/3	2																												
	Kupus	465/4	1	450/4			2		184/3	2																				
									458/2	3																				
									401/4	10																				
Rasina	Stopanja	Ren	437	1		1		980/1	1																					
																				202/1										
																				202/2										
																				201/5										
																				202/6										
																				205/1										
																				205/5										
																				999	4									
		Kupus	432/4	1				1		183/5	3																			
										208/2	9																			
										208/3	2																			
										184/1	18																			
		Keleraba	430/3	1	201/3	1																								
		Raska	Novi Pazar	Kupus	462/2	1	402/5	1		972/3	16																			
458/3	401/3				981/3		18																							
463/5	2				401/1		975/2																							
466/2							978/4																							
Istочно	Bor	Negotin	Kupus	422/1	1			910/2	3	909/5	1	916/2	1						900/3											
																				905/3	2		908/5	5	914/5				900/1	1
																										1				
	905/4	1	907/3	906/5	7																									
	Zajecar	Sokobanja	Kupus	421/3	1		1		907/1	7			912/4	1						913/4										
									908/1	1																				
			Karfiol						2		915/2	1																		
											915/3	2											384/5	2						
	Brokoli	428/5	1				1		914/6	7																				
									905/6	2											911/4	3								
	Ren	434/1	1				1																							
																					434/2		452	4						

a i J u ž n a S r b i j a	Jablanica	Leskovac	436	1	435	2																	
					434/4																		
			Kupus	1	439/2	1	445/6	2	472/3	2	465/3	5	412/4	2									
					442/5		460/3																466/3
							458/4																
			Karfiol			1	485/3	2	472/3	2	469/4	6											
							467/3				472/5												
							468/5				476/4												20
			Brokoli			2	475/8	1			495/3	4											
							478/1				496/2												
	476/3	497/4					5																
	Keleraba			1	440/5	2																	
	Pčinja	Vranje	Ren	1	340/1	1																	
					340/2																176/5		
					176/3																2		
Kupus			1	174/2	2	185/2	1			468/1	4												
						195/4				495/1													
						195/7				497/1													
				177/3		195/6				497/3													

* geografsko poreklo, ** šifra izolata, ***hp- haplotipska grupa.

4.6.3. Konstrukcija filogenetskih stabala

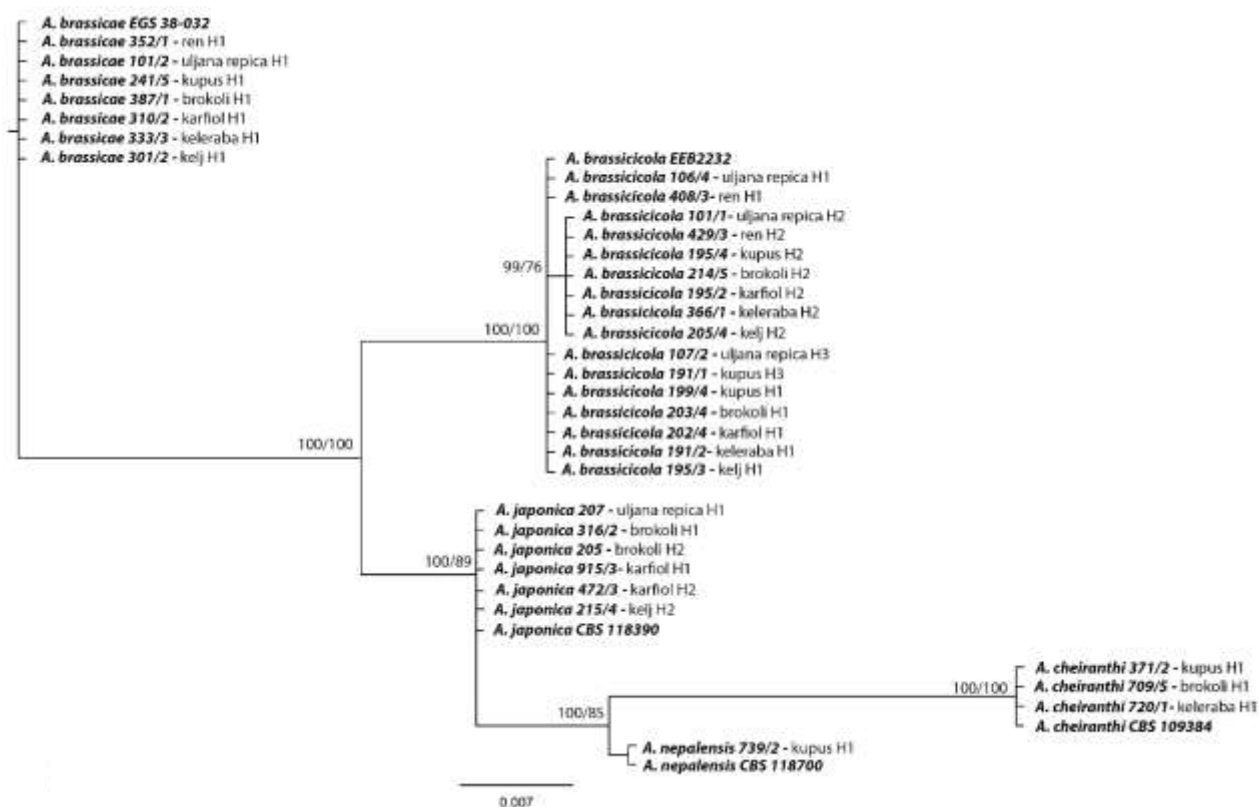
Za filogenetske analize formirana su tri seta podataka na osnovu: *ITS* i *GAPDH*; zatim *Alt a1* i *ATP*; kao i *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* sekvenci izolovanih vrsta i haplotipova koji su detektovani za svakog domaćina. Obzirom da su filogenetska stabla dobijena putem Bayes i ML metode bila slične topologije i podržanosti (*bootstrap*) prikazano je po jedno stablo sa dve *bootstrap* vrednosti za sva tri seta podataka.

Prva filogenetska analiza na osnovu spojenih sekvenci *ITS* i *GAPDH* gena sprovedena je za vrste *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. nepalensis* i *A. cheiranthi* (Slika 17). Nakon poređenja i uparivanja genskih sekvenci zabeleženo je 38 sekvenci dužine 968 bp. Analizom BIC vrednosti u jModelTest programu utvrđeno je da je najoptimalniji evolucionni model za konstrukciju filogenetskog stabla ovih sekvenci, model GTR+G (*General time reversible model with gamma distribution*). Ovaj model korišćen je kako u MrBayes analizi tako i u ML analizi. Parametri za stablo prve filogenetske analize bili su: Lset base = (0.2428 0.2939 0.2303) nst = 6 rmat = (1.0000 1.3883 0.4853 0.4853 3.1700) rates = gamma shape = 0.0220 ncat = 4 pinvar = 0. U ovoj filogenetskoj analizi pokazano je grupisanje izolata *Alternaria* spp. na pet dobro podržajnih grana. Prvu granu čine izolati *A. brassicae* sa samo jednim haplotipom detektovanim na svim domaćinima. Drugu granu čine *A. brassicicola* izolati, pri čemu su predstavnici haplotipa 1 i haplotipa 3 odvojeni od predstavnika haplotipa 2. Treću granu čine sekvence izolata *A. japonica* oba haplotipa. Četvrta i peta grana sastavljena je od sekvenci *A. cheiranthi* odnosno *A. nepalensis*.

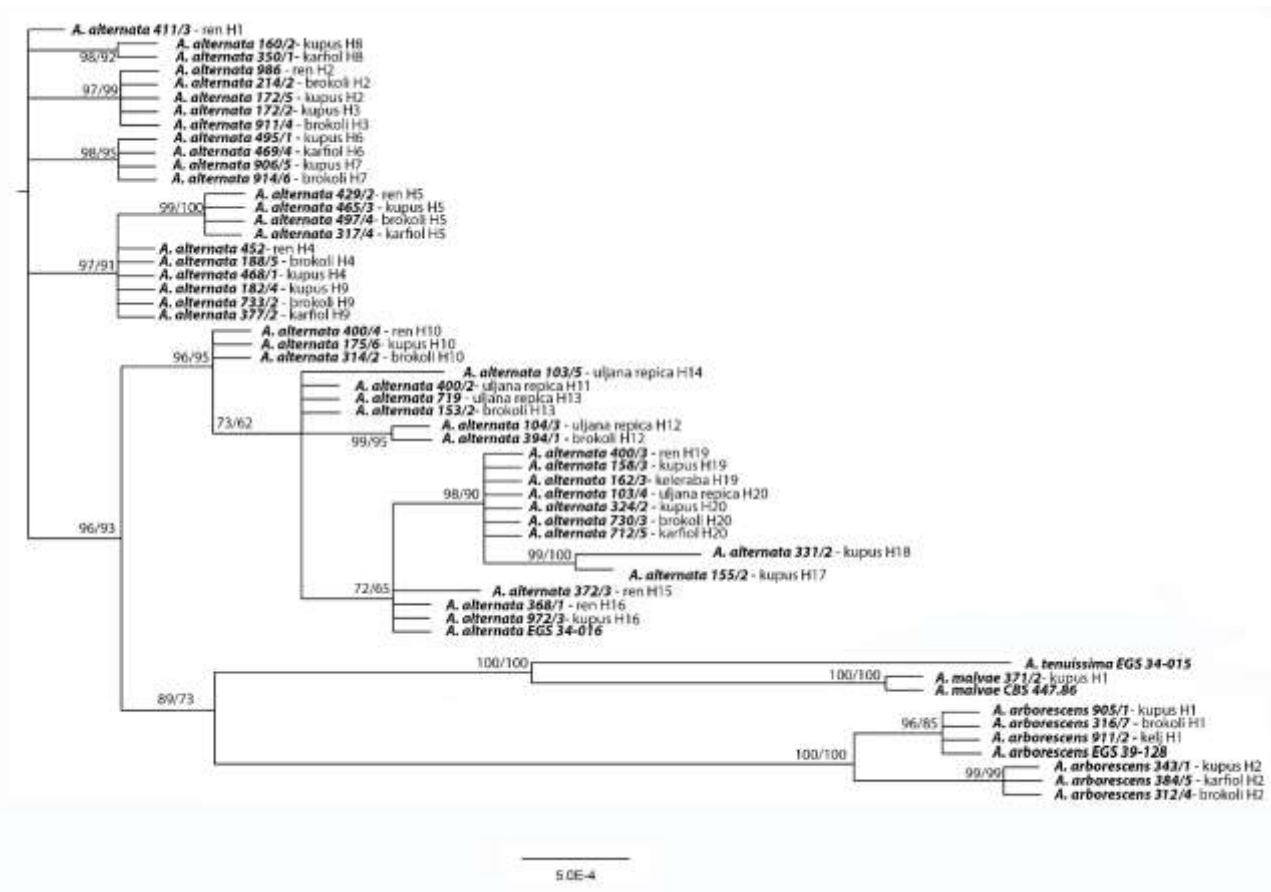
Druga filogenetska analiza, na osnovu spojenih sekvenci *Alt a1* i *ATP* gena sprovedena je za haplotipove *A. alternata*, *A. arborescens* i *A. malvae* detektovane na različitim domaćinima (Slika 18). Nakon uparivanja, poravnanja i isecanja sekvenci ovih vrsta zabeleženo je 54 sekvence, dužine 1499 bp. Analizom BIC vrednosti u jModelTest programu utvrđeno je da je najoptimalniji evolucionni model za konstrukciju filogenetskog stabla ovih sekvenci model F81 (Felsenstein's 1981 model). Ovaj model korišćen je kako u MrBayes

analizi tako i u ML analizi. Parametri za stablo druge filogenetske analize bili su: Lset base = (0,2312 0,3119 0,2343) nst = 2 tratio = 2,8302 rates = equal pinvar = 0,8130. U ovoj filogenetskoj analizi pokazala se jasna odvojenost vrsta *A. arborescens*, referentnog izolata *A. tenuissima* i vrste *A. malvae*, od ostalih haplotipova *A. alternata*. Kako je tipologija ove filogenetske analize pokazala, haplotipovi *A. alternata* podeljeni su u 12 filogenetskih grupa (Slika 18).

Filogenetska analiza sprovedena je na osnovu *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* sekvenci svih analiziranih *Alternaria* spp. i haplotipova koji se javljaju na domaćinima, kao i sekvenci referentnih izolata iz NCBI baze gena (Tabela 6). Proučavane vrste roda *Alternaria* podeljene su u 7 klada, od kojih je svaka klada podržana visokom *bootstrap* vrednosti (Slika 18). Prvu kladu, *Alternata*, činili su izolati *A. alternata*, *A. arborescens* i *A. malvae* izolovani sa kupusnjača u Srbiji, ali i referentni izolati *A. tenuissima* i *A. longipes*. Druga klada, klada *Porri* sačinjena je od referentnih izolata *A. dauci*, *A. zinnia*, *A. solani*, *A. tomatophila* i *A. porri*. Vrsta *A. brassicae* izolovana sa kupusnjača pozicionirana je kao zasebna grana grupe *Sonchi*. U okviru jedne klade, pozicionirali su se referentni izolati *A. radicina* i *A. smyrnii* kao grupa *Radicina*, i *A. gypsophilae* kao grupa *Gypsophilae*. Vrste *A. brassicicola*, *A. japonica* i *A. nepalensis* izolovane iz Srbije, grupisane su zajedno kao klada *Brassicicola*. Vrsta *A. cheiranthi* organizovala se kao zasebna klada *Cheiranthus*.



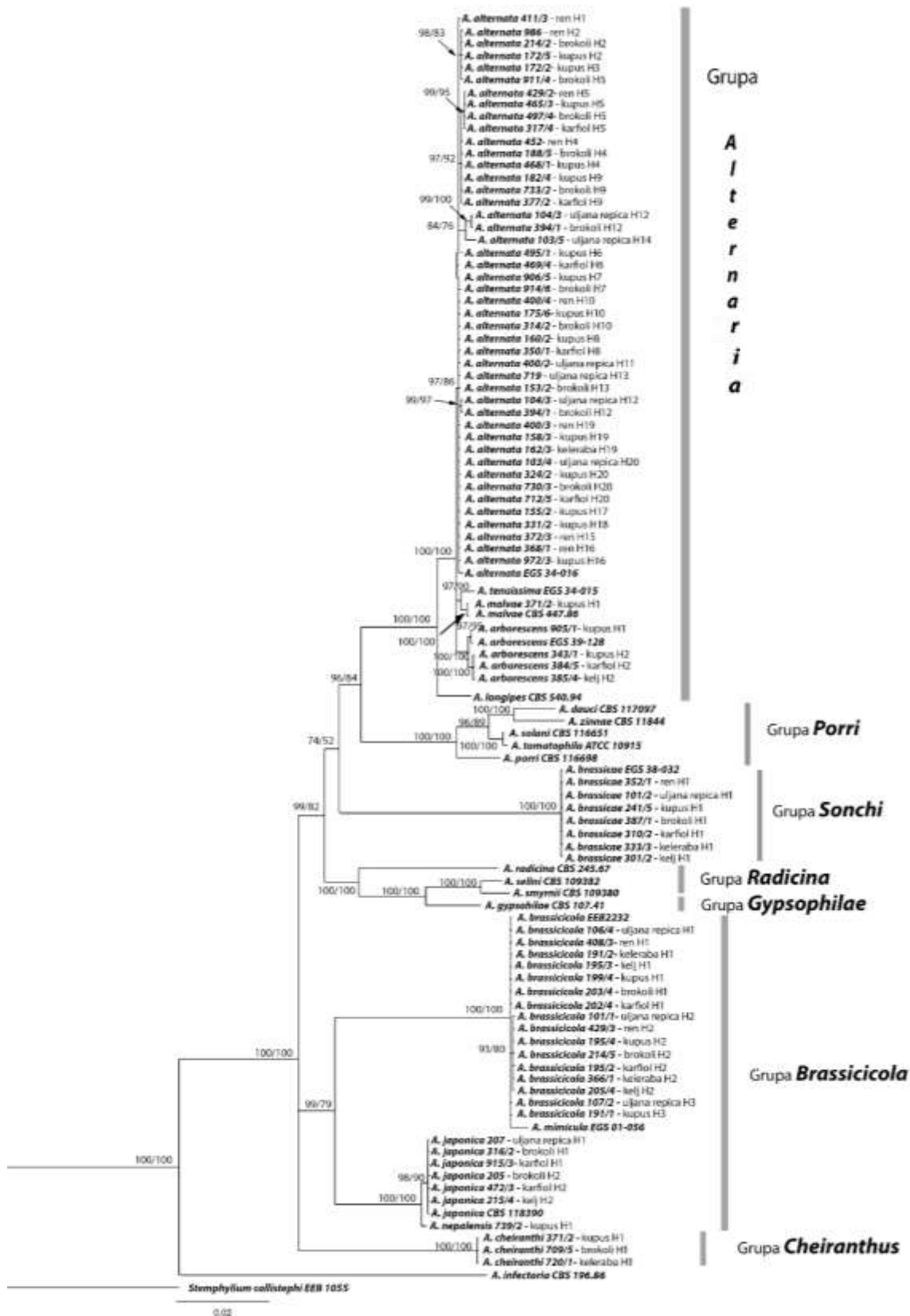
Slika 17. Filogenetsko stablo dobijeno analizom *ITS* i *GAPDH* gena. Na granama stabla su označene *bootstrap* vrednosti > 50, za Bayes i ML metodu. Dužina grana odgovara broju supstitucionih promena.



Slika 18. Filogenetsko stablo dobijeno analizom *Alt a1* i *ATP* gena. Na granama stabla su označene *bootstrap* vrednosti za Bayes i ML metodu. Dužina grana odgovara broju supsticionih promena.

4.7. Ispitivanje mikrosatelitskih markera *Alternaria brassicicola*

U ovoj analizi testirano je 33 reprezentativna izolata *A. brassicicola* sa kupusnjača u Srbiji (Tabela 9). Sva četiri umnožena mikrosatelitska lokusa pokazala su se polimorfnim, sa ukupno 25 multilokusnih genotipova. Broj alela za svaki lokus varirao je od 3 do 6 (Tabela 10). Amplifikovan je samo jedan alel po ispitivanom lokusu. Rezultati AMOVA analize pokazali su da ne postoji statistički značajna genetička diferencijacija između i unutar četiri glavna regiona u Srbiji, niti između izolata koji potiču sa različitih domaćina (iako je odgovorna za 3,2% varijabilnosti u populacijama *A. brassicicola* u Srbiji). Najveća genetička varijabilnosti uočena je između izolata. Indeksi diverziteta H_{exp} , G i λ , kao i H_{exp} su imali relativno visoke vrednosti kako je pokazano u Tabeli 11. Vrednosti indeksa asocijacije genotipova pokazali su da je genotipska vezanost lokusa očuvana.



Slika 19. Filogenetsko stablo dobijeno analizom spojenih *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* sekvenci reprezentativnih izolata *Alternaria* spp. sa kupusnjača i referentnih izolata iz GenBank baze. Na granama stabla su označene *bootstrap* vrednosti za Bayes i ML metodu. Dužina grana odgovara broju supstitucionih promena.

Tabela 9. Izolati *Alternaria brassicicola* korišćeni u analizi mikrosatelitskih markera (S-severna Srbija, Z-zapadna Srbija, I-istočna Srbija, J-južna Srbija)

	Šifra izolata	Biljka domaćin	Haplotip	Lokalitet
			(na osnovu GAPDH gena)	
1	186/2	ren	1	Kikinda (S)
2	183/2		2	
3	199/4	kupus	1	
4	195/5		2	
5	191/1		3	
6	202/4	karfiol	1	
7	195/1	keleraba	1	
8	201/6	kelj	1	
9	205/4		2	
10	218/2	uljana repica	1	Bogaraš (S)
11	219/3		2	
12	209/2		3	
13	372/1	karfiol	1	Loznica (Z)
14	365/3		2	
15	348/3	keleraba	1	
16	366/1		2	
17	356/5	kelj	2	
18	220/2	kupus	2	Jagodina (C)
19	198/3		3	
20	195/3	kelj	1	
21	902/3	kupus	1	Negotin (I)
22	905/3		2	
23	905/2	brokoli	1	
24	905/6		2	
25	478/4	ren	1	Vranje (J)
26	478/6		2	
27	478/7	kupus	1	
28	478/8		2	
29	478/10		3	
30	485/3	karfiol	1	Leskovac (J)
31	468/5		2	
32	475/8	brokoli	1	
33	478/1		2	

Tabela 10. Broj detektovanih alela za *Alternaria brassicicola* izolate

Mikrosatelitski marker	Broj alela	Dužina umnoženih sekvenci alela (bp)	Neov indeks (H_{exp})
AB1 (Abmic4, Avenot et al. 2005)	5	76, 92, 96, 115, 135	0.71
AB2 (Abmic8, Avenot et al. 2005)	3	146, 150, 156	0.48
AB3 (Abmic9, Avenot et al. 2005)	6	76, 90, 94, 100, 104, 151	0.73
AB4 (Abmic11, Avenot et al. 2005)	6	180, 185, 191, 200, 206, 212	0.63

Tabela 11. Analizirani indeksi genetičkog diverziteta populacije *Alternaria brassicicola* sa kupusnjača u Srbiji

N (broj izolata)	33
MLG (broj multilokusnih genotipova na osnovu četiri mikrosatelitska lokusa)	25
Shannon indeks (N_1)	18.23
Stoddart-Taylor indeks (G)	17.63
Simpsons indeks (Δ)	0.943
Srednja vrednost Nei index (H_{exp})	0.637
Indeks ujednačenosti (E)	0.912
Indeks asocijacije (I_A)	0.186
Statistička značajnost (P)	0.034

4.8. Ispitivanje prisustva mutacija *cytB* gena kod izolata *Alternaria brassicicola*

Primenom PCR metode, koristeći parove specifičnih prajmera, uspešno je umnožen region *cytB* gena izolata *A. brassicicola*. Poređenjem sekvenci u programu MEGA 6, utvrđeno je da svi analizirani izolati *A. brassicicola* imaju identične sekvence *cytB* gena. Sekvence *cytB* regiona su imale dužinu od 1905-2214 bp. Prisustvo F129L, G137A i G143A mutacija, za koje je prethodno utvrđeno da utiču na osetljivost patogena na fungicid azoksistrobin, u ovom preliminarnom skriningu nije uočeno (Slika 20).



Slika 20. Sekvence dela *CytB* genskog regiona izolata *Alternaria brassicicola* sa kupusnjača u Srbiji. Tripleti nukleotida uokvireni žutom bojom (1-TTC, 2-GGT i 3-GGT) predstavljaju mesta na kojima je analizirano prisustvo mutacija F129L, G131A i G134A. Prazna polja obeležena „-“ samo simbolično predstavljaju poziciju introna čija je dužina bila 1316 bp.

4.9. Antagonističko delovanje *Trichoderma harzianum* i *Fusarium lateritium* na patogene *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola*

U ispitivanje antagonističkog delovanja *T. harzianum* i *F. lateritium* uključeno je po 7 izolata *A. brassicae* i *A. brassicicola* koji su u testu patogenosti pokazali najveću agresivnost na ispitivanim kupusnjačama (Tabela 12).

Tabela 12. Izolati *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola* koji su se pokazali najagresivniji u testu patogenosti

Biljka domaćin	Vrsta	Šifra izolata
Uljana repica	<i>A. brassicae</i>	251
	<i>A. brassicicola</i>	219/3
Ren	<i>A. brassicae</i>	356/1
	<i>A. brassicicola</i>	905/3
Kupus	<i>A. brassicae</i>	374/2
	<i>A. brassicicola</i>	191/1
Brokoli	<i>A. brassicae</i>	310/2
	<i>A. brassicicola</i>	478/1
Karfiol	<i>A. brassicae</i>	395/2
	<i>A. brassicicola</i>	372/1
Keleraba	<i>A. brassicae</i>	385/2
	<i>A. brassicicola</i>	348/3
Kelj	<i>A. brassicae</i>	310/2
	<i>A. brassicicola</i>	201/6

4.9.1. Izolacija i identifikacija *T. harzianum* i *F. lateritium*

Na osnovu izgleda kolonija i morfoloških karakteristika na PDA podlozi, mikromicete koje su pokazivale inhibitorno delovanje na rast *Alternaria* spp. mogle su se svrstati u dve grupe. Prvu grupu je odlikovala vazdušasta, beličasta micelija koja je znatno razvijenija u centru dok je ka periferiji Petri kutije bila vrlo slaba sa nekoliko koncentričnih krugova. Posle tri dana micelija je ispunila Petri kutiju. Konidije ove grupe bile su okruglaste, dijametra $2,3 \times 2,0 \mu\text{m}$. Na osnovu opisa Gams i Bissett (1998) grupa je identifikovana kao *Trichoderma harzianum*. Kolonije druge grupe, svega dva izolatasu imalavarijabilnu boju micelije od bele do rozikaste. Mikroskopskim pregledom spora uočena su dva tipa spora, mikrokondije ($7,5 \times 5,9 \mu\text{m}$) i makrokonidije ($38,8 \times 3,5 \mu\text{m}$). Na osnovu dimenzija spora i ostalih morfoloških karakteristika prema Haddad i sar. (2016) ova grupa antagonista je identifikovana kao *Fusarium lateritium*. Fragmenti umnoženi PCR metodom bili su dužine oko 550 bp za *T. harzianum* i 500 bp za *F. lateritium*. Poređenjem ovih sekvenci sa dostupnim odgovarajućim ITS sekvencama u GenBank bazi podataka pomoću BLAST analize, potvrđeno je da prva grupa izolata sa inhibitornim delovanjem pripada vrsti *T. harzianum* (100% sličnosti sa sekvencom referentnog izolata CBS 130673) odnosno da druga grupa pripada vrsti *F. lateritium* (100% sličnosti sa sekvencom referentnog izolata CBS 140424).

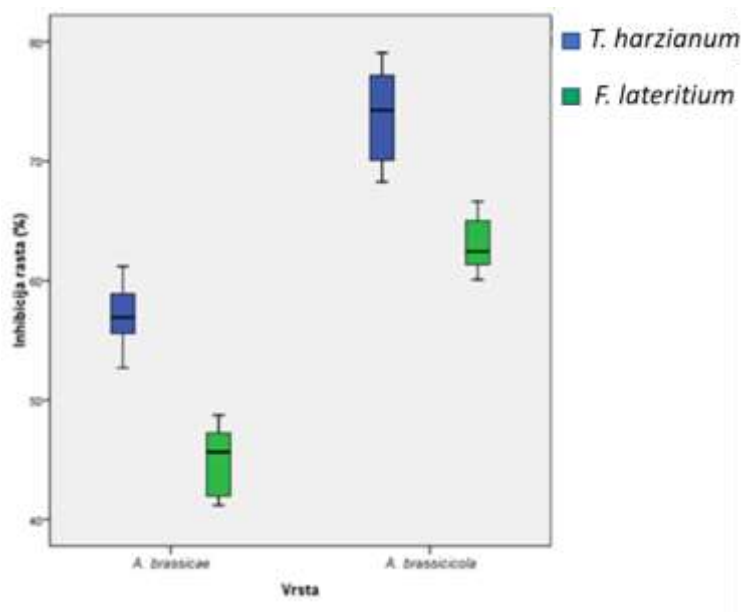
4.9.2. *In vitro* delovanje *T. harzianum* i *F. lateritium* na rast *A. brassicae* i *A. brassicicola*

Antagonističko delovanje mikromiceta testirano je gajenjem u dualnoj kulturi sa patogenom u *in vitro* uslovima. Nakon 7 dana gajenja na 25 °C, obavljena su merenja dijametra kolonija i izračunat procenat inhibicije (I) u odnosu na kontrolu, kulturu gde nije inokulisan antagonista. Između testiranih izolata *T. harzianum* nije bilo statističkih razlika u inhibitornom delovanju na rast kolonija *A. brassicae* kao ni na rast kolonija *A. brassicicola* ($P=0,137$). Takođe, ni između testiranih izolata *F. lateritium* nije bilo statistički značajnih razlika ($P=0,234$). *T. harzianum* je pokazala statistički značajno veću sposobnost inhibicije

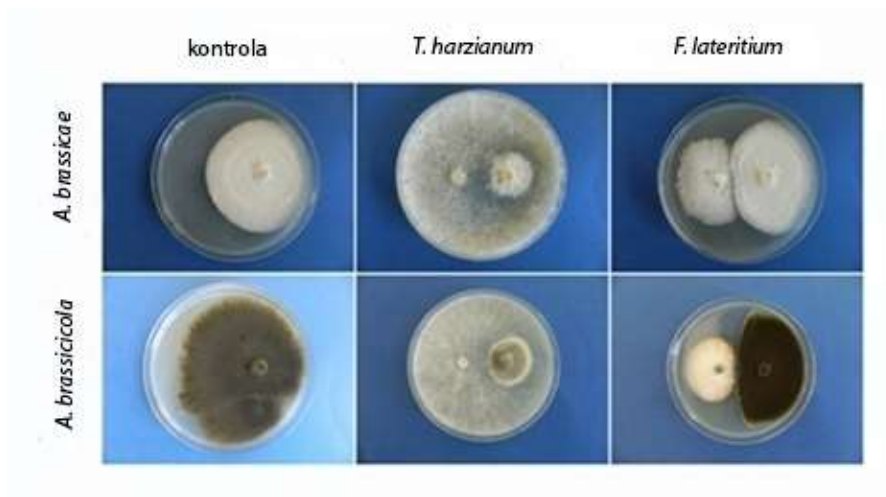
rasta *A. brassicicola* ($73,8\% \pm 4,2$) nego *A. brassicae* ($57,11\% \pm 2,6$) ($F_{(1;14)} = 91,685$, $P > 0,05$). Testovi inhibicije rasta sa *F. lateritium* pokazali su takođe značajno veći efekat inhibicije *A. brassicicola* ($63,1\% \pm 2,4$) nego što je to slučaj sa *A. brassicae* ($44,9\% \pm 2,9$) ($F_{(1;14)} = 182,109$, $P > 0,05$). Testovi su pokazali da vrsta *T. harzianum* ima veći inhibicioni efekat nego *F. lateritium* na rast micelija oba testirana patogena (Slika 21 i 22).

4.9.3 *In vivo* delovanje *T. harzianum* i *F. lateritium* na patogenost *A. brassicae* i *A. brassicicola*

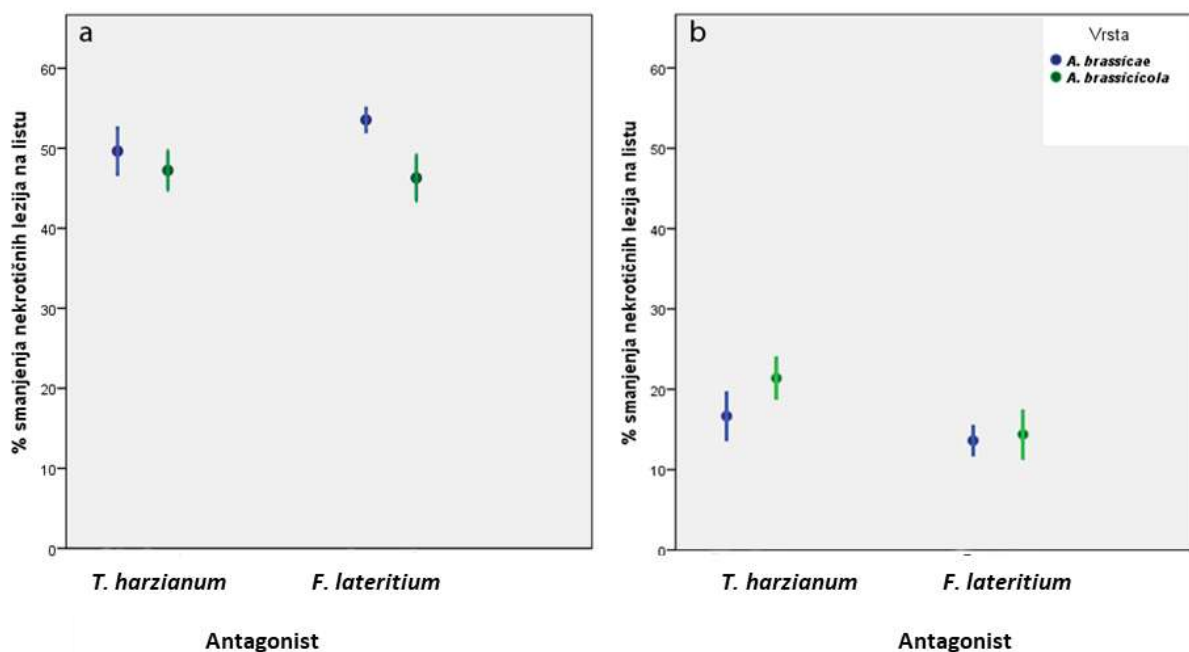
U istraživanjima je analiziran i uticaj antagonista na patogenost *A. brassicae* i *A. brassicicola in vivo*. U slučajevima kada su listovi kupusa prvo tretirani suspenzijom *T. harzianum* ili *F. lateritium*, a zatim suspenzijom spora *A. brassicae*, stepen inhibicije bio je veći ($50,3\%$ odnosno $55,3\%$) nego u slučajevima kada su listovi prvo inokulisani suspenzijom *A. brassicae*, a potom antagonistima (18% odnosno $14,6\%$). U drugom slučaju, kada su listovi kupusa prvo tretirani suspenzijom *T. harzianum* ili *F. lateritium*, a zatim suspenzijom *A. brassicicola*, potvrđeno je isto što i za *A. brassicae*, stepen inhibicije bio je veći ($47,4\%$ odnosno $45,1\%$) nego kada su listovi prvo inokulisani patogenima ($17,3\%$ odnosno $14,2\%$). Dok se u *in vitro* testovima *T. harzianum* pokazala značajno efikasnijim antagonistom od *F. lateritium* kako za *A. brassicae* tako i za *A. brassicicola*, *in vivo* testovi na kupusu su pokazali da ne postoji značajna razlika u delovanju između ovih antagonista (Slika 23 i 24).



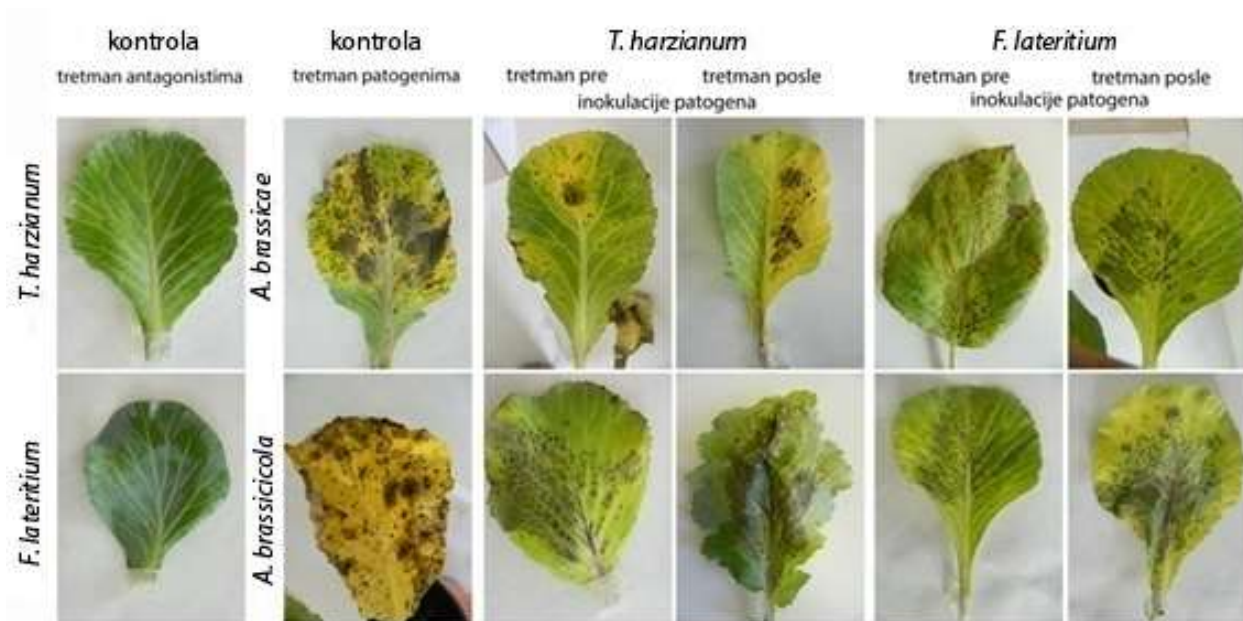
Slika 21. Grafički prikaz inhibitornog efekta *Trichoderma harzianum* i *Fusarium lateritium* na rast *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola*



Slika 22. Antagonistička aktivnost *Trichoderma harzianum* i *Fusarium lateritium* prema *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola* na PDA podlozi



Slika 23. Grafički prikaz antagonističkog efekta *Trichoderma harzianum* i *Fusarium lateritium* suspenzija na procenat smanjenja nekrotičnih lezija, (a) pre i (b) posle inokulacije lista suspenzijom patogenih propagula *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola*



Slika 24. Efekat primene suspenzije spora *Trichoderma harzianum* i *Fusarium lateritium* na listove kupusa

Trofaktorijalna ANOVA analiza je korišćena za ispitivanje uticaja testiranih antagonista i vremena njihove aplikacije (pre inokulacije listova sa suspenzijom spora ili nakon) na smanjenje nekroze lista uzrokovane patogenima *A. brassicae* i *A. brassicicola*. Analizirane vrednosti imale su normalnu raspodelu kako je Šapiro Vilko-v test potvrdio ($P > 0,05$), i nisu zabeležene outlajer vrednosti. Takođe, prema Leven-ovom testu podaci su pokazali da je varijansa među grupama jednaka. Interakcija između vremena aplikacije, vrste patogena i vrste antagonista nije bila statistički značajna ($F_{1;28}=0,088$, $P=0,769$). Statistički značajna interakcija dva faktora pokazana je između patogena i antagonista ($F_{1;28}=7,402$ i $P=0,011$), patogena i vremena inokulacije ($F_{1;28}=24,528$ i $P=0,012$) kao i između antagonista i vremena inokulacije ($F_{1;28}=18,050$, $P=0,01$).

5. DISKUSIJA

5.1. Simptomi koje izazivaju patogene vrste roda *Alternaria* na kupusnjačama i učestalost javljanja

Tokom četvorogodišnjeg perioda opservacije, u zasadima ekonomski najznačajnijih vrsta kupusnjača u Srbiji detektovani su simptomi lisne pegavosti i identifikovani su uzročnici: *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae*. Prema literaturnim podacima dimenzije pega na listovima kupusnjača u Kanadi i Italiji izazvane patogenim *Alternaria* spp. varirale su od 0,5 cm do 3,2 cm dok su pege na starijem lišću bile i do 7,5 cm, što odgovara veličini pega izmerenim u Srbiji (1,0-4,5 cm) (Mac Kinon i sar., 1999; Garibaldi i sar., 2011;). Sličan opis razvoja simptoma na kupusnjačama tokom različitih faza sazrevanja biljaka su detektovani i na Indijskom poluostrvu (Saharan i Mehta, 2002; Singh i sar., 2012).

Mnogi autori saopštavaju da su simptomi koje izaziva *A. brassicae* najčešće svetlijih nijansi braon ili sive, dok su pege uzrokovane patogenima *A. brassicicola* i *A. japonica* uglavnom mrke boje (Khan i sar., 2010; Meena i sar., 2010). Ovaj opis potvrđuju proučavanja *Alternaria* spp. na kupusnjačama u Kanadi, Japanu i Americi i koja ističu da su mrke lezije koje izaziva *A. brassicicola* posledica obrazovanja mase spora na površini lezije, ali i delovanja toksina koji se oslobađaju za vreme germinacije patogenih propagula na površini lista (Bains i Tewari, 1987; Otani i sar., 1998; Babadoost i sar., 1993). Opisi simptoma *A. alternata* i *A. arborescens* na citrusima i borovnici ukazuju da su pege koje ove vrste izazivaju iako iste boje manjeg dijametra (0,3 cm do 1,7 cm), što je uočeno i na listovima kupusnjača u Srbiji (Peever i sar., 1999; Hudec i Rohačik, 2002; Zhu i Xiao, 2015). Međutim, iako je sličan izgled simptoma uočen i u zasadima kupusnjača u Srbiji, na osnovu izgleda simptoma u polju ne može se izvršiti pouzdana identifikacija *Alternaria* patogena. Rezultati Verma i Saharan (1994) ukazuju da ne postoje razlike u izgledu nekrotičnih lezija na listovima različitih domaćina iz fam. Brassicacea inficiranih *Alternaria* spp. što je potvrđeno i u ovoj disertaciji. Iako Schwartz i sar. (2004) opisuju postojanje nekrotičnih pega sa ljubičastim ivicama na listovima kanole, takvi simptomi nisu primećeni na listovima ispitivanih kupusnjača u Srbiji.

Učestalost javljanja *Alternaria* patogena u Srbiji na uljanoj repici bila je veća (26-43%) nego što je zabeležio Harrison (1989) na uljanoj repici za region Alberte u Kanadi (2-24%). Za 89 pregledanih zasada kupusa i kelja u Keniji, Rop i sar. (2009) navode učestalost javljanja *Alternaria* spp. na kupusu oko 54%, što je slična vrednost uočena na biljkama kupusa u južnoj Srbiji (58%). U istoj studiji, učestalost javljanja *Alternaria* patogena na kelju bila je 49% što je nešto više nego što je izmereno u Srbiji (21-28%). U Brazilu, Michereff i sar. (2009) navode da je učestalost javljanja *A. brassicae* u zasadima kineskog kupusa oko 66,7% dok je za zasade glavičastog kupusa i brokolija samo 16,7%, što je u rasponu učestalosti javljanja simptoma na kupusnjačama u Srbiji (14-51%). Veliki broj studija širom sveta, uključujući Indiju (Kolte i sar., 1987), Bangladeš (Meah i sar., 1988), Kanadu (Conn i sar., 1989) i Australiju (Al-Lami i sar., 2019), kao i u evropske zemlje kao što su Francuska (Brun i sar., 1987), Velika Britanija (Vloutoglou i sar., 1999), Poljska (Sadowski i sar., 2003), Švajcarska i Danska (Petraitiene i sar., 2010), opisuju lisnu pegavost izazvanu vrstama roda *Alternaria* kao ekonomski značajnu bolest na kupusnjačama sa visokom učestalošću javljanja u godinama kada su pogodni meteorološki uslovi. Međutim, u Švedskoj, Nemačkoj i Holandiji vrste ovog roda nisu zabeležene kao značajna pretnja u proizvodnji kupusnjača (Bromand, 1990).

Radovi koji po prvi put saopštavaju prisustvo patogenih *Alternaria* vrsta na kupusnjačama u Srbiji predstavljaju rezultate istraživanja ove doktorske disertacije. Tako su prvi rezultati proučavanja simptoma lisne pegavosti na renu i identifikacija prouzrokovala

kao i pojava i karakterizacija vrsta *Alternaria* povezanih sa bolešću uljane repice u Srbiji publikovani u radovima Blagojević i saradnika (2015; 2020a; 2020b). Saharan i sar. (2016) navode *A. brassicae*, *A. brassicicola* i *A. alternata* kao patogene kupusa rasprostranjene širom sveta, od kojih je *A. brassicae* najrasprostranjeniji i ekonomski najvažniji patogen, što je u korelaciji sa dobijenim rezultatima proučavanja u Srbiji. Pregledom publikovanih rezultata iz Indije, Kine, Brazila, Australije i drugih glavnih proizvodnih regiona kupusnjača može se zaključiti da su znatno brojnije studije koje kao glavne uzročnike navode jednu ili svega nekoliko vrsta *Alternaria* među kojima su *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica* i *A. alternata* (Saharan i sar., 2016; Conn i sar., 1989; Al-Lami i sar., 2019; Reis i Boiteux, 2010; Ganibal i Gasich, 2009). Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji koji kao uzročnike lisne pegavosti kupusnjača navode 8 vrsta roda *Alternaria* pripadaju grupi malobrojnih studija, koje dokumentuju prisustvo više vrsta roda *Alternaria* na kupusnjačama kao što je istraživanje u Australiji, gde je pored 5 vrsta identifikovanih i u Srbiji (*A. brassicae*, *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. malvae*) zabeleženo prisustvo još 5 vrsta (*A. conjuncta*, *A. ethzedia*, *A. eureka*, *A. hordeicola* i *A. infectoria*) (Al-Lami i sar., 2019).

U Srbiji, epidemija *A. brassicae* na uljanoj repici prvi put je opisana 1938. na području današnjeg Vrbasa (regija Banat) (Kovačević, 1938). Grujičić i Tomašević (1956) navode pojavu infekcije vrstom *A. brassicae* vrlo čestom u svim glavnim proizvodnim regionima uljane repice u Srbiji. Mnogo kasnije, Ivanović i Ivanović (2001) opisuju *A. brassicae* i *A. brassicicola* kao najčešće i najvažnije patogene kupusnjača u Srbiji. Iste vrste Antonijević i Mitrović (2007) navode kao jedne od najštetnijih prouzrokovaca bolesti lista uljane repice u Srbiji. Kasniji radovi predstavljaju *A. brassicae* kao najznačajnijeg patogena uljane repice i kupusa (Marjanović-Jeromela i sar., 2008; Vlajić i sar., 2016). Zanimljiv je podatak da je *A. brassicae* prijavljena i na korovskoj vrsti *Amarathus retroflexus* koja je značajan vektor ovog patogena i može ugroziti proizvodnju rukole (*Eruca vesicaria*) u Srbiji (Knežević i sar., 2010). Osim na kupusnjačama, *A. brassicicola* i *A. alternata* izolovane su iz ječma (Škrinjar i sar., 2005) dok su *A. alternata* i *A. arborescens* detektovane kao česti patogeni na semenu i biljkama strnih žita u Srbiji (Ivanović i Ivanović, 2001; Balaž i sar., 2001). Pored navedenih biljaka *A. alternata* je izolovana sa još nekoliko domaćina: kima i anisa, celera, jabuke i nevena (Bulajić i sar., 1996; Ristić i sar., 2010; Grahovac i sar., 2011; Ristić i sar., 2014; Blagojević i sar., 2014).

5.2. Pouzdanost morfoloških kriterijuma za identifikaciju vrsta roda *Alternaria*

Mnogi autori, među kojima su Andersen i sar. (2001, 2002) i Peever i sar. (2004), navode da su morfološke karakteristike vrsta roda *Alternaria*, zbog velike plastičnosti i preklapanja karakteristika konidija između vrsta, nepouzdan parameter za identifikaciju. Međutim, radovi Serdani i sar. (2002), Simmons (2007), Andersen i sar. (2009) i Polizzotto i sar. (2012) idu u prilog tezi da se na osnovu veličine i izgleda konidija, prisustva i dužine vrata, septiranosti i načina katenulacije konidija (stepen i način trodimenzionalne sporulacije) mogu definisati morfološki kriterijumi na osnovu kojih je moguće izvršiti identifikaciju vrsta unutar roda *Alternaria*. Tako, izolati sa kupusnjača u Srbiji su na osnovu morfoloških karakteristika podeljeni u 8 grupa koje su prema ključu Simmons (2007) identifikovane kao: *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae*.

Proučavanja dimenzija konidija *A. brassicae* izolovanih sa uljane repice i *Crambe abyssinica* u Australiji sugerišu da dužina spora varira od 105 do 211 µm i 20 do 30 µm širine, sa velikim brojem transverzalnih septi (11-15) i od 0-3 longitudinalne septe (Bock i sar., 2005; Al-Lami i sar., 2019). Istraživanja *A. brassicicola* na kupusu u Iranu navode da se konidiogeni aparat ove vrste sastoji od konidiofora dužine do 125 µm, na kojima se spore

nalaze u formi dugih lanaca, i da dimenzije konidija variraju od 20 μm do 48 μm dužine, i od 8 μm do 12 μm širine (Rahimloo i sar., 2015). Istraživanja morfoloških karakteristika *A. brassicicola* izolovanih sa različitih vrsta kupusnjača na Tajlandu, useva karfiola u Indiji i sa semena kupusa u Japanu navode slične vrednosti dimenzija konidija, od 13 do 44 μm dužine odnosno od 8 do 21 μm širine (Pattanamahakul i Strange, 1999; Kubota i sar., 2006; Deep i Sharma, 2012). U skladu sa navedenim istraživanjima su i morfološki opisi izolata *A. brassicicola* sa *Crambe abyssinica* u Brazilu, *Thlaspi arvense* u Americi i *Orychophragmus violaceus* u Kini (Cobb i sar., 1998; Macagnan i sar., 2010; Guo i sar., 2019). Poređenjem rezultata može se zaključiti da morfološke karakteristike konidiogenih aparata *A. brassicae* i *A. brassicicola*, izolovanih kako sa kupusnjača tako i sa drugih domaćina širom sveta, su u korelaciji sa morfološkim karakteristikama konidija ovih vrsta u Srbiji. Međutim, poređenjem srpskih izolata sa dimenzijama konidija *A. brassicicola* opisanih u monografiji još davne 1947. godine (Wiltshire, 1947) uočeno je odstupanje, spore izolata iz Srbije su manjih dimenzija.

Dimenzije konidija *A. japonica* sa kupusnjača u Srbiji (37,2-84,9 μm x 15,4-29,1 μm) bile su u korelaciji sa dimenzijama konidija ovog patogena koji izaziva lisnu pegavost na rotkvi u Španiji (32,0-78,0 μm x 13,0-24,0 μm) i rukoli u Kaliforniji (30,0-69,0 μm x 12,5-20,0 μm) (Basimba i sar., 2013; Tidwell i sar., 2014). Međutim, zabeležena su i odstupanja u veličini konidija u odnosu na izolate iz ove disertacije, kao što su nešto manje dimenzije konidija izolata sa divlje i kultivisane rukole u Italiji (17,7-56,2 μm x 6,6-17,8 μm) i nešto veće dimenzije konidija ove vrste sa semena kineskog kupusa u Kini (43,5-85,2 μm x 21,5-28,0 μm) (Garibaldi i sar., 2011; Ren i sar., 2012; Siciliano i sar., 2017).

Morfološke osobine konidija *A. alternata* i *A. arborescens* se zbog svoje plastičnosti, potvrđene od strane mnogih autora, ne uzimaju kao pouzdani parametri za identifikaciju. Andrew i sar. (2009) navode da je 31% testiranih sitnospornih *Alternaria* izolata sa jabuke različito identifikovano između dve laboratorije. U istom radu, obrasci sporulacije određenog broja izolata nisu mogli biti jasno okarakterisani pa su proglašeni za mešoviti tip, *A. alternata*-*A. tenuis*-*A. arborescens*. Izolati *A. alternata* u našoj studiji nisu pokazali variranje ispitivanih karaktera koji bi ukazali na postojanje morfoloških grupa unutar vrste. Dimenzije konidija su bile vrlo slične opisima izolata *A. alternata* sa kupusnjača u Italiji (15,4-36,8 μm x 5,1-12,4 μm) (Siciliano i sar., 2017) i sa uljane repice u Australiji (25,2-27,6 μm x 6,7-8,2 μm) (Al-Lami i sar., 2019). Slični morfološki opisi *A. alternata* grupe navode se i sa drugih domaćina, kod izolata krompira u Južnoj Africi (van der Waals i sar. 2004), nara u Izraelu (Ezra i sar., 2010) i sa spanaća u Poljskoj (Czajka i sar., 2015). Za vrste *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae* ispitivani morfološki parametri bili su slični referentnim izolatima, ali za poređenje sa drugim izolatima u svetu podaci nisu bili dostupni.

5.3. Fiziološke osobine *Alternaria* spp.

5.3.1. Značaj sastava podloge na rast i sporulaciju

Već je dobro poznato da sastav hranljive podloge za gajenje gljiva može uticati na morfologiju kolonija, rast micelije kao i na formiranje specifičnih reproduktivnih i drugih struktura. Proučavanja uticaja supstrata na morfologiju i fiziologiju *Alternaria* vrsta su malobrojna i uglavnom su vezana za vrstu *A. alternata*. Zbog velikog broja različitih faktora (uslovi vlažnosti, jačine, tipa i trajanja svetlosti, starosti ispitivanih kultura itd.) koji su uticali na proučavane morfološke karakteristike izolata *Alternaria* spp. nije moguće poređenje rezultata kroz istoriju. Zbog toga, proučavani morfološki karakteri u ovoj studiji su samo donekle uporedivi sa navodima drugih autora.

Izgled micelije

Boja micelije *Alternaria* vrsta nije se pokazala kao pouzdan karakter za identifikaciju. Kako se navodi u nekim od prvih opisa ove vrste, radu Keissler (1912), kolonije *A. alternata* se mogu javiti u različitim nijansama sive boje (Rottem, 1994). Mishra i sar. (2012) sugerišu da boja kolonija *A. alternata* varira u zavisnosti od hranljive podloge, pa je na Ričardsonovoj podlozi beličasta, pamučaste teksture, dok je na PDA, OA, MA i V8 sivkaste boje i vazdušasta. U poređenju sa ovim, kolonije srpskih izolata na svim testiranim hranljivim podlogama bile su, čak i na istoj podlozi, značajno varijabilnije i po boji (zelena, siva i braon) i teksturi (pamučasta i vazdušasta). Pusz i sar. (2009) navode da su izolati *A. alternata* sa *Amarathus retroflexus* imali sivu ili zelenu boju micelije na PDA podlozi, što je bio slučaj i sa srpskim izolatima, dok Rai i Kumari (2009) za istu vrstu na istoj podlozi beleže zelenu do mrku boju kolonija. Istraživanja Narain i sar. (1985) i Deshmukh i sar. (1998) navode da boja micelije izolata *A. alternata* sa nara, lubenice i čilija varira između sivkaste, zelene i braon. Vrlo uticajni istraživači Hong i sar. (1995), Pryor i Michailides (2002), Rotondo i sar. (2012), i Zhu i Xiao (2015) ističu da se na osnovu boje kolonije (siva ili nijanse zelene) na PDA može ustanoviti razlika između *A. alternata*, *A. tenuissima* i *A. arborescens* izolata, što u ovoj studiji nije bilo moguće – naime tekstura, boja i izgled ivične linije se pokazao izrazito varijabilan na PDA podlozi.

Stopa rasta

Stopa rasta ispitivanih izolata *Alternaria* spp. pokazala se najviše pod uticajem sastava hranljive podloge, u poređenju sa svim drugim ispitivanim karakteristikama. Rezultati analize rasta izolata *A. brassicae* na različitim podlogama su kontradiktorni. Dok Ansari i sar. (1988) sugerišu da je PDA medijum optimalan za razvoj kolonija, Deshpande i sar. (2002) ukazuju da se sa ponovljenom kultivacijom *A. brassicae* na ovom medijumu, gubi sposobnost rasta i sporulacije. Rezultati proučavanja *A. brassicae* sa kupusnjača u Srbiji slažu se sa rezultatima Degenhardt (1982) da V8 medijum značajno stimuliše rast i razvoj kolonija ove vrste. Najbrži rast kolonija *Alternaria* spp. sa kupusnjača u ovim istraživanjima zabeležen je za *A. alternata* i *A. arborescens* na V8 i PDA (7,2 mm dan⁻¹ i 7,0 mm dan⁻¹). Tako, Sofi i sar. (2013) navode da je stopa rasta *A. alternata* izolata sa jabuke na PDA od 5,9 mm dan⁻¹ do 8,2 mm dan⁻¹ što je u korelaciji sa rezultatima ove studije, dok je stopa rasta iste vrste sa *Amarathus retroflexus* na PDA nešto manja nego što je izmereno za srpske izolate (Pusz i sar., 2009). Poređenjem rasta kolonija *A. alternata* sa borovnice (Zhu i Xiao, 2015) i kupusnjača može se zaključiti da su izolati sa borovnice imali sličnu stopu rasta kao i izolati sa kupusnjača na V8 hranljivom medijumu. Izolati *Alternaria* spp. sa kupusnjača najsporije su rasli na CZ medijumu, što nije bio slučaj sa stopom rasta izolata *A. alternata* sa geranijuma (Ghanem i sar., 2011). Slični rezultati uticaja hranljivog medijuma na rast kolonija zabeleženi su i za još neke vrste roda *Alternaria*. Tako se PDA hranljiva podloga pokazala optimalna za rast *A. solani*, *A. sesami* i *A. helianthi* (Mohaparta i sar., 1977; Allen i sar., 1983; Koley i sar., 2015).

Intenzitet sporulacije

Jedan od najčešće korišćenih medijuma za izolaciju i gajenje različitih vrsta gljiva je PDA koji sadrži skrob koji gljive lako metabolišu što povoljno utiče na brzinu rasta micelije, ali sa druge strane kod nekih vrsta onemogućava sporulaciju (Stevens i sar., 1981). Ovaj zaključak nije u skladu sa rezultatima naših istraživanja, gde je umereni ili obimni intenzitet sporulacije potvrđen za sve ispitivane *Alternaria* spp, što je dokumentovano i u mnogim drugim studijama (Saeed i sar., 1995; Maheshwari i sar., 1999; Khodke i sar., 2000; Hait i sar., 2002; Pandey i sar., 2006; Gorawar i sar., 2006). Osim na PDA, drugi autori navode da *A. alternata*, ali i *A. dauci* i *A. solani*, najbolje sporulišu na siromašnom S-medijumu (Shahin i Shepard, 1979; Dhingra i Sinclair, 1985; Rotem, 1994; Masangkay i sar., 2000). Kao

stimulativnu podlogu za sporulaciju *A. brassicae* izolata, Neergard (1945) i Atkinson (1950) predlažu MA, međutim u našim istraživanjima MA, u poređenju sa drugim hranljivim podlogama se pokazala kao najnepovoljnija za sporulaciju svih proučavanih vrsta, pa tako i *A. brassicae*.

Karakteristike konidija

Građa konidiofora i diktiospora vrsta roda *Alternaria* su dugi niz godina bili važni karakteri za razlikovanje vrsta, ali danas znamo da ovi karakteri nisu uvek pouzdani. Misaghi i sar. (1997) beleže razlike u dužini vrata konidija *A. alternata* gajenih na PDA i CMA hranljivim podlogama u odnosu na dužinu istih u prirodi. Isti autori saopštavaju da je izdvajanje 7 tipova konidija u kulturi *A. tenuis* (*A. alternata*) od strane Neergard (1945) rezultat kultivacije na različitim medijumima i da tolika varijabilnost u izgledu konidija nije prisutna u prirodi na domaćinima. U našoj studiji, kod proučavanih izolata *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi* *A. nepalensis* i *A. malvae* na različitim podlogama nisu zabeležena statistički značajna odstupanja u dužini konidija i vrata konidija, dok su kod *A. brassicae* odstupanja ovih karaktera bila značajna. Oblik spora ovih izolata na MA je bio više eliptičan, pa je dužina konidija i vrata konidija bila značajno manja nego na V8. Iste zaključke su izveli i Singh i sar. (2015) koji ističu veliku varijabilnost 37 izolata *A. brassicae*, gajenih na PDA, izolovanih sa slačice u Indiji. Veliki broj autora iz Indije se bavio analizom dimenzija spora iste vrste na PDA i sugerišu postojanje "rasa" među izolatima iz različitih geografskih regiona (Kolte i sar., 1987; Meena i sar., 2005; Kaur i sar., 2007; Sharma i sar., 2014; Pramila i sar., 2014). Međutim, morfološka varijabilnost konidija *A. brassicae* izolata iz različitih geografskih regiona u Srbiji nije detektovana. Treba istaći da osim navedenih osobina konidiogenog aparata, način granjanja konidiofora i broj konidija na konidioforima su takođe važni karakteri za identifikaciju vrsta ovog roda i da se značajno razlikuju na PDA, MA i CZ u odnosu na V8 podlogu. Na osnovu svega iznetog, može se zaključiti da je za identifikaciju vrsta roda *Alternaria*, prema Simmons (2007), pogotovo za vrstu *A. brassicae* neophodna standardizacija na V8 podlozi, što nije uvek jednostavno zbog teže dostupnosti V8 soka koji je neophodan za njeno pravljenje.

5.3.2. PCA analiza

U ovoj disertaciji, PCA analiza izdvojila je promenljive koje najviše doprinose varijabilnosti ispitivanih izolata, odnosno ukazala je na sličnosti i razlike u odgovoru pojedinih vrsta ili grupa izolata na uticaj temperature. Druge studije o uticaju temperatura na različite aspekte razvoja vrsta roda *Alternaria* su ograničene.

Rast i sporulacija izolata

Optimalna temperatura za rast i sporulaciju *A. brassicae* izolata iz Srbije bila je 15-20 °C što je u korelaciji sa istraživanjima u Francuskoj (15-22 °C) i Indiji (15-22 °C) (Louvet i sar., 1958; Saharan i sar., 2016). Nešto više optimalne temperature za ovu vrstu izmerene su za izolate sa uljane repice i kupusa u Velikoj Britaniji (18-23 °C) i za izolate sa kupusnjača na Filipinima (16-24 °C) (Lapis i Ricaforte, 1974; Humpherson i Jones, 1989). Rast izolata *A. brassicae* sa uljane repice u Srbiji, odstupao je od izmerenih vrednosti za izolate sa drugih kupusnjača u Srbiji (20-25 °C) ali je pokazao sličnost sa istraživanjima na kupusnjačama u Indiji (22 °C), Holandiji i Kanadi (20-24 °C) (Van Shreven, 1953; McDonald, 1959; Verma i Saharan, 1994). Sa druge strane, Changsri i Weber (1963) navode da su optimalne temperature za rast *A. brassicae* u *in vitro* uslovima na PDA podlozi iznosile 24-28 °C, što je značajno više od vrednosti zabeleženih tokom ovih istraživanja.

Optimalne temperature dobijene tokom testiranja izolata *A. brassicicola* sa kupusnjača u Srbiji su potvrdile ranije rezultate McDonald (1959) i Degenhardt i sar. (1982) koji

zaključuju da su za razvoj *A. brassicicola*, neophodne više temperature nego što je to slučaj za *A. brassicae*. Changsri i Weber (1963) kao optimalne temperature za rast *A. brassicicola* beleže interval od 24-28 °C, a Sarkar i Gupta (1978) 25-27,9 °C, što nije mnogo viša temperatura u odnosu na 20-25 °C, koliko je zabeleženi opseg za srpske izolate. Kada je u pitanju intenzitet sporulacije, Saharan i sar. (2016) navode da je maksimum, za ovu vrstu, izmeren na temperaturama od 17-30 °C.

Kada su u pitanju izolati *A. japonica* sa kupusnjača u Srbiji, optimalna temperatura za rast je dosta ujednačena i kreće se u rasponu od 20 do 25 °C što potvrđuju i radovi Changsri i Weber (1963).

Kao što je istaknuto u rezultatima, među izolatima *A. alternata* uočene su razlike u stopi rasta, sporulaciji i karakteristikama konidija, na osnovu čega su podeljene u dva klastera. Najveća stopa rasta izmerena je na 25 °C za izolate svrstane u klaster 4, gde je zabeležen i najširi interval u odnosu na druge ispitivane vrste (20-30 °C), dok su izolati iste vrste iz klastera 5 najbrži rast imali u intervalu 25-30 °C. Czyżewska (1970) takođe navodi postojanje razlika u optimalnim temperaturama za rast tri grupe *A. alternata* izolata sa *Crambe abyssinica*, gde su optimalne temperature za sporulaciju prve grupe 17-35 °C, druge 20-30 °C, a treće oko 15 °C.

Dužina konidija

Analizom uticaja temperature na dužine konidija ispitivanih vrsta *Alternaria* uočeno je da je dužina konidija na nižim temperaturama veća i da se sa povećanjem temperature dužina konidija smanjuje. Do istog zaključka su došli i Abbas i sar. (1995) koji navode da su spore *A. helianthi* na 18 °C bile značajno veće od izmerenih dužina na 30 °C. Ovi autori takođe ističu da su duže konidije brže ulazile u fazu germinacije zbog čega su bile infektivnije od spora koje su produkovane na 22, 26 i 30 °C. Razlog ovome je veća metabolička aktivnost u konidiji na nižim temperaturama što se može utvrditi merenjem količine polisaharida i aktivnosti enzimskih komponenti u konidijama. Do sličnih rezultata su došli i Misaghi i sar. (1978) proučavajući uticaj temperature na morfologiju konidija kod *A. alternata*, i Humpherson i Jones (1989) za *A. brassicae* i *A. brassicicola*. Obrazovanje krupnijih konidija na nižim temperaturama potvrđeno je i za vrste drugih rodova koji su srodni rodu *Alternaria* kao što je *Helminthosporium* (Humpherson i Jones, 1989).

5.3.3. Značaj *in vitro* testiranja temperature

Imajući u vidu da se glavni regioni gajenja kupusnjača, kao što su Kina, Indija, Kanada, Evropa, Australija i Sjedinjene Američke Države, nalaze u vrlo različitim klimatskim zonama i uslovima gde uspevaju prilagođeni kultivari i sorte, može se očekivati da broj vrsta, pojava bolesti i intenzitet javljanja određenih patogenih gljiva varira između različitih oblasti i godina (Al-Lami i sar., 2020). Temperatura, pored vlažnosti, predstavlja jedan od najvažnijih faktora koji utiče na distribuciju, rast i reprodukciju patogenih gljiva kako je to već pokazano za različite vrste roda *Alternaria* kao što su *A. porri*, *A. helianthi*, *A. cirsinoxia*, ali i *A. brassicae* i *A. brassicicola* (Degenhardt i sar., 1982; Green i Bailey, 2000; Al-Lami i sar., 2020). Rezultati *in vitro* ispitivanja uticaja temperature na patogene *Alternaria* spp. sa kupusnjača u Srbiji sugerišu da su vrste različito adaptirane na ekološke uslove. Tako *A. brassicicola* ima najintenzivniji rast i sporulaciju u opsegu 20-25 °C, dok *A. brassicae* ima slabiju sporulaciju u optimumu 15-20 °C i veliku plastičnost građe spora. Naime, u Srbiji na zasadima kupusastog povrća, tokom letnjih meseci, kada srednje mesečne temperature iznose od 17-27 °C, *A. brassicicola* se pokazala kao dominantno izolovana vrsta iz obolelih biljaka, čak 76%. Tokom, jesenjih meseci (septembra i oktobra), kada su srednje mesečne temperature znatno niže, 12-23 °C, *A. brassicae* bila je dominantno izolovana vrsta (70%). Na osnovu intenziteta razvoja simptoma na listovima, sezonska variranja u zastupljenosti ovih patogena nisu se mogla uočiti. Treba napomenuti da jedino u slučaju uljane repice ovaj trend nije primećen. Razlog za

ovo odstupanje je najverovatnije kratka vegetaciona sezona uljane repice, gde srednje mesečne temperature nisu dovoljne da uslove razlike u adaptaciji patogena. Takođe, u polju je zabeleženo da je razvoj bolesti najintenzivniji za vreme cvetanja biljaka, kada su i temperature i količina padavina relativno visoke, dok tokom hladnijih meseci simptomi su uglavnom retki i lokalizovani na donjem lišću što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u *in vitro* istraživanjima. Važno je istaći da proučavanja epidemioloških aspekata, poput distribucije i zastupljenosti određenih vrsta patogena u regionu, zasadima i tokom različitih meseci, su neizostavna za efikasnu primenu preventivnih mera i fungicida (Shrestha i sar., 2005).

5.4. Razlike u patogenosti studiranih vrsta roda *Alternaria*

Kao glavni patogeni kupusnjača u Srbiji pokazale su se vrste *A. brassicicola*, *A. japonica* i *A. brassicae*, što su bili i rezultati istraživanja i Meena i sar. (2010) na Indijskom poluostrvu i Nowakowska i sar. (2019) u Poljskoj.

U testu patogenosti *A. alternata* izdvojila se grupa od 8 izolata sa uljane repice, 7 sa kupusa, 3 sa karfiola i 1 sa brokolija za koje je ustanovljeno da nisu patogeni. U skladu sa ovim, veliki broj autora navodi dualnu prirodu *A. alternata* koja se u prirodi javlja i kao saprob i kao parazit. Neki radovi navode da patogenost ove vrste često zavisi od prisustva različitih činilaca u prirodi kao što su klimatski faktori, razvojni stadijum biljke ili prisustva drugih patogena u prirodnim epidemiološkim uslovima koji su neophodni za proces patogeneze (Tohyama i Tsuda, 1995; Pryor i Michailides, 2002; Kubota i sar., 2006; Michereff i sar., 2012; Rotondo i sar., 2012).

Patosistem *A. alternata* i citrusa predstavlja jedan od najbolje proučenih odnosa patogen-domaćin i na njemu se može bolje razumeti kako se ostvaruje dualna priroda *A. alternata*. Pretpostavlja se da je prvobitni, „originalni“ soj *A. alternata* slab, nespecifični, patogen koji može izazvati slabe simptome samo na starim ili oštećenim delovima citrusa (Rottem, 1994). Prvi put 1962. prijavljen je novi soj *A. alternata* izrazito patogen za novi kultivar mandarine (*Citrus reticulata*) u Australiji (Kiely, 1964). Pokazalo se da filtrat kulture ovog patogena izaziva nekrozu tkiva samo kultivara sa kog je izolovan, ne i za limun i druge citruse. Drugi virulentni soj ove vrste registrovan je 1974. na Floridi inficirajući ponovo samo jedan soj mandarine sa kog je izolovan (*Dancy mandarine*) (Peever i sar., 2004). Međutim, u istom zasadu izolovan je i soj koji je bio patogen samo za biljke limuna (*C. jambhiri*), ne i za navedeni soj mandarine. U svim slučajevima, filtrat kolonija virulentnih izolata pokazivao je patogenost, na osnovu čega je potvrđeno prisustvo toksina specifičnih za domaćina (Pegg, 1966; Whiteside, 1976). Istraživanja u Japanu sprovedena na 67 različitih kultivara i hibrida citrusa izdvojila su dva soja *A. alternata* od čega je jedan pokazao patogenost samo za dva kultivara limuna i jedan kultivar limete, dok je drugi soj izolovan sa mandarine bio patogen za 28 drugih kultivara uključujući grejpfrut, mandarinu, tangelo i tangerinu (Tsuge i sar., 2013). Na osnovu ovih zapažanja autori su zaključili da se osetljivost biljke domaćina na dejstvo specifičnog toksina prenosi dominantno i na ukršteni genotip potomstva. Identifikovana su dva patotipa *A. alternata* na citrusima, prvi koji produkuje ACT specifični toksin neophodan za infekciju kultivara mandarine, i ACRL toksin neophodan za infekciju limuna. Patotip *A. alternata* na mandarini pokazao je srodnost sa patotipom *A. alternata* koji se javlja na breskvi i kruški (Huang i sar., 2014). Specifični patotip ove vrste prvi put je registrovan u Australiji, da bi se kasnije širio na sve oblasti gajenja citrusa (Peever i sar., 2004).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja pretpostavlja se da u populacijama nespecifičnih, slabih patogena, mali broj sojeva *A. alternata*, usled mutacije, ima sposobnost produkcije specifičnih toksina za domaćina (različita hemijska jedinjenja u rasponu od nisko molekularnih peptida do cikličnih peptida) na koji je genotip domaćina tolerantan. Intenzivna poljoprivreda i uvođenje novih osetljivih genotipova u monokulturi podstiče povoljne uslove

za umnožavanje ovih mutantnih genotipova patogena i njihovo širenje na nove osetljive kultivare. Rotem (1994) takođe navodi da je ovaj proces reverzibilan, da se patogenost određenog soja može izgubiti, pogotovo u kulturi.

McDonald i Ingram (1986) i Meena i sar. (2010, 2016) navode da biljke uljane repice pokazuju različitu osetljivost na filtrat kultura *A. brassicae* izolovanih sa kupusnjača iz različitih geografskih oblasti Indije, što ukazuje na postojanje specifičnog toksina koji produkuje ova vrsta. Thomma (2003) takođe navodi da je postojanje specifičnog toksina ključno za patogenezu *A. brassicae*. Saopšteno je da izolati *A. brassicae* koji potiču iz oblasti Indije, u kojima je zaraza uljane repice ovim patogenim vrlo učestala i jaka, u testu patogenosti pokazuju veću agresivnost od drugih izolata, prema svim biljkama iz fam. Brassicaceae (Meena i sar., 2016) što nije bio slučaj u našoj studiji.

Osetljivost pojedinih domaćina na patogene vrste roda *Alternaria* može zavistiti od jedinjenja koje produkuje biljka, kao što su to fitoaleksini i biljni hormoni. Na osetljivost biljaka takođe može uticati i količina i raspored epikutikularnog voska i prisustvo različitih trihoma na listu. Produkcija fitoaleksina je već ranije utvrđena za rotkve inficirane *A. alternata* u Indiji (Kulshreshtha i Chauhan, 1985). Conn i sar. (1988) čak navode da različiti kultivari repe u Kanadi pokazuju različitu osetljivost na infekciju *A. brassicae*, pri čemu su oni rezistentiji produkovali više fitoaleksina. Takođe je utvrđeno da količina fitoaleksina koje biljka produkuje u odbrani od infekcije raste kako raste koncentracija inokuluma na listu (Jejelowo i sar., 1991). Dokazano je da u koevoluciji patogena sa biljkama, određene gljive mogu proizvoditi enzime koji imaju funkciju u razgradnji fitoaleksina biljke domaćina (Tal i Robeson, 1986). Tako patogen *A. helianthi* može razgrađivati fitoaleksine suncokreta čime slabi otpornost domaćina (Lou i sar., 2013). Isti autori navode kako *A. macrospora* i *A. chrysanthemi* iako nisu originalno patogeni suncokreta imaju enzime koji su sposobni da razgrade fitoaleksin suncokreta i izazovu infekciju. Objašnjenje leži u činjenici da je *A. chrysanthemi* genetički vrlo bliska *A. helianthin*, dok biljke pamuka koje inficira *A. macrospora* produkuju sličnu grupu fitoaleksina kao suncokret. Za razliku od ovih vrsta, *A. brassicicola* sa kupusa za koju se pokazalo da nije patogena za suncokret, ne sintetiše odgovarajuće enzime. Wang i sar. (2009) navode kako prisustvo salicilne kiseline, biljnog hormona, igra vrlo važnu ulogu u receptivnosti biljaka kupusa za *A. brassicicola*.

Sa istim ciljem zaštite, različite vrste biljaka, različiti kultivari, čak i različiti listovi na istoj biljci mogu proizvoditi različite količine i vrste epikutikularnog voska koji čine list vrlo hidrofobnim (Forster, 1977). Ulogu voska u zaštiti od patogena su potvrdili Conn i Tewari (1989) koji su pokazali da rezistentni kultivari uljane repice i slačice sadrže više voska. Osim što vosak sprečava zadržavanje vlage on onemogućava klijanje konidija i razvoj germinativnih cevčica infektivnih propagula. Ovi navodi su potvrđeni za *Alternaria* izolate sa duvana, pamuka, suncokreta, luka i paradajza (Stavely i Slana, 1971; Conn i Tewari, 1988; Rottem, 1994; Everts i Lacy, 1996; Deep i Sharma, 2012; Pusztahelyi i sar., 2015; Nowakowska i sar., 2019). Takođe je poznato da paradajz koji pre skladištenja prođe proces tretmana toplom vodom, usled skidanja voska sa površine ploda postaje osetljiv za *A. alternata* (Barkai-Golan i Kopeliovitch, 1989).

Na svim domaćinima, ispitivane vrste bile su patogenije kada su inokulisane na prethodno oštećeno lisno tkivo. Ovo je u skladu sa navodima Skiles i sar. (1953) za patogenost izolata *A. porri* na listovima luka. Različiti autori navode da *Alternaria* patogeni mogu inficirati zdrave listove paradajza, krompira i luka, ali zaraza dobija epidemijsku rasprostranjenost tek posle vetrova koji nanose pesak i time oštećuju površinu lista (Bock i sar., 1964; Rotem, 1965). Slično, ovi autori objašnjavaju i pojačanu prisutnost *A. alternata* na prethodno oštećenim listovima. Uticaj vetra, kiše, sunca kao i dejstvo drugih klimatskih faktora koji mogu oštetiti biljke i učiniti ih osetljivijim za infekciju zabeleženo je u Kanadi za *A. alternata* na grašku (Wollen i Sotton, 1962), u Australiji za *A. heiranthi* na suncokretu (Allen i sar., 1983), u Njujorku za *A. dianthi* na karanfilu (Bickerton, 1943). Bock i sar. (1964) takođe navode da

rezistentni kultivari luka mogu biti inficirani sa *A. porri* tek pošto je prethodno tkivo biljke oštećeno, a Saharan i sar. (2016) saopštavaju da u zasadima u kojima su zabeležena oštećenja od insekata je istovremeno primećeno povećanje simptoma lisne pegavosti na listovima mladih biljaka. Takođe, ovi autori navode da u fazi kada biljke nisu receptivne za *Alternaria* patogene, oštećenje pod dejstvom insekata predstavlja jedini način prodiranja patogena u biljku. Ovu izjavu potvrđuju asocijacije insekata *Thrips tabaci* i patogena *A. porri* u Indiji (Thind i Jhooty, 1982). Rezultati koji potvrđuju da oštećenje tkiva lista dovodi do veće osetljivosti biljke na patogene skreću pažnju na preventivne mere koje se tiču mehaničkog povređivanja kupusnjača na polju, ali i efikasne zaštite od insekata.

Treba napomenuti da su biljke u urađenom testu patogenosti pokazale mnogo veću osetljivost na ispitivane *Alternaria* spp. patogene nego što je to primećeno u zasadima na poljima u Srbiji. Kako Rotem (1994) navodi, osetljivost biljaka u polju i optimalni uslovi za razvoj bolesti su retko prisutni istovremeno, koncentracija inokuluma je uvek manja nego u laboratoriji, periodi vlažnosti su uglavnom kraći, a temperatura retko optimalna. Za očekivati je da u takvim uslovima, stopa zaraze odnosno osetljivost biljaka prema patogenu bude manja nego što je to slučaj u laboratorijskim uslovima. Tako mlade biljke krompira u polju su često otporne na infekciju sa *A. solani* koja u laboratorijskim uslovima može pokazati značajnu patogenost. Kao što je pokazano ispitivanjem patogenosti izolata vrsta *Alternaria* sa rena (Blagojević i sar., 2020a) stari listovi kupusa su osetljiviji na infekciju ovim patogenima nego mladi, što je posebno značajno za shvatanje aspekata dualne prirode patogenosti izolata *A. alternata*. Ovaj rezultat je u korelaciji sa drugim radovima koji ističu povećanu osetljivost biljaka na *Alternaria* patogene u završetku razvojne faze kao što su istraživanja *A. alternata* na krompiru (Droby i sar., 1984), *A. brassicicola* na slačici (Sarkar i Sen-Gupta, 1978; Scholze, 2002), *A. brassicae* i *A. brassicicola* na karfiolu (Kohl i sar. 2010), prokelju i kupusu (Babadoost i sar., 1993). Takođe ovi autori navode da je starost biljke od većeg značaja za nastanak infekcije nego što su to klimatski faktori.

Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju tezu da različite vrste biljaka iz fam. Brassicaceae mogu biti izvor inokuluma za razvoj lisne pegavosti pa se tako patogeni mogu prenositi u nove geografske regione, na druge vrste, varijetete i kultivare kupusnjača i uzrokovati nove epidemije. Sastav vrsta patogena može varirati u zavisnosti od godine, sezone, regije i vrste zasada.

5.5. Uticaj različitih faktora na preživljavanje i uspešnost patogena

Individualno, preživljavanje svakog patogena je određeno pre svega virulencijom (sposobnošću patogena da inficira određenu biljku domaćina) i agresivnošću (sposobnosti razvoja na biljkama domaćinima) (Burdon i sar., 1987). Mnoga istraživanja interakcije biljka-patogen ukazala su na veliku varijabilnost sposobnosti virulencije i agresivnosti patogena, kako između različitih populacija tako i unutar iste populacije patogena (Thrall i sar., 2001). Uslovi koji generišu inter- i intrapopulacijsku varijabilnost patogena su vrlo složeni, naročito u prirodnim uslovima (Thrall i Burdon, 2005). Na koevoluciju između biljaka i biljnih patogena mogu uticati biotički faktori, kao što su epidemiološki ciklusi u brojnosti patogena, genetički drift (slučajnost) koji se pritom dešava, nestajanje ili rekolonizacije određenih domaćina i genotipova, kao i selektivni pritisci koje patogen i domaćin ostvaruju jedan na drugi (Thrall i sar, 2001). U kombinaciji svih ovih faktora, različite evolutivne strategije mogu postati favorizovane u različitim populacijama što značajno može uticati na dinamiku odnosa biljka-patogen, ali i razvoj epidemija u prirodnim sistemima.

Thrall i sar. (2005) sugerišu da intrapopulacijska varijabilnost, odnosno sposobnost rasta i sporulacije individualnih izolata, određuje uspešnost kompeticije sa drugim izolatima u populaciji. Istraživanja *in vitro* su pokazala da inokulacija više različitih genotipova određene

vrste patogena na osetljive domaćine imaju za rezultat da jedna ili nekoliko patoformi (genotipova patogena) postanu dominantni kroz generacije (Thrall i sar., 2005). U prirodnim populacijama, opstanak populacije patogena sa više genotipova u kojoj nijedan genotip nije dominantan sugerise postojanje balansirane selekcije koja omogućava ukupnu varijabilnost unutar populacije. Prema tome, razlike koje postoje između različitih izolata u sposobnosti da inficiraju, rastu i da se reprodukuju na biljci domaćinu mogu biti rezultat balansa različitih strategija preživljavanja. Ovi navodi su u korelaciji sa studijama *A. brassicicola* na *Cakile maritima* kao i za druge vrste roda *Alternaria* (Thrall i sar., 2001; 2005; Thrall i Burdon, 2005). Isti autori su ispitivali i fiziološke osobine, kao što su rast i sporulacija izolata na različitim temperaturama i patogenost, i nisu našli statističke razlike između izolata unutar populacija sa istog domaćina ni za jednu ispitivanu vrstu, ali jesu između populacija izolata iste vrste sa različitih domaćina i između različitih vrsta.

Prema navodima Brasier i Webber (1987), izolati koji pokazuju veću stopu rasta *in vitro* bi trebali da budu agresivniji na biljci. Takođe, isti autori na nivou individualnih vrsta potvrđuju prethodne navode, npr. za vrstu *A. brassicicola* koja je pokazala umerenu stopu rasta i najveći intenzitet sporulacije, a ustanovljena je najveća agresivnost na svim ispitivanim domaćinima. Podaci za *A. japonica* i *A. nepalensis* takođe idu u prilog ovoj tezi, navedene vrste imaju umereni rast kolonija u kulturi, intenzivniju sporulaciju, posle *A. brassicicola*, i imaju najveću agresivnost izolata. Srpski izolati *A. brassicae* su u odnosu na druge vrste slabo rasli i sporulisali u kulturi, međutim na testiranim temperaturama dimenzije konidija su pokazale najveću sposobnost akomodacije a patogenost izolata se pokazala umerena na ispitivanim biljkama. Vrste *A. cheiranthi* i *A. malvae* pokazale su slab rast, sporulaciju i patogenost u ovim testiranjima. Kako Thrall i Burdon (2005) navode, evolutivna prednost sporog rasta micelije je što omogućava bolje prezimljavanje patogena na biljnim ostacima. Međutim, brži rast micelije pruža epidemiološku prednost jer omogućava brže i efikasnije širenje patogena u prirodnim populacijama. Primeri ove adaptivnosti se mogu uočiti i u našoj studiji, kod populacija vrste *A. brassicae* koje su pokazale veći rast i bolju sporulaciju na svim ispitivanim temperaturama kao i veću agresivnost, u odnosu na druge populacije ove vrste. Za vrste *A. malvae*, *A. nepalensis* i *A. cheiranthi*, mali broj izolata u ovoj studiji, ali i nedostatak informacija u literature, onemogućava bolji uvid u epidemiologiju ovih vrsta. Kao što rezultati sugerisu kada su u pitanju populacije *A. alternata* klaster 5 koje intenzivno sporulišu, ali nisu patogene, čitav kompleks faktora utiče na ostvarivanje optimalne adaptacije patogena.

5.6. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata *Alternaria* spp.

Na osnovu molekularnih analiza genskih sekvenci *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* dobijenih *Alternaria* izolata, potvrđeni su rezultati proučavanja morfoloških karakteristika kultura na V8 hranljivoj podlozi tj. svi izolati su podeljeni u 8 grupa.

Molekularne analize *ITS*, *GAPDH*, *Alt a1* i *ATP* genskih regiona izolata sa kupusnjača u Srbiji sa visokom *bootstrap* vrednosti su ukazali na genetičku uniformnost *A. brassicae* izolata, što dalje sugerise da promenljivost svih morfoloških karakteristika, koje su najintenzivnije bile baš za ovu vrstu, treba pripisati fenotipskoj plastičnosti karaktera, što potvrđuju i druga istraživanja (Cooke i sar., 1998). U svim dosadašnjim proučavanjima *A. brassicae* detektovan je samo jedan haplotip, isto kao i u našim istraživanjima (Jasalavich i sar., 1995; Woudenberg i sar., 2013). Iako filogenetska monofilija nije česta među vrstama roda *Alternaria*, populacije *A. brassicae* su monoklonalne: sa ne tako davnim poreklom ili uz odsustvo selektivnog pritiska u spoljašnjoj sredini (Saharan i sar. 2016). Takođe treba uzeti u obzir da iako filogenetske analize *ITS* i *GAPDH* gena nisu pokazale dovoljnu informativnost karaktera za intragenetičku sliku populacija ove vrste, dalja istraživanja većeg broja izolata i drugih molekularnih markera treba nastaviti.

Analiza *GAPDH* genskih regiona *A. brassicicola* ukazala je na postojanje nekoliko varijabilnih pozicija nukleotida, na osnovu čega je utvrđeno prisustvo tri haplotipa koji nisu klastirani po geografskim regionima već su distribuirani po svim regionima u Srbiji. Istraživanja u Australiji (*Cakile maritima*), Kini (brokoli), Kanadi (uljana repica), na Tajlandu (različite vrste kupusa, kelja i karfiola) kao i srpskih kupusnjača ukazuju da je genotip 1 vrste *A. brassicicola* preovlađujući genotip na kupusnjačama u svetu (Jasalavich i sar., 1995; Pattanamahakul i Strange, 1999; Bock i sar., 2005; Gao i sar., 2014; Saharan i sar., 2016; Akram i sar., 2019). O genotipu 2 ove vrste, iako postoje podaci u GenBank bazi, osim izolata i publikacija iz Srbije ne postoje druge publikacije na osnovu kojih bi se utvrdila distribucija ovog genotipa u svetu (Blagojević i sar., 2020a,b). Slično važi i za genotip 3, koji je detektovan samo na uljanoj repici i kupusu u Srbiji, gde je određena zavisnost distribucije haplotipa i domaćina sugerisana ali do sada ne postoje istraživanja koja bi dala više podataka.

Na osnovu varijabilnosti *GAPDH* regiona, za *A. japonica* u Srbiji utvrđeno je prisustvo dva haplotipa. Prema GenBank podacima, haplotip 1 je jedini haplotip detektovan u Kini (*Orychophragmus violaceus*), u Brazilu (na rotkvi) i u Italiji (kupusnjače), dok se oba haplotipa ove vrste mogu naći na kupusnjačama u Japanu, Koreji i Srbiji (Ren i sar., 2012; Gilardi i sar., 2012; Bassimba i sar., 2013; Nishikawa i Nakashima, 2020; Blagojević i sar., 2020a,b). Na osnovu *ITS* sekvenci izolata sa kupusnjača iz celog sveta, Jasalavich i sar. (1995) otkrili su postojanje genetičke srodnosti vrsta *A. japonica* i *A. brassicicola*, što je potvrđeno i kod srpskih izolata.

Iako se *ITS* region rutinski koristi za molekularnu identifikaciju vrsta različitih biljnih patogena kada su vrste roda *Alternaria* u pitanju, pogotovo za sitnosporne vrste ovog roda, informativnost *ITS* regiona je dosta osporavana, izuzev za vrstu *A. infectoria* gde se ovaj region pokazao pouzdan (Pryor i Gilbertson, 2000; Woudenberg i sar., 2013; Armitage i sar. 2015; Lawrence i sar., 2016). U radovima Basim i sar. (2017) i Luo i sar. (2017), na osnovu *ITS* regiona pokazano je da su izolati *A. alternata*, *A. tenuissima* i *A. arborescens* 100% identični, odnosno sekvenciranje ovog regiona nije doprinelo identifikaciji sitnosporne vrste, što je u korelaciji sa rezultatima naše studije gde se izolati *A. alternata*, *A. arborescens* i *A. malvae* sa kupusnjača nisu mogli međusobno razlikovati. Filogenetske analize *ATP* regiona proučavanih srpskih izolata omogućila su razlikovanje sekvenci sitnosporne vrste i referentnog izolata *A. tenuissima*, iako su te razlike bile male, moglo bi se reći i nedovoljne, da bi se jasno uspostavile granice između ovih vrsta. Hong i sar. (2005) i Lawrence i sar. (2013) su saopštili informativnost *ATP* i *Alt a1* genskih regiona za klasifikaciju vrsta koje produkuju sitne spore. Analizirajući sekvence *ATP* regiona srpskih izolata ustanovljena je dovoljna varijabilnost da omogući diverzifikaciju 20 haplotipova *A. alternata*, dva haplotipa *A. arborescens*, i ukaže na genetičku srodnost sa vrstom *A. malvae*. Genetička varijabilnost *ATP* regiona sitnosporne vrste *Alternaria* spp. potvrđena je i na borovnici za *A. alternata*, *A. tenuissima* i *A. arborescens* (Zhu i Xiao, 2015). Dobijeni rezultati su u korelaciji sa istraživanjima Woudenberg i sar. (2015) koja predlažu da se 35 različitih morfovvrsta *Alternaria* klasifikuje pod imenom *A. alternata* jer su dosadašnje molekularne studije kompletnih genskih regiona pokazale da se ne može napraviti jasna razlika na genetičkom nivou. Kako je prikazano na slikama 17, 18 i 19, filogenetska klasifikacija korišćenjem Bayes algoritma pokazala je više *bootstrap* vrednosti nego ML metod, što su predstavili i Douady i sar. (2003) i Woudenberg i sar. (2013) u svojim istraživanjima.

5.7. Analiza mikrosatelitskih markera *Alternaria brassicicola*

Imajući u vidu da do sada nije potvrđen seksualni stadijum u životnom ciklusu *Alternaria* spp. (Rottem, 1994; Thomma, 2003) u molekularnim analizama očekivan je nizak nivo genetičke varijabilnosti, karakterističan za aseksualnu reprodukciju. Proučavanja

populacije *A. brassicicola* izolovanih sa kupusnjača u Srbiji pokazale su visok diverzitet gena, ali i visok diverzitet genotipova koji se javljaju u populaciji. Od 33 testirana genotipa, detektovano je 25 jedinstvenih multilokusnih genotipova (MLG). Srednja vrednost genskog diverziteta (H_{exp}) pokazala se takođe visoka. Na osnovu ovih parametara može se zaključiti da je genetička varijabilnost mnogo viša nego što bi se očekivalo za aseksualno razmnožavanje u kome ne dolazi do rekombinacija. Međutim, indeks očuvanosti vezanosti lokusa (I_a) pokazao se vrlo blizu vrednosti jedan, što ukazuje na činjenicu da je vezanost lokusa očuvana. Na osnovu ovog pokazatelja može se tvrditi da je aseksualno razmnožavanje ipak najčešći vid reprodukcije ovih patogena.

Kako Milgroom i sar. (1996) navode, osim rekombinacija na vezanost lokusa može uticati i odsustvo selekcionog pritiska i genetičkog drifta ali i, kako Smith (1982) navodi, geografska struktuiranost populacije. Međutim, za *A. brassicicola* populaciju iz Srbije, na osnovu analize mikrosatelitskih markera nije uočeno jasno grupisanje prema domaćinu ili lokalitetu, već je najveći genetički diverzitet uočen upravo između jedinki. Iacomi-Vasilescu i sar. (2002) ističu da se strukturiranost populacija patogena koji se šire preko semena, usled ponovljenih introdukcija može izgubiti.

Prethodne studije *A. brassicicola* na *Cakile maritima* u Australiji (Bock i sar., 2002; 2005) potvrđuju rezultate disertacije, da je prisutna velika genetička varijabilnost u populaciji, ali i očuvana neravnoteža vezanosti gena. Autori Bock i sar. (2005) sugerišu da do rekombinacija u populaciji ove vrste dolazi, ali da su ovakvi događaji retki, zbog čega ne postoji nasumični raspored alela ili, i ako postoji, da je previše mali da bi se detektovao korišćenim metodama i mikrosatelitskim markerima. Na osnovu analize učestalosti *mat* alela, velikog diverziteta genotipova u populaciji, kao i analize vezanosti lokusa rezultati ipak sugerišu postojanje seksualnog razmnožavanja u populaciji *A. brassicicola* (Linde i sar., 2010). Takođe, isti autori navode, da više puta ponovljene introdukcije, značajno povećavaju već visok genetički diverzitet populacije. U SAD, velika genetička varijabilnost populacija *A. brassicicola* sa kupusnjača je potvrđena za državu Njujork (Kreis i sar., 2016).

Odstupanja od očekivane intragenetičke varijabilnosti populacija su potvrđena i za druge vrste roda *Alternaria*, kao što je to slučaj sa *A. alternata* populacijama na citrusima. Stewart i sar. (2014) navode da od svih analiziranih populacija *A. alternata* sa citrusa, samo jedna pokazuje karakteristike populacije sa nasumičnim rasporedom lokusa, iako je u populaciji bio prisutan samo jedan *mat* alel. Ovi autori sugerišu da postoji paraseksualna reprodukcija u populaciji *A. alternata*, ali do koje retko dolazi. Imajući u vidu da rezultati ove disertacije na osnovu testa patogenosti, temperaturnog uticaja i molekularne karakterizacije sugerišu da se radi o jednoj populaciji *A. brassicicola* koja može inficirati više vrsta kupusnjača u celoj regiji Srbije, širenja putem semena različitih kupusnjača i akumulacija retkih alela usled mutacija su najverovatniji uzrok povećanog diverziteta *A. brassicicola* populacija.

Takođe, treba imati u vidu i da veličina testiranog uzorka i broja mikrosatelitskih markera može uticati na rezultate. Tako da više mikrosatelitskih markera kao i veći broj izolata *A. brassicicola* iz šire geografske regije, ali i domaćina koji nisu iz fam. kupusnjača, treba uključiti u testiranja genetičke varijabilnosti. Kod drugih vrsta *Alternaria*, kao što je *A. solani* (Lourenco i sar., 2010), kod kojih je takođe dijagnostifikovan visok nivo genetičke varijabilnosti i intenzivno širenje inokuluma između regija gajenja, primećena je i promena osetljivosti na neke fungicide. Kao što se iz svega predstavljenog može videti, studije genetičkog diverziteta su jako važne jer se nalaze u osnovi razumevanja odnosa biljka-patogen, epidemiologije i strategije efikasne zaštite od biljnih patogena.

5.8. Proučavanja prisustva mutacija *cytB* gena

Patogen pšenice, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, je jedan od prvih prijavljenih slučajeva rezistentnosti na fungicide iz grupe azoksistrobina, posle samo dve godine upotrebe u Evropi

(Fraaije i sar., 2002). Ubrzo potom, smanjenje senzitivnosti na azoksistrobin (Quadris, Syngenta Crop Protection Inc., Greensboro, NC) detektovano je i za mnoge druge vrste, među kojima i *Alternaria* spp. (Bartlett i sar., 2002; Rosenzweig i sar., 2019). Kako su *in vitro* testiranja rezistentnosti vremenski vrlo zahtevna, za mnoge vrste razvijeni su protokoli koji su omogućili brzu i uspešnu detekciju prisustva ili odsustva mutacija koje su odgovorne za razvoj rezistencije na fungicide (Ma i Michailides, 2004; Luo i sar., 2007). Iako se u Srbiji preparat *Quadris* rutinski koristi u sprečavanju lisne pegavosti kupusnjača, u ovoj studiji nije uočeno prisustvo mutacija odgovornih za rezistentnost *A. brassicicola* izolata. Tokom analize sekvenci *A. brassicicola*, za sve ispitivane izolate uočen je intron na mestu 131 cytB genskog regiona. Kreis i sar. (2016) takođe navode da na kupusnjačama nisu detektovani rezistentni sojevi *A. brassicicola* u Njujorku, iako je *in vitro* test pokazao određeno smanjenje osetljivosti na fungicid. Slični rezultati su zabeleženi i za vrstu *A. solani* na krompiru, gde je smanjenje osetljivosti populacija bilo prisutno nezavisno koliko puta godišnje je ovaj fungicid korišćen (Rosenzweig i sar., 2008). Grasso i sar. (2008) su došli do zaključka da prisustvo introna može uticati na rezistentnost populacija. Prisustvo introna na poziciji 131 uočeno je za populacije *A. solani* genotipa 2, koje su imale F129L mutaciju koja je uzrokovala smanjenje osetljivosti izolata (Leiminger i sar., 2014). Imajući u vidu da su QoI fungicidi inhibitori germinacije spora, kako bi se potvrdili rezultati molekularnih istraživanja rezistencije i utvrdio efekat koji prisustvo ovog introna ima na osetljivost izolata *A. brassicicola*, neophodno je dalje praćenje populacija ove vrste, analiza većeg broja izolata i *in vitro* testiranja inhibicije germinacije spora.

5.9. *Trichoderma harzianum* i *Fusarium lateritium*, antagonisti razvoja *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola*

5.9.1. Inhibicija razvoja *A. brassicae* i *A. brassicicola* pod uticajem *T. harzianum*

U biokontroli patogenih gljiva potencijal vrsta roda *Trichoderma* prepoznat je pre skoro 90 godina od strane Weindling (1932). Od tada pa do danas, vrste roda *Trichoderma* se vrlo intenzivno testiraju i primenjuju u komercijalne svrhe protiv patogena kao što su *Stemphylium vesicarium* (Hussein i sar., 2007), *A. porri* (Imtiaj i Lee, 2008; Prakasam i Sharma, 2012), *A. palandui* (Karthikeyan i sar., 2008), *A. alternata*, *A. tenuissima* (Shahnaz i sar., 2012) i *Botrytis* spp. (Elad i Stewart, 2007). Mehanizam kojim vrste roda *Trichoderma* inhibiraju rast i razvoj patogena je različit (Rosado i sar., 2007; Abo-Elyousr i sar., 2014). Uglavnom se antagonističko delovanje može podeliti na direktno delovanje koje se ostvaruje u interakciji sa patogenom i indirektno delovanje koje se ostvaruje u interakciji sa biljkom domaćinom (Charoenporn i sar., 2010).

Tokom ovih istraživanja detektovan je visok nivo inhibicije rasta *A. brassicae* i *A. brassicicola* na PDA podlozi (57% odnosno 74%) u dualnoj kulturi sa *T. harzianum*. Obzirom da su hife mikopatogena rasle preko micelija *A. brassicae* i *A. brassicicola* može se zaključiti da je mikoparazitska aktivnost zasnovana na ograničenju nutrijenata i prostora za rast ispitivanih patogena. Činjenica da *Trichoderma* vrste razvijaju specijalizovane hife koje se obmotavaju oko hifa patogena potvrđuje uočeno delovanje na patogena u kulturi (Howell, 2003). Dobijeni rezultati tokom ovih istraživanja podudaraju se sa rezultatima Imtiaj i Lee (2008), i Prakasam Sharma (2012) i Abo-Elyousr i sar. (2014) koji su zabeležili da je intenzitet inhibicije *Trichoderma* spp. na rast *A. porri* iznosio od 61,5-74,34%. Inhibitorno delovanje nekoliko vrsta *Trichoderma* dokazano je i prema *A. solani* i *A. tenuissima* (Patale i Mukadam, 2011; Ambuse i sar., 2012). Mandare i sar. (2008) saopštavaju da osim *T. harzianum* i vrste *T. koningii*, *T. lingorum* i *T. virens* mogu inhibirati rast *A. alternata* i do 55%. Da je *T. harzianum* vrlo uspešan agens biokontrole *A. alternata* svedoče i radovi Roco i Perez (2001), Monte

(2001) i Sempere i Santamarina (2007). Sličan procenat inhibicije pokazan je i za vrste *Stemphylium vesicarium* (Hussein i sar., 2007).

Testiranje antagonističkog efekta *T. harzianum* na biljkama kupusa *in vivo*, potvrdilo je inhibitorno delovanje na infektivne propagule *A. brassicae* i *A. brassicicola*, i smanjenje infekcije lista kupusa oko 50%. Vreme primene suspenzije antagonista (pre ili posle nanošenja patogenih propagula) na listove biljaka pokazalo se da ima značajan uticaj na razvoj simptoma. Rad Gveroska i Ziberoski (2012) potvrđuje rezultate teze time što ističe značajnu redukciju simptoma *A. alternata* i najveći efekat zaštite *T. harzianum* kada se suspenzija primeni pre nanošenja kulture patogena. Koliki je stepen efikasnosti najbolje svedoče radovi Abo-Elyousr i sar. (2014) o biološkoj kontroli *A. porri* sa suspenzijom *T. harzianum*, koja se pokazala efikasnija i od hemijske kontrole Ridomil Gold Plus preparatom koji se najčešće koristi za suzbijanje ovog patogena. Imajući u vidu da kultivari kupusnjača rezistentni na *Alternaria* patogene do sada nisu registrovani, biološka kontrola vrsta roda *Alternaria* predstavlja važan mehanizam suzbijanja ovih patogena koga treba uključiti u integracione programe menadžmenta kontrole lisne pegavosti na kupusnjačama.

5.9.2. Inhibicija razvoja *A. brassicae* i *A. brassicicola* pod uticajem *F. lateritium*

Za razliku od *T. harzianum*, o biološkom potencijalu *F. lateritium* podaci su vrlo ograničeni. Antagonistička svojstva *F. lateritium* su prvobitno bila primenjivana za kontrolu patogena *Eutypa armenias* na kajsiji (Carter i sar., 1971). Takođe, istraživanja Sitepu i sar. (1984) ukazuju na mogućnost primene *F. lateritium* u prevenciji bolesti salate izazvane sa *Scleroderma sclerotinuum* u Australiji. Prilikom ispitivanja delovanja ove vrste na patogene *Abutilon theophrasti* i *Sida spinosa*, detektovano je da je uspešnost inhibicije zavisila od koncentracije inokuluma, stadijuma razvoja biljaka, kao i od temperature nakon inokulacije (Boyette i Walker, 1986). Efikasnost *F. lateritium* u navedenoj studiji potvrđena je kako *in vitro* tako i *in vivo*, međutim, utvrđeno je da efikasnost inhibitornog delovanja zavisi od sastava medijuma na kojem je kultura gajena. U ispitivanjima *A. brassicae* i *A. brassicicola* patogena sa kupusnjača u Srbiji, *F. lateritium* je pokazao jako inhibitorno delovanje kako *in vitro* tako i *in vivo* uslovima. Treba napomenuti da je antagonistička aktivnost u *in vitro* eksperimentu bila veća za vrstu *A. brassicicola*, dok su *in vivo* ispitivanja pokazala da *F. lateritium* ima jače preventivno delovanje na infekciju izazvanu *A. brassicae*. Takođe, istraživanja su pokazala da je *F. lateritium* vrlo efikasan za suzbijanje patogena u kombinaciji sa hemijskim preparatima kao što je *Benomyl* (Munkvold i sar., 1993). Na osnovu svega iznetog može se konstatovati da biološka kontrola bolesti izazvanih vrstama roda *Alternaria* pomoću *F. lateritium* može biti vrlo značajna i neophodno je nastaviti testiranja.

Kakvom pristupu treba težiti u budućnosti?

Vrste roda *Alternaria* predstavljaju važan ograničavajući činilac u poljoprivrednoj proizvodnji kupusnjača i mogu uticati direktno smanjujući prinos i kvalitet proizvoda, ili indirektno, kao vektori brojnih virusnih i drugih oboljenja na biljkama. Toksini, koji su proizvod sekundarnog metabolizma gljiva, negativno utiču na zdravlje ljudi i životinja. Metode savremene poljoprivrede u znatnoj meri povećavaju štetno delovanje patogena, čemu naročito doprinose velike površine obradivog zemljišta na kojima se uzgajaju monokulture iz godine u godinu kao i proizvodnja vezana za terene koji se moraju intenzivno navodnjavati, tretirati hemijskim sredstvima i veštačkim đubrivima. Ovakav pristup smanjuje bioraznovrsnost domaćina i pospešuje akumulaciju i širenje patogena. Na globalnom nivou, na ove faktore se za sada se ne može značajno uticati.

Razmatrajući primenu preventivnih agrotehničkih mera, hemijskih i bioloških mera zaštite i kontrole bolesti kod kupusnjača, može se zaključiti da samo integracija metoda može dati zadovoljavajuće rezultate u poljoprivrednoj proizvodnji, kako u ekonomskom smislu, tako i radi očuvanja životne sredine. Prema tome, poznavanje biologije i ekologije patogena, načina održavanja patogena u prirodi, načina prenošenja infektivnih propagule, uslova za pojavu i razvoj bolesti, kao i simptoma i oštećenja koje prouzrokuju na biljci, su sve relevantni faktori koje treba uzeti u obzir pri zaštiti biljaka iz fam. Brassicaceae od patogenih vrsta roda *Alternaria*.

6. ZAKLJUČAK

Tokom četvorogodišnjeg perioda, od 2013. do 2016. godine, u zasadima ekonomski najznačajnijih vrsta kupusnjača u Srbiji detektovani su simptomi lisne pegavosti na listovima, stabljikama i ljuskama prouzrokovani patogenim vrstama roda *Alternaria* i izvedeni su sledeći zaključci:

- pregledom useva kupusnjača u 22 administrativna okruga na celoj teritoriji Srbije, zabeležena je relativno visoka učestalost javljanja bolesti na uljanjoj repici, renu, kupusu, brokoliju, karfiolu, kelerabi i kelju, pri čemu je prikupljeno 527 uzorka sa svih studiranih lokaliteta i izolovano 436 izolata *Alternaria* spp.
- na osnovu morfoloških i molekularnih analiza identifikovano je 8 vrsta roda *Alternaria*, osim vrsta *A. brassicae* i *A. brassicicola*, do sada najčešće opisivanih patogena na kupusnjačama kako u Srbiji tako i u svetu, detektovano je još 6 vrsta koje su izazivači lisne pegavosti kupusnjača u Srbiji i to: *A. japonica*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae*.
- ispitivanja morfo-fizioloških karakteristika na najčešće korišćenim hranljivim podlogama za gajenje *Alternaria* spp. pokazala su da su mnogi makroskopski i mikroskopski karakteri koji se koriste za identifikaciju vrsta ovog roda, pod uticajem sastava podloga. Boja micelije i stopa rasta značajno variraju među izolatima i stoga nisu pouzdan karakter za identifikaciju. Varijabilnost morfoloških osobina konidija pokazala se takođe prisutna, ali i različita među vrstama, kako je pokazano za *A. brassicae*. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je V8 podloga najpouzdanija za identifikaciju *Alternaria* spp. na osnovu morfoloških karakteristika.
- rezultati *in vitro* ispitivanja uticaja temperature na rast izolata *Alternaria* spp., patogena sa kupusnjača u Srbiji, pokazuju da su vrste različito adaptirane na temperaturne uslove. U zasadima je uočeno da je tokom letnjih meseci *A. brassicicola* dominantno izolovana vrsta, čak 76%, dok je tokom jesenjih meseci *A. brassicae* bila pretežno izolovana vrsta, 70%. Na osnovu simptoma na listovima, sezonska variranja u zastupljenosti ovih patogena nisu uočena.
- izolati *A. brassicicola*, *A. brassicae* i *A. japonica* pokazali su se najpatogenijim. Biljke rena bile su najotpornije na infekciju prema svim ispitivanim vrstama *Alternaria* i čak rezistentne na *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae*. Razlike u patogenosti potiču od različite osetljivosti domaćina kako na različite vrste tako i na populacije *Alternaria* spp. sa različitih domaćina. Osetljivost domaćina zavisi i od količine i rasporeda epikutikularnog voska, prisustva različitih trihoma na listu biljaka, sadržaja fitoaleksina, ali i produkcije mikotoksina različitih vrsta *Alternaria*. Oštećenje tkiva lista dovodi do veće osetljivosti biljke na patogen, što ukazuje na značaj preventivnih mera zaštite, kako od mehaničkog povređivanja biljaka u polju tako i zaštite od insekata. Obolele biljke iz fam. Brassicaceae u Srbiji mogu biti izvor inokuluma za: *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. alternata*, *A. japonica*, *A. arborescens*, *A. cheiranthi*, *A. nepalensis* i *A. malvae*, što omogućava širenje bolesti u nove geografske regione, na druge vrste, varijetete i kultivare kupusnjača i eventualno nove epidemije. Sastav *Alternaria* vrsta može varirati u zavisnosti od godine, sezone, regije i vrste zasada.
- molekularna karakterizacija *ITS*, *Alt a1*, *GAPDH* i *ATP* markera, ukazala je na genetičku uniformnost *A. brassicae* i monoklonalnu prirodu ovih populacija, što znači da varijabilnost morfoloških karaktera treba pripisati fenotipskoj plastičnosti. Na osnovu

GAPDH gena: za populacije *A. brassicicola* utvrđeno je prisustvo tri haplotipa, dva haplotipa su distribuirana po celoj Srbiji, dok je za haplotip 3 utvrđena zavisnost distribucije haplotipa i domaćina; za *A. japonica* utvrđeno je prisustvo dva haplotipa za koje nije uočena zavisnost distribucije u odnosu na geografski region ili domaćina. Sekvence *ATP* regiona su se pokazale dovoljno varijabilnim da omoguće diverzifikaciju 20 haplotipova *A. alternata*, dva haplotipa *A. arborescens* i ukazuju na genetičku srodnost vrste *A. malvae*, ali nedovoljne da se uspostave jasne granice između ovih vrsta. Za *A. alternata* izolate, specifičnost haplotipova vezana za domaćina ili geografski region je ograničena samo na delove haplotipske mreže. Varijabilnost ispitivanih genskih lokusa nije ustanovljena za vrste *A. cheiranthi* i *A. nepalensis* što je najverovatnije uslovljeno malim brojem izolata.

- analiza mikrosatelitskih sekvenci pokazala je da je genetička varijabilnost mnogo viša nego što bi to bilo očekivano za klonalno razmnožavanje, u kome ne dolazi do rekombinacija. Međutim, indeks očuvanosti vezanosti lokusa (Ia) pokazao se vrlo blizu vrednosti jedan, što ukazuje na činjenicu da je vezanost lokusa očuvana. Na osnovu ovog pokazatelja može se tvrditi da je aseksualno razmnožavanje za populacije *A. brassicicola* ipak preovlađujući mehanizam reprodukcije.
- iako se u Srbiji preparat *Quadris* rutinski koristi u sprečavanju lisne pegavosti kupusnjača nije detektovano prisustvo mutacija odgovornih za promenu osetljivosti ili rezistentnost *A. brassicicola* izolata.
- sa lista kupusnjača identifikovani su izolati *Trichoderma harzianum* i *Fusarium lateritium* koji su pokazali visok nivo inhibicije rasta i infektivnosti patogena *A. brassicae* i *A. brassicicola* kako *in vitro* tako i *in vivo*.

7. LITERATURA

Abbas, H. K., Egley, G. H., & Paul, R. N. (1995). Effect of conidia production temperature on germination and infectivity of *Alternaria helianthi*. *Phytopathology*, 85(6), 677-682.

Abdel-Farid, I. B., Jahangir, M., van den Hondel, C. A. M. J. J., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Fungal infection-induced metabolites in *Brassica rapa*. *Plant Science*, 176(5), 608-615.

Abo-Elyousr, K. A., Abdel-Hafez, S. I., & Abdel-Rahim, I. R. (2014). Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*. *Journal of Phytopathology*, 162(9), 567-574.

Agneta, R., Möllers, C., & Rivelli, A. R. (2013). Horseradish (*Armoracia rusticana*), a neglected medical and condiment species with a relevant glucosinolate profile: a review. *Genetical Resources and Crop Evolution*, 60, 1923-1943.

Agrios, G. N. (2005). Plant diseases caused by fungi. In *Plant pathology*, 5th edition. Academic Press

Akram, W., Li, G., Ahmad, A., Anjum, T., Ali, B., Guo, J., ... & Wang, Q. (2019). *Alternaria brassicicola* Causing Leaf Spot Disease on Broccoli in China. *Plant Disease*, 103(11), 2960-2960.

Alexander, H. M., Antonovics, J., & Kelly, A. W. (1993). Genotypic Variation in Plant Disease Resistance-Physiological Resistance in Relation to Field Disease Transmission. *Journal of Ecology*, 81, 325-333.

Al-Lami, H. F. D., You, M. P., & Barbetti, M. J. (2019). Incidence, pathogenicity and diversity of *Alternaria* spp. associated with Alternaria leaf spot of canola (*Brassica napus*) in Australia. *Plant Pathology*, 68(3), 492-503.

Al-lami, H. F., You, M. P., & Barbetti, M. J. (2020). Temperature Drives Contrasting Alternaria Leaf Spot Epidemic Development in Canola and Mustard Rape from *Alternaria japonica* and *A. brassicae*. *Plant Disease*, 104 (6), 1574-1577.

Allen, S. J., Brown J. F., & J. K. Kochman (1983). Production of inoculum and field assessment of *Alternaria helianthi* on sunflower. *Plant Disease*, 67(6), 665-668.

Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A., & Kellogg, E. A. (2006). Systematics and phylogeny of the *Brassicaceae* (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2-4), 89-120.

Ambuse, M. G., Chatage, V. S., & Bhale, U. N. (2012). Influence of *Trichoderma* spp. against *Alternaria tenuissima* inciting leaf spot of *Rumex acetosa* L. *Bioscience Discovery*, 3(2), 259-262.

Andersen, B., Sørensen, J. L., Nielsen, K. F., van den Ende, B. G., & de Hoog, S. (2009). A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 642-656.

- Andersen, B., Kroger, E., & Roberts, G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research*, 105, 291–299.
- Andersen, B., Kroger, E., & Roberts, R.G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research*, 106, 170-182.
- Andrew, M., Peever, T. L., & Pryor, B. M. (2009). An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*, 101(1), 95-109.
- Anjum, N. A., Umar, S., & Iqbal, M. (2014). Assessment of cadmium accumulation, toxicity, and tolerance in *Brassicaceae* and *Fabaceae* plants—implications for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(17), 10286-10293.
- Ansari N. A., Khan M. W., & Muheet A. (1989). Effect of some factors on growth and sporulation of *Alternaria brassicae* causing *Alternaria* blight of rapeseed and mustard. *Acta Botanica Indica*, 17, 49-53.
- Antonijević, D., & Mitrović, P. (2007). Leaf spot of oilseed rape. *Biljni lekar*, 35(4), 443-449.
- Armitage A. D., Barbara, D. J., Harrison, R. J., Lane, C. R., Sreenivasaprasad, S., Woodhall, J. W., & Clarkson, J. P. (2015). Discrete lineages within *Alternaria alternata* species group: Identification using new highly variable loci and support from morphological characters. *Fungal Biology* 119, 994-1006.
- Atkinson, R. G. (1950). Studies on the parasitism and variation of *Alternaria raphani*. *Canadian Journal of Research*, 28(3), 288-317.
- Avenot, H., Simoneau, P., Iacomi-Vasilescu, B., & Bataille-Simoneau, N. (2005). Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene AbNIK1 from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Current Genetics*, 47(4), 234-243.
- Babadoost, M., Gabrielson, R. L., Olson, S. A., & Mulanax, M. W. (1993). Control of *Alternaria* diseases of brassica seed crops caused by *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola* with ground and aerial fungicide applications. *Seed Science and Technology*, 21(1), 1-7.
- Babu, S., Seetharaman, K., Nandakumar, R., & Johanson, I. (2000). Efficacy of fungal antagonists against leaf blight of tomato caused by *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Jones and Grou. *Journal of Biological Control*, 14(2), 79-81.
- Bagherabadi, S., Zafari, D., & Soleimani, M. J. (2015). Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolates causing potato brown leaf spot, using ISSR markers in Iran. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 6(7), 1-6.
- Bains, P. S., & Tewari, J. P. (1987). Purification, chemical characterization and host-specificity of the toxin produced by *Alternaria brassicae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30, 259–271.

Balasinska, B., Nicolle, C., Gueux, E., Majewska, A., Demigne, C., & Mazur, A. (2005). Dietary horseradish reduces plasma cholesterol in mice. *Nutrition Research*, 25(10), 937-945.

Balaž, F. (2001): Mikoze kupusnjača. *Biljni lekar*, 29 (6), 548-555.

Barkai-Golan, R., & Kopeliovitch, E. (1988). Effect of peel injury and enzymatic activity of the fruit on the tolerance of tomato genotypes to *Alternaria* infection. *International Symposium on Postharvest Handling of Fruit and Vegetables*, 258, 631-638.

Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)*, 58(7), 649-662.

Basım, E., Basım, H., Abdulai, M., Baki, D., & Öztürk, N. (2017). Identification and characterization of *Alternaria alternata* causing leaf spot of olive tree (*Olea europaea*) in Turkey. *Crop Protection*, 92, 79-88.

Bassimba, D. M., Mira, J. L., & Vicent, A. (2013). First report of *Alternaria japonica* causing black Spot of turnip in Spain. *Plant Disease*, 97, 1505.

Battilani, P., Costa, L. G., Dossena, A., Gullino, M. L., Marchelli, R., Galaverna, G., Pietri, A., Dall'Asta, C., Giorni, P., Spadaro, D., & Gualla, A. (2009). Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants. Chapter 3. *Alternaria Mycotoxins in Food and Feed*, 128-174.

Bickerton, J. M. (1942). *Alternaria* blight of carnations caused by *Alternaria dianthi* Stev. and Hall. Cornell University Agricultural Experiment Station, New York State College of Agriculture; 790, 175-213.

Blagojević, J., Oro, V., Nikolić, I., Popović, T., Aleksić, G., Gavrilović, V., & Ivanović, Ž. (2014). Morpho-physiological study of *Alternaria* spp. isolates from celery. *Zaštita bilja*, 65(1), 15-26.

Blagojević, J., Ivanović, Ž., Oro, V., Dolovac, N., Popović, T., Ignjatov, M., & Vukojević, J. (2015). First report of horseradish leaf spot caused by *Alternaria brassicae* in Serbia. *Plant Disease*, 99(5), 730-730.

^aBlagojević, J., Vukojević, J., Ivanović, B., & Ivanović, Ž. (2020). Characterization of *Alternaria* Species Associated with Leaf Spot Disease of *Armoracia rusticana* in Serbia. *Plant Disease*, 104(5), 1378-1389.

^bBlagojević, J. D., Vukojević, J. B., & Ivanović, Ž. S. (2020). Occurrence and characterization of *Alternaria* species associated with leaf spot disease in rapeseed in Serbia. *Plant Pathology*, 69(5), 883-900.

Bock, C. H., Thrall, P. H., & Burdon, J. J. (2005). Genetic structure of populations of *Alternaria brassicicola* suggests the occurrence of sexual recombination. *Mycological Research*, 109, 227-236.

Bock, C. H., Thrall, P. H., Brubaker, C. L., & Burdon, J. J. (2002). Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting. *Mycological Research*, 106, 428-434.

- Bock, K. R. (1964). Purple blotch (*Alternaria porri*) of onion in Kenya. *Annals of Applied Biology*, 54(3), 303-311.
- Boyette, C. D., & Walker, H. L. (1986). Evaluation of *Fusarium lateritium* as a biological herbicide for controlling velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and prickly sida (*Sida spinosa*). *Weed Science*, 34(1), 106-109.
- Brakebusch, C., Hirsch, E., Potocnik, A., & Faessler, R. (1997). Genetic analysis of β 1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *Journal of Cell Science*, 110, 2895-2904.
- Brasier, C. M., & Webber, J. F. (1987). Positive correlations between in vitro growth rate and pathogenesis in *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathology*, 36(4), 462-466.
- Brazauskienė, I., & Petraitiene, E. (2006). The occurrence of *Alternaria* blight (*Alternaria* spp.) and phoma stem canker (*Phoma lingam*) on oilseed rape in central Lithuania and pathogenic fungi on harvested seed. *Journal of Plant Protection Research*, 46(3), 295-311.
- Bromand, B. (1990). Diversities in oilseed rape growing within the western palaeartic regional section. *IOBC/wprs Bull*, 13(4), 7-31.
- Bruford, M. W., & Wayne, R. K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3(6), 939-943.
- Brun, S., Madrid, H., Van Den Ende, B. G., Andersen, B., Marinach-Patrice, C., Mazier, D., & De Hoog, G. S. (2013). Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. *Fungal Biology*, 117(1), 32-40.
- Bulajić, A., Filajdić, N., Babović, M., & Sutton, T. B. (1996). First report of *Alternaria mali* on apples in Yugoslavia. *Plant Disease*, 80(6), 709.
- Burdon, J. J. (1987). *Diseases and plant population biology*. CUP Archive.
- Burton, James. (2017). Where Is Broccoli And Cauliflower Grown? Retrieved from <https://www.worldatlas.com/articles/countries-growing-the-most-broccoli-and-cauliflower-in-the-world.html>
- Cartea, M. E., & Velasco, P. (2008). Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 213-229.
- Carter, M. V. & Price, T. V. (1974). Studies of the interaction between *E. armeniacae* and *F. lateritium* and their relative sensitivities to benzimidazole chemicals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 25, 105-119.
- Cartwright, D. K., & Benson, D. M. (1995). Optimization of biological control of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia by *Paecilomyces lilacinus* and *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease*, 79(3), 301-308.
- Cerkauskas, R. F. (1988). Latent colonization by *Colletotrichum* spp.: epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 10(4), 297-310.

- Changsri, W., & Weber, G. F. (1963). Three *Alternaria* species pathogenic on certain cultivated crucifers. *Phytopathology*, 53(6), 643-648.
- Charoenporn, C., Kanokmedhakul, S., Lin, F. C., Poeaim, S., & Soyong, K. (2010). Evaluation of bio-agent formulations to control *Fusarium* wilt of tomato. *African Journal of Biotechnology*, 9(36).
- Chepkemoi, Joyce. (2017). The World Leaders In Cabbage Production. Retrieved from <https://www.worldatlas.com/articles/the-world-leaders-in-cabbage-production.html>
- Ching, H. W., Yu, W. T., Jen, S. H., & Hsiung, K. W. (2007). Effect of oriental medicinal plant extracts on spore germination of *Alternaria brassicicola* and nature of inhibitory substances from speed weed. *Plant Disease*, 91(12), 1621-1624.
- Chou, H., & Wu, W. (2002). Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer region of the genus *Alternaria*, and significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research*, 106 (2), 164-168.
- Clement, M., Posada, D. C., & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 10, 1657-1659.
- Cobb, A. C., & Dillard, H. R. (1998). *Thlaspi arvense*, a new host for *Alternaria brassicicola*. *Plant Disease*, 82(8), 960.
- Conn, K. L., & Tewari, J. P. (1989). Interactions of *Alternaria brassicae* conidia with leaf epicuticular wax of canola. *Mycological Research*, 93(2), 240-242.
- Conn, K. L., Tewari, J. P., & Dahiya, J. S. (1988). Resistance to *Alternaria brassicae* and phytoalexin-elicitation in rapeseed and other crucifers. *Plant Science*, 56(1), 21-25.
- Conn, K. L., Tewari, J. P., & Awasthi, R. P (1990). A disease assessment key for *Alternaria* blackspot in rapeseed and mustard. *Disease des Plantes Survey'au Canada*, 70, 19-22.
- Cooke, D. E. L., Jenkins, P. D., & Lewis, D. M. (1997). Production of phytotoxic spore germination liquids by *A. brassicae* and *A. brassicicola* and their effect on species of the family *Brassicaceae*. *Annals of Applied Biology*, 131, 413-426.
- Cooke, D. E., Forster, J. W., Jenkins, P. D., Jones, D. G, & Lewis, D. M. (1998). Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. *Annals of Applied Biology*, 132, 197-209.
- Czajka, A., Czubatka, A., Sobolewski, J., & Robak, J. (2015). First report of *Alternaria* leaf spot caused by *Alternaria alternata* on spinach in Poland. *Plant Disease*, 99(5), 729-729.
- Czyżewska, S. (1970). Effect of temperature on the growth and sporulation of *Alternaria* species isolated from *Crambe abyssinica* Hochst. *Acta Mycologica*, 6(2), 261-276.
- Daebeler, F., Amelung, D., & Riedel, V. (1986). Untersuchungen über die Schädwirkung der durch *Alternaria* spp. verursachten Rapsschwärze an Winterraps. *Wiss. Z. Wilh.-Pieck-Univ. Rostock, Naturwiss. Reihe*, 35, 52-54.

- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Datar, V. V. (1996). Efficacy of growth regulators and fungitoxicants on fruit rot of chilli. *Mycological Plant Pathology*, 26, 239-242.
- De Hoog, G. S., & Horre, R. (2002). Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses*, 45(7-8), 259-276.
- De Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnoff, N., & Talbot, N. J. (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*, 389, 244-245.
- Deep, S., & Sharma, P. (2012). Host age as predisposing factor for incidence of black leaf spot of cauliflower caused by *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. *Indian Phytopathology*, 65, 71-75.
- Degenhardt, K. J., Petrie, G. A., & Morrall, R. A. (1982). Effects of temperature on spore germination and infection of rapeseed by *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, and *A. raphani*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 115-8.
- Degenhardt, K. J., Skoropad, W. P., & Kondra, Z. P. (1974). Effects of *Alternaria* blackspot on yield, oil content and protein content of rapeseed. *Canadian Journal of Plant Science*, 54(4), 795-799.
- Delahaut, K. A & Newenhouse, A. C (1997). Growing broccoli, cauliflower, cabbage and other cole crops in Wisconsin. University of Wisconsin.
- Deshmukh, A. N., Deshmukh, A. N., & Sawant, D. G. (1998). Studies of Leaf Spot and Fruit Rot of Chilli Caused by *Alternaria alternata* Keissler. MPKV, Rahuri.
- Desphande, S. S. (2002). Fungal Toxins. In: Handbook of food toxicology, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 387-456,
- Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. (1985). Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc.
- Dixon, G.R. (2007). Vegetable brassicas and related crucifers. Wallingford: CABI
- Douady, C. J., Delsuc, F., Boucher, Y., Doolittle, W. F., & Douzery, E. J. (2003). Comparison of Bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. *Molecular Biology and Evolution*, 20(2), 248-254.
- Droby, S., Dinoor, A., Prusky, D., & Barkai-Golan, R. (1984). Pathogenicity of *Alternaria alternata* on potato in Israel. *Phytopathology*, 74(5), 537-542.
- Dunbar, M., Adhikari, A., Kontz, B., Varenhorst, A., Nleya, T., Byamukama, E., & Mathew, F. (2017). First report of *Alternaria* Black Spot caused by *Alternaria alternata* on *Brassica carinata* in South Dakota. *Plant Disease*, 101, 1951.

European Food Safety Authority (EFSA) on Contaminants in the Food Chain (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9(10), 2407. Available at: www.efsa.europa.eu/efsajournal

Elad, Y., & Stewart, A. (2007). Microbial control of *Botrytis* spp. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. (eds) *Botrytis: Biology Pathology and Control*. the Netherlands, Springer, 223–241.

Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.

Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G., & Manyes, L. (2017). *Alternaria* mycotoxins in food and feed: an overview. *Journal of Food Quality*, 2017, 1-20.

Esfahani, M. N. (2018). Analysis of virulence and genetic variability of *Alternaria alternata* associated with leaf spot disease in potato plants in Iran. *Acta Mycologica*, 53(1), 1105.

Everts, K. L., & Lacy, M. L. (1990). The influence of dew duration, relative humidity, and leaf senescence on conidial formation and infection of onion by *Alternaria porri*. *Phytopathology*, 80(11), 1203-1207.

Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.

Ezra, D., Gat, T., Skovorodnikova, Y., Vardi, Y., & Kosto, I. (2010). First report of *Alternaria* black spot of pomegranate caused by *Alternaria alternata* in Israel. *Australasian Plant Disease Notes*, 5(1), 1-2.

Fokkema, N. J. (1978). Fungal antagonisms in the phyllosphere. *Annals of Applied Biology*, 89(1), 115-119.

Forster, G. F. (1977). Effect of leaf surface wax on the deposition of airborne propagules. *Transactions of the British Mycological Society*, 68(2), 245-250.

Fraaije, B. A., Butters, J. A., Coelho, J. M., Jones, D. R., & Hollomon, D. W. (2002). Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathology*, 51(1), 45-54.

Franzke, A., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Koch, M. A., & Mummenhoff, K. (2011). Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science*, 16(2), 108-116.

Fritz, V. A., Rosen, C. J., Grabowski, M. A., Hutchison, W. D., Becker, R. L., Tong, C. B., ..., & Nennich, T. T. (2009). Growing broccoli, cabbage and cauliflower in Minnesota. *University of Minnesota Extension Bulletin*, 1-15.

Gams, W., & Bissett, J. (1998). Morphology and Identification of *Trichoderma* In: Kubicek, CP and Harman, GE, Eds., *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. London: Taylor & Francis Led, 1, 3-34.

- Gannibal, P. B., & Gasich, E. L., (2009). Causal agents of the alternariosis of cruciferous plants in Russia: species composition, geography and ecology. *Mikologiya i fitopatologiya* 43, 447-456.
- Gannibal, P. B., Orina, A. S., Mironenko, N. V., & Levitin, M. M. (2014). Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology*, 139(3), 609-623.
- Gao, J., Liu, Y. N., Nan, N., Lu, B. H., Xia, W. Y., & Wu, X. Y. (2014). *Alternaria brassicicola* causes a leaf spot on *Isatis indigotica* in China. *Plant Disease*, 98(10), 1431.
- Garibaldi, A., Gilardi, G., Bertoldo, C., & Gullino, M. L. (2011). First report of leaf spot of wild (*Diplotaxis tenuifolia*) and cultivated (*Eruca vesicaria*) rocket caused by *Alternaria japonica* in Italy. *Plant Disease*, 95(10), 1316.
- Ghanem, K. M., Al-Fassi, F. A., & Farsi, R. M. (2011). Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from shrimp shellfish waste by *Alternaria alternata*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(13), 1649-1659.
- Gherbawy, Y., Hussein, M. A., Runge, F., & Spring, O. (2018). Molecular characterization of *Alternaria alternata* population isolated from Upper Egyptian tomato fruits. *Journal of Phytopathology*, 166(10), 709-721.
- Gilardi, G., Demarchi, S., Ortu, G., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2015). Occurrence of *Alternaria japonica* on seeds of wild and cultivated rocket. *Journal of Phytopathology*, 163(5), 419-422.
- Gómez-Campo, C., & Prakash, S. (1999). Origin and domestication. *Developments in Plant Genetics and Breeding*, 4, 33-58.
- Gorawar, M. M., Hegde, Y. R., & Kulkarni, S. (2006). Screening of genotypes and effect of fungicides against leaf blight of turmeric. *Indian Journal of Crop Science*, 1, 158-160.
- Grahovac, M., Indić, D., Tanović, B., Lazić, S., Vuković, S., Hrutić, J., & Gvozdenac, S. (2011). Integrated management of causal agents of postharvest fruit rot of apple. *Pesticidies and phytomedicines*, 26(4), 289-299.
- Grahovac, M., Indić, D., Lazić, S., & Vuković, S. (2009). Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. *Pesticidies and phytomedicines*, 24(4), 245-258.
- Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., & Gisi, U. (2006). Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(6), 465-472.
- Green, S., & Bailey, K. L., (2000). Influence of moisture and temperature on infection of Canada thistle by *Alternaria cirsinoxia*. *Plant Disease*, 84(10), 1126-1132.
- Grujičić, G., & Tomašević, B. (1956). Paraziti i štetočine kulturnih biljaka zapaženi u dvadesetogodišnjem periodu 1934-1953 u Jugoslaviji. *Zaštita bilja*, 38, 87-106.
- Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., & Fry, W. E. (2003). Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology*, 93(6), 738-746.

- Gulden, R. H., Warwick, S. I., & Thomas, A. G. (2008). The biology of Canadian weeds. *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 88(5), 951-996.
- Guo, C., Wang, C. M., Zhou, T. W., Jin, S. L., & Duan, C. X. (2019). First Report of Leaf Blight Caused by *Alternaria brassicicola* on *Orychophragmus violaceus* in China. *Plant Disease*, 103(5), 1031.
- Gveroska, B., & Ziberoski, J. (2012). *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. *Applied Technologies and Innovations* 7, 67–76.
- Haddad, F., Rocha, L. S., Soares, A. C. F., Martins, I. P. S., Teixeira, L. A. J., Staver, C., & Dita, M. (2016). Management of Fusarium wilt of bananas in Minas Gerais, Brazil. In *X International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Agroecological Approaches to Promote Innovative Banana* 1196, 137-146.
- Hait, G. (2002). Physiological studies on *Alternaria alternata* pathogenic to *Solanum khasianum*. *Journal of Mycopathological Research*, 40(2), 207-210.
- Han, B., Li, X., & Yu, T. (2014). Cruciferous vegetables consumption and the risk of ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies. *Diagnostic Pathology*, 9(1), 7.
- Harrison, J. G., Lowe, R., & Williams, N. A. (1994). Humidity and fungal diseases of plants—problems. In *JP Blakeman & B Williamson (eds.)*, Ecology of plant pathogens, Wallingford, CAB International, 79-97.
- Hashmi, S. I., Satwadhar, P. N., Khotpal, R. R., Deshpande, H. W., Syed, K. A., & Vibhute, B. P. (2016). Rapeseed meal nutraceuticals. *Journal of Oilseed Brassica*, 1, 43-54.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273-290.
- Hill, M. O. (1973). Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54(2), 427-432.
- Hoch, H. C., Staples, R. C., Whitehead, B., Comeau, J., & Wolf E. D (1987). Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science*, 235, 1659-1662.
- Hong, C., & Fitt, B. D. (1995). Effects of inoculum concentration, leaf age and wetness period on the development of dark leaf. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 131–151.
- Hong, S. G., Cramer, R. A., Lawrence, C. B., & Pryor, B. M. (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 119-29.
- Howell C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87, 4–10.
- Huang, F., Fu, Y., Nie, D., Stewart, J. E., Peever, T. L., & Li, H. (2015). Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. *Fungal Biology*, 119(5), 320-330.

- Hudec, K., & Roháčik, T. (2002). *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler-new pathogen on sugar beet leaf in Slovakia. *Plant Protection Science*, 38 (2), 81-82.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-4.
- Humpherson-Jones, F. M., & Phelps, K. (1989). Climatic factors influencing spore production in *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. *Annals of Applied Biology*, 114, 449-458.
- Humpherson-Jones, F. M. (1992) Epidemiology and control of dark leaf spot of brassicas. In: Chelkowski J, Visconti A, eds. *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 267-88.
- Hussein, M. A. M., Hassan, M. H. A., Allam, A. D. A., & Abo-Elyousr, K. A. M. (2007). Management of Stemphylium blight of onion by using biological agents and resistance inducers. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 35(1), 49-60.
- Iacomi-Vasilescu, B., Avenot, H., Bataille-Simoneau, N., Laurent, E., Guénard, M., & Simoneau, P. (2004). *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection*, 23(6), 481-488.
- Imtiaj, A., & Lee, T. (2008). Antagonistic effect of three *Trichoderma* species on the *Alternaria porri* pathogen of onion blotch. *World Journal of Agricultural Science*, 4, 13-17.
- Ivanović, M., & Ivanović, D. (2001). Mikoze i pseudomikoze biljaka. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Jain, S. C. (1992). Assessment of losses in taramira (*Eruca sativa* Lam) due to *Alternaria* blight disease. *Madrass Agricultural Journal*, 79(1), 57-58.
- Jasalavich, C. A., Morales, V. M., Pelcher, L. E., & Séguin-Swartz, G. (1995). Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research*, 99, 604-14.
- Jejelowo, O. A., Conn, K. L., & Tewari, J. P. (1991). Relationship between conidial concentration, germling growth, and phytoalexin production by *Camelina sativa* leaves inoculated with *Alternaria brassicae*. *Mycological Research*, 95(8), 928-934.
- Johnston, J. S., Pepper, A. E., Hall, A. E., Chen, Z. J., Hodnett, G., Drabek, J., ... & Price, H. J. (2005). Evolution of genome size in Brassicaceae. *Annals of Botany*, 95(1), 229-235.
- Johnson, R. D., Johnson, L., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H., & Kahmoto, K. (2000). Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 13, 742-753.
- Kadian, A. K., & Saharan, G. S. (1983). Symptomatology, host range and assessment of yield losses due to *Alternaria brassicae* infection in rapeseed and mustard. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 13(3), 319-323.

- Kang, C., Crous, W., Mchau, G., Serdani, M., & Song, M. (2002). Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. *Mycological Research*, 106, 1151–1162.
- Karthikeyan, M., Radhika, K., Bhaskaran, R., Mathiyazhagan, S., Sandoskumar, R., Velazhahan, R., & Alice, D. (2008). Biological control of onion leaf blight disease by bulb and foliar application of powder formulation of antagonist mixture. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(6), 407-417.
- Kaur, S., Singh, G., & Banga, S. S. (2007). Documenting variation in *Alternaria brassicae* isolates based on conidial morphology, fungicidal sensitivity and molecular profile. *Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress*, 26-30 March, Wuhan, China, 87-89.
- Keissler, K. V., (1912). *ZunKenntnis den Pilzflora Krains Beih. Beihefte zum Botanischen Zentralblatt*, 29, 395-400.
- Khan, M. R., Khan, M. M., & Mohiddin, F. A. (2010). Evaluation of Indian mustard against *Alternaria* blight. *Indian Phytopathology*, 63(1), 51-54.
- Khodke, S. W., Pawar, R. V., & Bhopale, A. A. (2000). Pathogenicity of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing leaf spot disease of chilli. *PKV Research Journal*, 24(2), 123-129.
- Kiely, T. B. (1964). Brown spot of Emperor mandarin. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 75, 854–856.
- Knežević, A., Ljevnaić-Mašić, B., & Džigurski, D. (2010). Korovi kao vektori bolesti i štetočina pri organskoj proizvodnji rukole-*Eruca vesicaria* (L.) Cav.(syn. *Eruca sativa* Miller) (*Brassicaceae* Burn., *Capparidales*). *Acta herbologica*, 19(1), 19-30.
- Kohl, J., van Tongeren, C. A. M., Groenenboom-de Haas, B. H., van Hoof, R. A., Driessen, R., & van der Heijden, L. (2010). Epidemiology of dark leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* and *A. brassicae* in organic seed production of cauliflower. *Plant Pathology*, 59, 358–367.
- Koike, S. T., Gladders, P., & Paulus, A. O. (2007). *Vegetable Diseases, A Colour Handbook*. Manson Publishing Ltd., UK.
- Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C. S., & Flaishman, M. A (1995). Surface signaling in pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 4080-4087.
- Koley, S., & Mahapatra, S. S. (2015). Evaluation of culture media for growth characteristics of causing early blight of tomato. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, S, 1, 105.
- Kolte, S.J., Awasthi, R.P., & Vishwanath (1987). Assessments of yield losses due to *Alternaria* blight in rapeseed and mustard. *Indian Phytopathology*, 40, 209–211.
- Kovačević Željko (1938). Appearance of pests and disease on cultivated plants in the regions of Sava and Vrbas in 1936, Yugoslavia. *Izv. o radu Poljoprivrednih oglednih, Kontrol i Selekt. Sta.* Book 3, 283-300.
- Kreis, R. A., Dillard, H. R., & Smart, C. D. (2016). Population diversity and sensitivity to azoxystrobin of *Alternaria brassicicola* in New York State. *Plant Disease*, 100(12), 2422-2426.

- Kubota, M., Abiko, K., Yanagisawa, Y., & Nishi, K. (2006). Frequency of *Alternaria brassicicola* in commercial cabbage seeds in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 72, 197– 204.
- Kulshreshtha, B. M., & Chauhan, R. S. (1985). Production of phytoalexins in the roots of radish (*Raphanus sativus*) after inoculation with *Alternaria alternata*. *Indian Phytopathology*, 38(2), 286-291.
- Kumar, D., Maurya, N., Bharati, Y. K., Kumar, A., Kumar, K., Srivastava, K., & Kumar, A. (2014). *Alternaria* blight of oilseed brassicas: A comprehensive review. *African Journal of Microbiology Research*, 8(30), 2816-2829.
- Laemmlen, F. (2001). *Alternaria* diseases. ANR Publication 8040, University of California.
- Langsdorf, G., Park, P., & Nishimura, S. (1991). Investigations on *Alternaria solani* Infections. *Japanese Journal of Phytopathology*, 57(1), 32-40.
- Lapis, D. B., & Ricaforte, E. T. (1974). *Alternaria* leaf spot of crucifers in the Philippines. *Philippine Agriculturist*, 58, 121–37.
- Lawrence, C. B., Mitchell, T. K., Craven, K. D., Cho, Y. R., Cramer, R. A., & Kim, K. H. (2008). At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. *The Plant Pathology Journal*, 24(2), 101-111.
- Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Peever, T. L., & Pryor, B. M. (2013). The sections of *Alternaria*: Formalizing species groups concepts. *Mycologia*, 105, 530–546.
- Lawrence, D. P., Rotondo, F., & Gannibal, P. B. (2016). Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress*, 15 (1), 3.
- Leiminger, J. H., Auinger, H. J., Wenig, M., Bahnweg, G., & Hausladen, H. (2013). Genetic variability among *Alternaria solani* isolates from potatoes in Southern Germany based on RAPD-profiles. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120(4), 164-172.
- Leiminger, J., Bäßler, E., Knappe, C., Bahnweg, G., & Hausladen, H. (2015). Quantification of disease progression of *Alternaria* spp. on potato using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 141(2), 295-309.
- Lević, J., Stanković, S. Ž., Krnjaja, V., & Bočarov-Stančić, A. S. (2009). Fusarium species: The occurrence and the importance in agriculture of Serbia. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (116), 33-48.
- Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Herak Ćustić, M., Poljak, M., & Romić, D. (2016). Povrcarstvo, Čakovec: Zrinski d.d.
- Linde, C. C., J. Zhan, & B. A. McDonald. (2002). Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology*, 92, 946–955.
- Linde, C. C., Liles, J. A., & Thrall, P. H. (2010). Expansion of genetic diversity in randomly mating founder populations of *Alternaria brassicicola* infecting *Cakile maritima* in Australia. *Applied Environmental Microbiology*, 76(6), 1946-1954.

- Liptay, Albert (1988). Broccoli. World Book, Inc.
- Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, W. H., Qi, Y. M., & Guo, H.T. (1992). Etiologic role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chinese Medical Journal*, 105, 394-400.
- Liu, X., Ling, J., Xiao, Z., Xie, B., Fang, Z., Yang, L., ... & Yang, Y. (2017). Characterization of emerging populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* causing cabbage wilt in China. *Journal of Phytopathology*, 165, 813-821.
- Logrieco, A., Moretti, A., & Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2(2), 129-140.
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., & Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18(5), 5891-5935.
- Lourenco, S. F., & Longo, M. R. (2010). General magnitude representation in human infants. *Psychological Science*, 21(6), 873-881.
- Louvet, J. (1958). The black spot disease of colza, *Alternaria brassicae*. *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*, 44, 694-701.
- Luo, Y., Hou, L., Förster, H., Pryor, B., & Adaskaveg, J. E. (2017). Identification of *Alternaria* species causing heart rot of pomegranates in California. *Plant Disease*, 101(3), 421-427.
- Luo, Y., Ma, Z., Reyes, H. C., Morgan, D. P., & Michailides, T. J. (2007). Using real-time PCR to survey frequency of azoxystrobin-resistant allele G143A in *Alternaria* populations from almond and pistachio orchards in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 328-336.
- Ma, Z., Felts, D., & Michailides, T. J. (2003). Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77(2), 66-74.
- Ma, Z., & Michailides, T. J. (2004). A real-time PCR assay for the detection of azoxystrobin-resistant *Alternaria* populations from pistachio orchards in California. *Crop Protection*, 23(12), 1259-1263.
- Mac Kinon, S. L., Keifer, P., & Ayer, W. A. (1999). Components from the phytotoxic extracts of *Alternaria brassicicola*, a black spot pathogen of canola. *Phytochemistry*, 51, 215-221.
- Macagnan, D., Chaves, Z. M., & Café-Filho, A. C. (2010). First report of *Alternaria brassicicola* on *Crambe abyssinica* in Goiás state, Brazil. *Summa Phytopathologica*, 36(3), 260.
- Maceljiski, M., Cvjetković, B., Ostojić, Z., Barčić, J., Pagliarini, N., Oštrec, Lj., & Čizmić, I. (1997): Zaštita povrća od štetočinja (štetnika, uzročnika bolesti i korova). Znanje, Zagreb.
- Maheshwari, S. K., Singh, D. V., & Sahu, A. K., (1999). Effect of several nutrient media on the growth and sporulation of *Alternaria alternata*. *Journal of Mycopathological Research*, 37(1), 21-23.
- Maiero, M., Bean, G. A., & Ng, T. J. (1991). Toxin production by *Alternaria solani* and its related phytotoxicity to tomato breeding lines. *Phytopathology*, 81, 1030-1033.

- Mamgain, A., Roychowdhury, R., & Tah, J. (2013). *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology*, 1, 1-9.
- Mandare, V., Suryawanshi, A., & Gawade, S., (2008). Studies on *Alternaria* blight of chickpea, *Agricultural Science Digest*, 28(3), 222-24.
- Marhold, K., & Lihová, J. (2006). Polyploidy, hybridization and reticulate evolution: lessons from the Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2-4), 143-174.
- Marjanović-Jeromela, A., Marinković, R., Mijić, A., Zdunić, Z., Ivanovska, S., & Jankulovska, M. (2008). Correlation and path analysis of quantitative traits in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 73(1), 13-18.
- Masangkay, R. F., Paulitz, T. C., Hallett, S. G., & Watson, A. K. (2000). Characterization of sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. *Biocontrol Science and Technology*, 10(4), 385-397.
- Mazumder, A., Dwivedi, A., & Du Plessis, J. (2016). Sinigrin and its therapeutic benefits. *Molecules*, 21(4), 416.
- McDonald, W. C. (1959). Gray leaf spot of rape in Manitoba. *Canadian Journal of Plant Science* 39, 409-16.
- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 349- 379.
- McDonald, M. V., & Ingram, D. S. (1986). Towards the selection in vitro for resistance to *Alternaria brassicicola* wilts in *Brassica napus* spp. *oleifera*, winter oilseed rape. *New Phytologist*, 104, 621-629.
- Mckenzie, K. J., Robb, J., & Lennard, J. H. (1988). Toxin production by *Alternaria* pathogens of oilseed rape (*Brassica napus*). *Crop Research*, 28, 67-81.
- Meah, M. B., Howlider, M. A. R., & Alam, M. K. (1988). Effect of fungicide spray at different time and frequencies on *Alternaria* blight of mustard. *Thai Journal of Agricultural Science*, 21, 101-107.
- Meena, P. D., Awasthi, R. P., Chattopadhyay, C., Kolte, S. J., & Kumar A. (2010). *Alternaria* blight: a chronic disease in rapeseedmustard. *Journal of Oilseed Brassica*, 1(1), 1-11.
- Meena, P. D., Jambhulkar, S. J., Gupta, R., Meena, H. S., & Singh, D. (2016). Rapid screening technique for *Alternaria* blight resistance in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) using cotyledonary leaf method. *Journal of Plant Pathology*, 98(3), 463-469.
- Meena, P. D., Chattopadhyay, C., Kumar, V. R., Meena, R. L., & Rana, U. S. (2005). Spore behaviour in atmosphere and trends in variability of *Alternaria brassicae* population in India. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 35, 511.
- Meena, P. D., Chattopadhyay, C., Singh, F., Singh, B., & Gupta, A. (2002). Yield loss in Indian mustard due to white rust and effect of some cultural practices on *Alternaria* blight and white rust severity. *Brassica*, 4: 18-24.

- Mendgen, K., & Deising, H (1993). Infection structures of fungal plant pathogens: a cytological and physiological evaluation. *New Phytology*, 124,192-213.
- Meng, J. W., Zhu, W., He, M. H., Wu, E. J., Duan, G. H., Xie, Y. K., ... & Zhan, J. (2015). Population genetic analysis reveals cryptic sex in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Scientific Reports*, 5(1), 1-10.
- Mercado Vergnes, D., Renard, M. E., Duveiller, E., & Maraite, H. (2006). Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology*, 55(4), 485-493.
- Michereff, S. J., Noronha, M. A., Xavier Filha, M. S., Câmara, M. P., & Reis, A. (2012). Survey and prevalence of species causing *Alternaria* leaf spots on brassica species in Pernambuco. *Horticultura Brasileira*, 30(2), 345-348.
- Milgroom, M. G. (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 457-477.
- Misaghi, I. J., Grogan, R. G., Duniway, J. M., & Kimble, K. A. (1978). Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 68(1), 29-34.
- Mishra, P. T., & Mishra, V. (2012). Effect of media, temperature and pH on growth of *Alternaria alternata* causing leaf spot of cotton. *Annals of Plant Protection Sciences*, 20(1), 246-247.
- Mohapatra, A., Mohanty, A. K., & Mohanty, N. N. (1977). Studies on physiology of the sesame leaf blight pathogen, *Alternaria sesami*. *Indian Phytotopathology*, 30, 332-334.
- Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, 4(1), 1-4.
- Morris, P. F., Connolly, M. S., & St Clair, D. A. (2000). Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research*, 104(3), 286-292.
- Munkvold, G. P., & Marois, J. J. (1993). Efficacy of natural epiphytes and colonizers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa dieback*. *Phytopathology*, 83(6), 624-629.
- Muntañola-Cvetković, M. (1987). *Opšta mikologija*. Književne novine.
- Murillo, G., & Mehta, R. G. (2001). Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 41(1-2), 17-28.
- Nakashima, T., Ueno, T., Fukami, H., Taga, T., Masuda, H., ..., & Osaki, K. (1985). Isolation and structures of AK-Toxin i and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Agricultural Biology and Chemistry*. 49, 807-815.
- Nakatsuka, S., Feng, B. N., Goto, T., Tsuge, T., & Nishimura, S. (1990). Biosynthesis of host-selective toxins produced by *Alternaria alternata* pathogens, 2: Biosynthetic origin of (8r,9s)9,10-epoxy-8-hydroxy-9-methyl-deca-(2e,4z,6e)-trienoic acid, a precursor of AK-toxins produced by *Alternaria alternata*. *Phytochemistry*, 29, 1529-1531.

- Narain, U., & Saksena, H. K. (1973). Occurrence of *Alternaria* leaf spot of sunflower in India. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 3(1), 115-116.
- Neergaard, P. (1945). Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Copenhagen: Einar Munksgaard.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.
- Nishimura, S., & Kohmoto, K. (1983). Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Review of Phytopathology*, 21(1), 87-116.
- Nishikawa, J., & Nakashima, C. (2020). Japanese species of *Alternaria* and their species boundaries based on host range. *Fungal Systematics and Evolution*, 5, 197-281.
- Nowakowska, M., Wrzesińska, M., Kamiński, P., Szczechura, W., Lichočka, M., Tartanus, M., Kozik, E., & Nowicki, M. (2019). *Alternaria brassicicola*–Brassicaceae pathosystem: insights into the infection process and resistance mechanisms under optimized artificial bio-assay. *European Journal of Plant Pathology*, 153(1), 131-151.
- Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1(1), 175-188.
- Otani, H., Kohmoto, K., & Kodama, M., (1995). *Alternaria* toxins and their effects on host plants. *Canadian Journal of Botany*, 73, 453-8.
- Pandey, A. (2010). Antagonism of two *Trichoderma* Species against *Alternaria alternata* on *Capsicum frutescens*. *Journal of Experimental Sciences*, 1(5), 18-19.
- Park, M. S., Romanoski, C.E., & Pryor, B. M. (2008). A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, *Alternaria radicina* and *A. carotiincultae*. *Mycologia*, 100, 511-527.
- Park, P., Nishimura, S., Kohmoto, K., Otani, H., & Tsujimoto, K. (1981). Two action sites of AM-toxin i produced by apple pathotype of *Alternaria alternata* in host cells: an ultrastructural study. *Canadian Journal of Botany*, 59(3), 301-310.
- Patale, S. S., & Mukadam, D. S. (2011). Management of plant pathogenic fungi by using *Trichoderma* species. *Bioscience Discovery Journal*, 2(1), 36-37.
- Pattanamahakul, P., & Strange, R. N. (1999). Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of Brassica species grown in Thailand. *Plant Pathology*, 48(6), 749-755.
- Peever, T. L., Canihos, Y., Olsen, L., Ibanez, A., Liu, Y. C., & Timmer, L. W. (1999). Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of Minneola tangelo and rough lemon in Florida. *Phytopathology*, 89(10), 851-860.
- Peever, T. L., Carpenter-Boggs, L., Timmer, L. W., Carris, L. M., & Bhatia, A. (2005). Citrus black rot is caused by phylogenetically distinct lineages of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 95(5), 512-518.

- Peever, T. L., Su, G., Carpenter-Boggs, L., & Timmer, L. W. (2004). Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96(1), 119-134.
- Pegg, K. G. (1996). Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal organism of brown spot of Emperor mandarin. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science*, 23, 15-28.
- Petraitiene, E., & Brazauskiene, I. (2011). Complex of major fungal diseases in winter and spring oilseed rape in Lithuania. In *International Consultative Research Group on Rapeseed. 13th International Rapeseed Congress Abstract Book 1st. Prague: Svaz Pestitelu a Zpracovatelu Olejnin* (Vol. 473).
- Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 1-11.
- Polizzotto, R., Andersen, B., Martini, M., Grisan, S., Assante, G., & Musetti, R. (2012). A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. *Journal of Microbiological Methods*, 88(1), 162-171.
- Pound, G. S., & Stahmann, M. A. (1951). The production of a toxic material by *Alternaria-solani* and its relation to the early blight disease of tomato. *Phytopathology*, 41(12), 1104-1114.
- Prakasam, V., & Sharma P. (2012) *Trichoderma harzianum* (Th-3) a potential strain to manage the purple blotch of Onion (*Allium cepa* L.) caused by *Alternaria porri* under north Indian plains. *Journal of Agricultural Science*, 4, 266–272.
- Prakash, S., & Hinata, K. (1980). Taxonomy, cytogenetics and origin of crop *Brassicacae*, a review. *Opera Botanica*, 55, 1-57.
- Pramila, P. G., Tasleem, M., Taj, G., Mal, R., & Kumar, A. (2014). Morphological, cultural, pathogenic and molecular variability amongst Indian mustard isolates of *Alternaria brassicae* in Uttarakhand. *African Journal of Biotechnology*, 13(3), 441-448.
- Price, R. A., Al-Shehbaz, I. A., & Palmer, J. D. (1994). Systematic relationships of *Arabidopsis*: a molecular and morphological perspective. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Pryor, B. & Gilbertson, R. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear *ITS* and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*, 104, 1312–1321.
- Pryor, B. & Gilbertson, R. (2002). Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae* and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics. *Mycologia*, 94 (1), 49-61
- Pryor, B. M., & Michailides, T. J. (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with Alternaria late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92(4), 406-416.
- Pryor, B. M., & Bigelow, D. M. (2003). Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia*, 95(6), 1141-1154.

- Pusz, W. (2009). Morpho-physiological and molecular analyses of *Alternaria alternata* isolated from seeds of *Amaranthus*. *Phytopathology*, 54, 5-14.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 573.
- Rahimloo, T., & Ghosta, Y. (2015). The occurrence of *Alternaria* species on cabbage in Iran. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(3), 343-350.
- Rai, P. K., & Kumari, L. (2009). Variability in *Alternaria alternata* infecting periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Progress in Agriculture*, 9, 269-272.
- Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2012). FigTree version 1.4. 0. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2009). Tracer v1. 5.0.
- Reis, A., & Boiteux, L. S. (2010). *Alternaria* species infecting Brassicaceae in the Brazilian neotropics: Geographical distribution, host range and specificity. *Journal of Plant Pathology*, 92(3), 661-668.
- Ren, X. X., Zhang, G. Z., & Dai, W. A. (2012). First report of damping-off caused by *Alternaria japonica* on chinese cabbage seedlings in China. *Plant Disease*, 96(9), 1378-1378.
- Rimmer, S. R., Shattuck, V. I., & Buchwaldt, L. (2007). Compendium of brassica diseases. American Phytopathological Society, APS Press.
- Ristić, D., Aćimović, M., & Trkulja, N. (2014). Morphological and molecular identification of *Alternaria alternata*: Caraway fruits pathogen in Serbia. *Zaštita bilja*, 65(4), 163-169.
- Ristić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Lekić, B., Nikolić, D., Adamović, D., ..., & Bulajić, A. (2010). Fungi of the genera *Alternaria* as pathogens of Pot marigold (*Calendula officinalis* L.). *X savetovanje o zaštiti bilja*.
- Roberts, R. G. (2005). *Alternaria yaliinficiens* sp. nov. on Ya Li pear fruit: from interception to identification. *Plant Disease*, 89(2), 134-145.
- Roco, A., & Pérez, L., 2001. "In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *A. alternata* in the presence of growth regulators," *Plant Biotechnology*, 4(2), 68-73.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542.
- Rop, N. K., Kiprop, E. K., & Ochudho, J.O. (2009). *Alternaria* species causing black spot disease of Brassicas in Kenya. In *African Crop Science Proceedings*, 9, 635-640.
- Rosado, I. V., Rey, M., Codón, A. C., Govantes, J., Moreno-Mateos, M. A., & Benítez, T. (2007). Cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fungal Genetics and Biology*, 44(10), 950-964.

Rosenzweig, N., Olaya, G., Atallah, Z. K., Cleere, S., Stanger, C., & Stevenson, W. R. (2008). Monitoring and tracking changes in sensitivity to azoxystrobin fungicide in *Alternaria solani* in Wisconsin. *Plant Disease*, 92(4), 555-560.

Rottem, J. (1991). Assessment of production and dispersal of inoculum of *Alternaria Macrospora* in various parts of the cotton canopy. *Phytoparasitica*, 19(2), 121-132.

Rotem, J. (1994). The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS press, St Paul, MN, USA.

Rotondo, F., Collina, M., Brunelli, A., & Pryor, B. M. (2012). Comparison of *Alternaria* spp. collected in Italy from apple with *A. mali* and other AM-toxin producing strains. *Phytopathology*, 102(12), 1130-1142.

Sadowski, C., Lukanowski, A., Lenc, L., & Trzcinski, J. (2003). Occurrence of dark leaf and pod spot on spring oilseed rape and fungi composition on harvested seeds depending on differentiated fertilization with sulphur. In *Proceedings of the 11th International Rape Congress, Copenhagen, Denmark*, 4, 1103-1105.

Saeed, M. A., Ahmad, M., & Khan, M. A., (1995). Effect of different media, temperatures, pH levels, nitrogen and carbon sources on the growth of *Alternaria alternata*. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 7(2), 210-211

Saharan, G., & Mehta, N. (2002). Fungal diseases of rapeseed mustard. *Diseases of Field Crops*, 193-228.

Saharan, G. S., Mehta, N., Meena, P. D., & Dayal, P. (2016). *Alternaria* diseases of crucifers: biology, ecology and disease management. Springer Singapore.

Sarkar, B., & Sen-Gupta, P. K. (1978). Studies on some aspects of the epidemiology of *Alternaria* leaf blight of mustard (*Brassica* sp.). *Beitrag zur tropischen Landwirtschaft und Veterinarmedizin*, 16, 91-96.

Schafer, W. (1993). The role of cutinase in fungal pathogenicity. *Trends Microbiology*, 1, 69-71.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W., (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9, 671.

Scholze, P. (2002). In-vitro-germinability of conidia and differences in aggressivity in *Alternaria brassicicola* isolates on brassicaceous vegetables (*Brassica oleracea* L.). *Pflanzenschutz Berichte*, 60, 105-114

Sempere, F., & Santamarina, M. P. (2008). Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berk., i Broome) Petch by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Currie i Thom. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 35-43.

Serdani, M., Kang, J. C., Andersen, B., & Crous, P. W. (2002). Characterization of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research*, 106, 561-569.

Shahin, E. A., & Shepard, J. F. (1979). An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. *Phytopathology*, 69, 618-620.

- Shahnaz, E., Razdan, V., Rezwi, S., Rather, T., Gupta, S., & Andrabi, M. (2012) Integrated disease management of foliar blight disease of onion: a case study of application of confounded factorials. *Journal of Agricultural Science*, 5, 17–22.
- Shannon, C. E. (2001). A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review*, 5(1), 3-55.
- Sharma, P., Deep, S., Bhati, D. S., Sharma, M., & Chowdappa, P. (2014). Penetration and infection processes of *Alternaria brassicicola* on cauliflower leaf and *Alternaria brassicae* on mustard leaf: a histopathological study. *Plant Pathology Journal*, 13(2), 100-111.
- Shiraishi, H., Enami Y., & Okano, S. (2003). *Folsomia hidakana* (Collembola) prevents damping-off disease in cabbage and Chinese cabbage by *Rhizoctonia solani*. *Pedobiologia*, 47, 33-38.
- Shrestha, S. K., Munk, L., & Mathur, S. B. (2005). Role of weather on *Alternaria* leaf blight disease and its effect on yield and yield components of mustard. *Nepal Agricultural Research Journal*, 6, 62–72.
- Siciliano, I., Gilardi, G., Ortu, G., Gisi, U., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2017). Identification and characterization of *Alternaria* species causing leaf spot on cabbage, cauliflower, wild and cultivated rocket by using molecular and morphological features and mycotoxin production. *European Journal of Plant Pathology*, 149(2), 401-413.
- Sidlauskiene, A., Rasinskiene, A., & Surviliene, E. (2003). Effect of various protection means on *Alternaria* diseases of tomato, cucumber and cabbage seed plants. *Sodininkyste-ir-Darzininkyste*, 22(3), 388-394.
- Simmons, E. G. (1967). Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia*, 59(1), 67-92.
- Simmons, E. G. (1971). *Helminthosporium allii* as type of a new genus. *Mycologia*, 63(2), 380-386.
- Simmons, E. G. (1992). *Alternaria* Taxonomy: Current Status, Viewpoint, Challenge. In *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism –132 Volume 3, eds. Chelkowski, J. and Visconti, A., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria: An Identification Manual*. CBS Biodiversity Series, 6, 1-775.
- Simmons, E. G. (2002). *Alternaria* themes and variations (287–304). Species on *Caryophyllaceae*. *Mycotaxon*, 82, 1–40.
- Singh, B. P., Singh, S. P., Mohammad, A., Singh, P. C., & Singh, D. (2006). *In vitro* evaluation of fungicides against *Alternaria alternata*. *Annals of Plant Protection Sciences*, 14(2), 500-502.
- Singh, R. C., Mohan, C., & Sharma, V. K. (2012). Morphological and pathological variations in isolates of *Alternaria brassicae* causing leaf blight of rapeseed and mustard. *Plant Disease Resistance*, 27, 22–27.
- Singh, V. (2015). *Alternaria* diseases of vegetable crops and its management control to reduce the low production. *International Journal of Agriculture Sciences*, 7(13), 834-840.
- Sitepu, K., & Wallace, H. R. (1984). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce by *Fusarium lateritium*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 24(125), 272-276.

- Skiles, R. L. (1953). Purple and brown blotch of onions. *Phytopathology*, 43(8), 409-412.
- Smith, J. M. (1982). *Evolution and the Theory of Games*. Cambridge University Press.
- Sochting, H. P., & Verreet, J. A. (2004). Effects of different cultivation systems (soil management, nitrogen fertilization) on the epidemics of fungal diseases in oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *napus*). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111, 1-29.
- Sofi, T. A., Beig, M. A., Dar, G. H., Ahmad, M., Hamid, A., Ahangar, F. A., ..., & Shah, M. D. (2013). Cultural, morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria mali* associated with *Alternaria* leaf blotch of apple. *African Journal of Biotechnology*, 12(4).
- Sommer, N. F. (1985). Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7(3), 331-339.
- Srivastava, M., Gupta, S. K., Saxena, A. P., & Shittu, L. A. J. (2011). A review of occurrence of fungal pathogens on significant brassicaceous vegetable crops and their control measures. *Asian Journal of Agricultural Sciences*, 3(2), 70-79.
- Statistički godišnjak Srbije (2016, 2018). <https://data.stat.gov.rs/Home/Result/130102?languageCode=sr-Cyrl>
- Stavelly, J. R., & Slana, L. J. (1971). Relation of leaf age to the reaction of tobacco to *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 61(1), 73-78.
- Stevens, R. B. 1981. *Mycology guidebook*. University of Washington Press, Seattle.
- Stewart, J. E., Timmer, L. W., Lawrence, C. B., Pryor, B. M., & Peever, T. L. (2014). Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 38.
- Stoddart, J. A., & Taylor, J. F. (1988). Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics*, 118(4), 705-711.
- Stonehouse, D. (2000). *Alternaria* Black Spot Is Still Out There. *Canola Guide*, 8(4), 17.
- Szczygłowska, M., Piekarska, A., Konieczka, P., & Namieśnik, J. (2011). Use of brassica plants in the phytoremediation and biofumigation processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7760-7771.
- Škrinjar, M. M., Magyar, M., & Kocić-Tanackov, S. D. (2005). Barley kernels as a source of contamination of feed mixtures with fungi and ochratoxin A. *Tehnologija mesa*, 46(5-6), 301-305.
- Tal, B., & Robeson, D. J. (1986). The metabolism of sunflower phytoalexins ayapin and scopoletin: plant-fungus interactions. *Plant Physiology*, 82(1), 167-172.
- Tamayo, M. P. J., Becerra, V. D. C., & Jaramillo, N. J. E. (2001). *Alternaria brassicae*, causal agent of head rot in cauliflower (*Brassica oleraceae* L. var. *botrytis* L.). *ASCOLFI Informa*, 27(2), 10-11.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Taşcă, G., & Trandaf, F. (1984). Efficacy of pre-harvest treatment with fungicides in reducing cabbage decay during storage. *Lucrari Științifice, Institutul de Cercetări și Proiectări pentru Valorificarea și Industrializarea Legumelor și Fructelor*, 15, 89-93.
- Thind, T. S., & Jhooty, J. S. (1982). Studies on spray schedule of Dithane M-45 and Blitox against early blight of potato. *Journal of the Indian Potato Association*, 9 (1), 28-35
- Thomma, B. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 226-236.
- Thrall, P. H., & Burdon, J. J. (2005). Genetic structure of populations of *Alternaria brassicicola* suggests the occurrence of sexual recombination. *Mycological Research*, 109(2), 227-236.
- Thrall, P. H., Barrett, L. G., Burdon, J. J., & Alexander, H. M. (2005). Variation in pathogen aggressiveness within a metapopulation of the *Cakile maritima*-*Alternaria brassicicola* host-pathogen association. *Plant Pathology*, 54(3), 265-274.
- Thrall, P. H., Burdon, J. J., & Bock, C. H. (2001). Short-term epidemic dynamics in the *Cakile maritima*-*Alternaria brassicicola* host-pathogen association. *Journal of Ecology*, 89(5), 723-735.
- Tidwell, T. E., Blomquist, C. L., Rooney-Latham, S., & Scheck, H. J. (2014). Leaf spot of arugula, caused by *Alternaria japonica*, in California. *Plant Disease*, 98(9), 1272-1272.
- Tohyama, A., & Tsuda, M. (1995). *Alternaria* on cruciferous plants. 4. *Alternaria* species on seed of some cruciferous crops and their pathogenicity. *Mycoscience*, 36(3), 257-261.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., ..., & Otani, H. (2013). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 44-66.
- Tsunoda, S. (1980). Eco-physiology of wild and cultivated forms in Brassica and allied genera. *Eco-physiology of wild and cultivated forms in Brassica and allied genera.*, 22, 109-120.
- USDA, 2018- [USDA-oilseeds world trade markets and trade-2018, page 20](#).
- Van der Waals, J. E., Korsten, L., & Slippers, B. (2004). Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease*, 88(9), 959-964.
- Van Shreven, D. A. (1953). *Alternaria*, *Stemphylium* and *Botrytis* infection of colza (*Brassica napus*). *Tizdschr. Planterzickten*, 59, 105-136.
- Vannacci, G., & Harman, G. E. (1987). Biocontrol of seed-borne *Alternaria raphani* and *A. brassicicola*. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(10), 850-856.
- Vega, B., & Dewdney, M. M. (2014). Distribution of QoI resistance in populations of tangerine-infecting *Alternaria alternata* in Florida. *Plant Disease*, 98(1), 67-76.

- Verma, P. R., & Saharan, G. S. (1994). *Monograph on Alternaria Diseases of Crucifers. Technical Bulletin 1994-6E*. Saskatoon, Canada: Agriculture and Agri-Food Canada.
- Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., & Arora, S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates—A review. *LWT-Food Science and Technology*, 42(10), 1561-1572.
- Vlajić, S., Maširević, S., Barać, R., Iličić, R., Gvozdanović-Varga, J., & Božić, V. (2017). Bolesti kupusa tokom 2016. godine. *XXII Savetovanje o biotehnologiji, Zbornik radova I, Čačak*, 10-11.
- Vloutoglou, I., Fitt, B. D., & Lucas, J. A. (1999). Infection of linseed by *Alternaria linicola*; effects of inoculum density, temperature, leaf wetness and light regime. *European Journal of Plant Pathology*, 105(6), 585-595.
- Vukojevic, J., i Duletić-Laušević, S. (2004). Patogene gljive povrća i voća u Srbiji. NNK International, Beograd, 14-16.
- Walters, S. A., & Wahle, E. A. (2010). Horseradish production in Illinois. *Hort Technology*, 20(2), 267-276.
- Wang, H., Jones, C., Ciacci Zanella, J., Holt, T., Gilchrist, D. G., & Dickman, M. B. (1996). Fumonisin and *Alternaria alternata lycopersici* toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93, 3461-3465.
- Wang, L. Y., Hou, X.-L., & Chen, X.-F. (2009). Study on mechanism of induced resistance to black spot disease by SA in non-heading Chinese cabbage. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 32(4), 23-27.
- Wang, X. F., Li, Z. A., Tang, K. Z., Zhou, C. Y., & Yi, L. (2010). First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Yunnan Province, China. *Plant Disease*, 94(3), 375-375.
- Warwick, S. I. (2011). Brassicaceae in agriculture. In *Genetics and Genomics of the Brassicaceae* Springer, New York, NY, 33-65.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22, 837-845
- Wessels, J. G. H. (1996). Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends in Plant Science*, 1, 9-15.
- Whiteside, J. (1976). A newly recorded *Alternaria*-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. *Plant Disease Report*, 60, 326-329.
- Wiltshire, S. P. (1933). The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 18(2), 135-139.
- Wiltshire, S. P. (1947). Danish Work on *Alternaria* and *Stemphylium*. *Nature*, 160(4062), 313-314.

- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171–212.
- Woudenberg, J. H. C., Truter, M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2014). Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Studies in Mycology*, 79, 1-47.
- Woudenberg, J. H. C., van der Merwe, N. A., Jurjević, Ž., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2015). Diversity and movement of indoor *Alternaria alternata* across the mainland USA. *Fungal Genetics and Biology*, 81, 62-72.
- Woudenberg, J. H., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., de Vries, M., Stielow, J. B., Thomma, B. P., & Crous, P. W. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, *formae speciales* or pathotypes? *Studies in Mycology*, 82, 1–21.
- Yuan, M. X., Huang, X. N., Han, S. Y., Xi, Y., & Weng, H. B. (2008). Progress in natural vitamin E [J]. *Journal of Biology*, 2008-3.
- Zhu, X. Q., & Xiao, C. L. (2015). Phylogenetic, morphological, and pathogenic characterization of *Alternaria* species associated with fruit rot of blueberry in California. *Phytopathology*, 105, 1555-1567.
- Zhu, Y., Lujan, P., Dura, S., Steiner, R., Zhang, J., & Sanogo, S. (2019). Etiology of *Alternaria* Leaf Spot of Cotton in Southern New Mexico. *Plant Disease*, 103(7), 1595-1604.

BIOGRAFIJA

Jovana D. Blagojević je rođena 11. decembra 1987. godine u Beogradu gde je završila osnovnu školu „Josif Pančić“ i XIII beogradsku gimnaziju, prirodni smer. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, upisala je 2006/2007. godine na smeru biologija. Diplomirala je 2012. godine, na modulu mikrobiologija, sa prosečnom ocenom 9,42 i odbranjenim diplomskim radom pod nazivom „Morfo-fiziološka i molekularna karakterizacija izolata *Cercospora beticola* u Srbiji”. Na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je 2013. godine upisala doktorske studije, studijski program Biologija, modul eksperimentalna mikologija.

Od 2012. godine radi kao istraživač pripravnik u Odseku za bolesti bilja na Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, a od 2013. godine je stipendista Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja. Kao istraživač saradnik zaposlena je 2016. u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odseku za bolesti bilja u Topčideru, u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije TR 31-018- „Razrada integrisanog upravljanja i primene savremenih principa suzbijanja štetnih organizama u zaštiti bilja“.

Oblast naučnog interesovanja Jovane Blagojević je populaciona genetika gljiva, biološka kontrola i epidemiologija bolesti uzrokovanih fitopatogenim gljivama. Publikovala je 14 radova, od čega 11 u naučnim časopisima međunarodnog značaja

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Благојевић Д. Јована

Број индекса БИ3053/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Морфо-физиолошка и молекуларна карактеризација врста рода *Alternaria*,
патогена биљака фамилије Brassicaceae у Србији**

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Благојевић Д. Јована

Број индекса БИ3053/2012

Студијски програм Биологија; Експериментална микологија

Наслов рада **Морфо-физиолошка и молекуларна карактеризација врста рода *Alternaria*, патогена биљака фамилије Brassicaceae у Србији**

Ментор др. Жарко Ивановић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Морфо-физиолошка и молекуларна карактеризација врста рода *Alternaria*, патогена биљака фамилије Brassicaceae у Србији

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.