

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Миле Граховац, дипл.инж – мастер

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
1. Датум и орган који је именовео комисију 27.12.2013., Наставно-научно веће Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду
2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: 1. Др Стеван Маширевић, редовни професор, ужа н.о. Фитопатологија, 14.02.2008., Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет 2. Др Јелица Балаж, професор у пензији, ужа н.о. Фитопатологија, 16.01.1997., Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет 3. Др Душанка Инђић, редовни професор, ужа н.о. Фитофармација, 22.05.2006., Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет 4. Др Зоран Кесеровић, редовни професор, ужа н.о. Воћарство, 20.02.2004., Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет 5. Др Јелена Додић, ванредни професор, ужа н.о. Биотехнологија, 15.10.2012., Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
1. Име, име једног родитеља, презиме: Мила, Слободан, Граховац
2. Датум рођења, општина, држава: 13.06.1983., Нови Сад, Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет студијски програм Заштита биља – основне академске студије студијски програм Фитомедицина – мастер студије Дипломирани инжењер агрономије - мастер
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2009. година, Агрономија
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: Биолошко сузбијање <i>Colletotrichum spp.</i> паразита ускладиштених плодова јабуке
IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
Докторска дисертација садржи 171 страну, 2 једначине, 54 табеле (укључујући 4 табеле у прилогу), 10 графикона, 36 слика и 226 литературних навода. Дисертација садржи уобичајена поглавља и то: 1. Увод написан на 3 стране; 2. Преглед литературе написан на 19 страна; 3. Задаци и циљеви истраживања написани на 1 страни; 4. Радне хипотезе написане на 1 страни; 5. Материјал и методе написани на 23 стране;

6. **Резултати** приказани на 74 стране;
7. **Дискусија** приказана на 25 страна;
8. **Закључак** написан на 2 стране;
9. **Литература** написана на 13 страна;

Прилози су дати на 7 страна.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Увод даје кратак преглед значаја и штетности патогена из рода *Colletotrichum* у свету и код нас. Укратко су представљене најзначајније методе идентификације врста из овог рода које су полазна основа за њихово успешно сузбијање. Истакнут је значај молекуларних метода идентификације. Посебан осврт дат је на значај имплементације биолошких мера сузбијања ових патогена у програме заштите. У овом смислу, јасно су дефинисани задаци и циљеви истраживања.

Преглед литературе обухвата разматрања економског значаја *Colletotrichum* spp. и њихове штетности на јабуци. Детаљно је приказана историја класификације, филогенетска позиција рода и најзначајније категорије. Актуелност проблема утврђивања прецизне систематске позиције рода *Colletotrichum* подржана је публикованим истраживањима најскоријег датума. Размотрен је изглед симптома које ови патогени проузрокују на плодовима јабуке и досадашња сазнања о епидемиологији. Дат је преглед достигнућа из области идентификације врста *C. acutatum* и *C. gloeosporioides*, са посебним освртом на молекуларне методе. Посебно је образложен значај редуковане примене хемијских мера сузбијања фитопатогених организама. Указано је на висок потенцијал бактерија из родова *Streptomyces* и *Bacillus*, и етарских уља као биолошких агенаса за сузбијање фитопатогених организама. Дат је и посебан осврт на методу одзивне површине функције и њену примену у оптимизацији услова за култивацију агенаса за примену у биолошкој заштити биља. На овај начин су јасно презентована објављена сазнања у испитиваној области коришћена приликом постављања хипотеза и тумачења резултата.

У поглављу **Материјал и методе** дат је детаљан опис примењених метода, начина изолације патогена, формирања моноспоријалних изолата, провере патогености изолата и реизолата и формирања колекције моноспоријалних изолата. Описане су методе коришћене приликом испитивања морфолошких и физиолошких одлика изолата. Затим је описана изолација ДНК и молекуларне технике примењене приликом идентификације *C. acutatum* и *C. gloeosporioides*. Јасно је приказана метода израде филогенетских стабала на основу анализе ITS секвенци. Представљен је начин припреме инокулума и хранљивих подлога, услова производње култивационих течности микроорганизама и радних течности фунгицида. Детаљно су приказане методе коришћене приликом *in vitro* и *in vivo* испитивања активности микроорганизама и етарских уља на изолате *Colletotrichum* spp. као и начини статистичке обраде података. Јасно је приказан експериментални план примењен у огледима оптимизације, као и метод одзивне површине и метода жељене функције које су примењене у циљу максимизовања антифунгалног деловања *S. hygroscopicus*.

Резултати и дискусија. Редослед приказаних резултата прати ток научног истраживања. Остварени резултати тумаче се јасно и пореде са великим бројем литературних навода.

- Најпре су приказани резултати изолације из узоркованих плодова, патогеност добијених изолата и установљене морфолошке и физиолошке одлике истих.
- У наставку су приказани резултати молекуларне идентификације, најпре применом прајмера специфичних за врсту, а затим и филогенетске анализе ITS секвенци.
- Приказане су могућности сузбијања ових патогена микроорганизмима и етарским уљима. Антифунгални ефекти постигнути применом различитих микроорганизама упоређени су са ефектима комерцијалних фунгицида *in vitro* и *in vivo*. На основу статистичке обраде добијених резултата, извршен је одабир микроорганизама који испољава најјаче антифунгално деловање. За одабрани микроорганизам (*S. hygroscopicus*) извршена је оптимизација састава хранљиве подлоге и трајања култивације у циљу максимизовања антифунгалног деловања на *C. acutatum* и *C. gloeosporioides*.
- Резултати су обрађени поузданим статистичким методама и јасно су приказани табеларно и графички.

Закључак је изведен јасно и концизно и одговара постављеном циљу докторске дисертације.

Литература даје јасан и прецизан приказ коришћених литературних навода.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

1. **Граховац, М.**, Инђић, Д., Вуковић, С., Хрустић, Ј., Гвозденац, С., Михајловић, М., Тановић, Б. (2012): Morphological and ecological features as differentiation criteria for *Colletotrichum* species. *Žemdirbyste=Agriculture*, vol. 99, No. 2, 189-196. **M23**
2. **Граховац, М.**, Балаж, Ј., Граховац, Ј., Додић, Ј., Тановић, Б., Хрустић, Ј., Тадијан, И. (2014): Screening of antagonistic activity of selected microorganisms against apple rot pathogens. *Romanian Biotechnological Letters*, *in press*. **M23**
3. **Граховац, М.**, Инђић, Д., Тановић, Б., Лазић, С., Вуковић, С., Хрустић, Ј., Гвозденац, С. (2011): Интегрална заштита јабука од проузроковача трулежи у складиштима. Пестициди и фитомедицина, 26(4), 289-299. **M24**
4. **Граховац, М.**, Граховац, Ј., Тадијан, И., Додић, Ј., Балаж, Ј. (2013): Possibility of biofungicide production from waste glycerol, *Book of Proceedings, 2nd International Conference: WASTES: Solutions, Treatment and Opportunities*, Брага, Португал, 311-316. **M33**
5. **Граховац, М.**, Хрустић, Ј., Тановић, Б., Инђић, Д., Вуковић, С., Михајловић, М., Гвозденац, С. (2012): *In vitro* effects of essential oils on *Colletotrichum* spp. Role of research in sustainable development of agriculture and rural areas 2012, 23 – 26 May, Podgorica, Montenegro. *Book of Abstracts*, 135. **M34**
6. **Граховац, М.**, Балаж, Ј., Граховац, Ј., Додић, Ј., Тановић, Б., Хрустић, Ј., Иличић, Р. (2013): Potential of some microorganisms in control of apple rot pathogens, „2013 EFFoST Annual Meeting: Bio-based Technologies in the Context of European Food Innovation Systems“, Болоња, Италија. **M34**
<https://elsevier.conference-services.net/secureProgrammeLogin.asp?conferenceID=3594>
7. **Граховац, М.**, Граховац, Ј., Тадијан, И., Додић, Ј., Балаж, Ј. (2013): Possibility of biofungicide production from waste glycerol, *Book of Abstracts, 2nd International Conference: WASTES: Solutions, Treatment and Opportunities*, Брага, Португал, 117. **M34**
8. **Граховац, М.**, Инђић, Д., Лазић, С., Вуковић, С. (2009): Биофунгициди и могућности примене у савременој пољопривреди. Пестициди и фитомедицина, 24 (4), 245-258. **M51**
9. **Граховац, М.**, Хрустић, Ј., Тановић, Б., Инђић, Д., Вуковић, С., Михајловић, М., Гвозденац, С. (2012): *In vitro* effects of essential oils on *Colletotrichum* spp. *Agriculture & Forestry*, Vol. 57. (11) Issue 4: 7-15. **M51**
10. **Граховац, М.**, Инђић, Д., Балаж, Ј., Вуковић, С., Тановић, Б., Хрустић, Ј., Танасковић, С. (2012): Фитопатогене гљиве рода *Colletotrichum* spp. на воћним врстама. *Биљни лекар*, 1, 28-38. **M52**
11. Тановић, Б., Гашић, С., Делибашић, Г., Хрустић, Ј., Михајловић, М., **Граховац, М.** (2013): Перспективе развоја и примене биофунгицида у заштити биља. *Зборник радова 10. Симпозијума о заштити биља у Босни и Херцеговини, Сарајево*, 93. **M62**
12. **Граховац, М.**, Тановић, Б., Хрустић, Ј., Инђић, Д., Вуковић, С. (2010): Патогени из рода *Colletotrichum* на ускладиштеним плодовима јабуке. *X Саветовање о заштити биља, Златибор*, 28. новембар – 3. децембар, *Зборник резимеа*, 28. **M64**
13. Тановић, Б., Гашић, С., Хрустић, Ј., Михајловић, М., **Граховац, М.**, Делибашић, Г. (2013): Ефекти различито формулисаних биопестицида на фитопатогене гљиве. *Зборник резимеа радова 12. саветовања о заштити биља, Златибор*, 151-152. **M64**
14. Граховац, Ј., **Граховац, М.**, Додић, Ј., Балаж, Ј., Тадијан, И. (2013): Potential of *Streptomyces* sp. in control of apple rot pathogens, *Alumni Meeting of International Summer Schools Novi Sad, 2013, Novi Sad, Serbia*, 15. **M64**

15. Граховац, Ј., Додић, Ј., Граховац, М., Балаж, Ј., Вучуровић, Д. (2013): Оптимизација култивационог медијума за роизводњу антагонисте складишних патогена јабуке. Књига извода из саопштења, Шести научно-стручни скуп „InterRegioSci 2013“, Нови Сад, Србија, 55. М64

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Најзначајнији закључци, односно резултати спроведених истраживања су:

- Патогени из рода *Colletotrichum* су редовно присутни на ускладиштеним плодовима јабуке у Војводини, као и у деловима западне, централне и југоисточне Србије. Њихова заступљеност међу осталим проузроковачима трулежи је 7,8 – 10%.
- На основу изгледа колонија на испитиваним хранљивим подлогама јасно се издвајају четири морфолошке групе изолата из рода *Colletotrichum*. На основу раста на различитим подлогама, при различитим температурама и брзини раста на КДА подлози, издвајају су се две групе изолата: Прву групу чине изолати I, II и III морфолошке групе који најинтензивније расту на подлози V8 а најспорије на подлози SDA, расту на температури од 5 °C а не расту на температури од 35 °C, и генерално имају спорији пораст у односу на изолате IV морфолошке групе. Другу групу чине изолати IV морфолошке групе који имају најинтензивнији пораст на подлози SDA, не расту на 5 °C степени, а расту на 35 °C. Морфологија конидија је варијабилна између установљених морфолошких група.
- Применом прајмера специфичних за врсту и методе ланчане реакције полимеразе изолати I, II и III морфолошке групе идентификовани су као *C. acutatum* чиме је потврђено постојање велике морфолошке варијабилности у оквиру ове врсте. Изолати IV морфолошке групе идентификовани су као *C. gloeosporioides*. Идентификација до нивоа врсте применом прајмера специфичних за врсту потврђена је анализом ITS секвенци. Истом анализом утврђене морфолошке групе у оквиру врсте *C. acutatum* успешно су раздвојене, те је показано да ова молекуларна техника може бити коришћена за детектовање варијабилности у оквиру врсте. Утврђено је да је врста *C. acutatum* чешће присутна на ускладиштеним плодовима јабуке у односу на *C. gloeosporioides*. Ова појава је објашњена осетљивошћу врсте *C. gloeosporioides* на ниске температуре и све интензивним складиштењем плодова јабуке под оваквим условима.
- Од испитаних 10 микроорганизама, *S. hygroscopicus* је испољио најјаче антифунгално деловање на *C. acutatum* и *C. gloeosporioides*. Хранљива подлога оптималног састава за култивацију овог микроорганизама у циљу максимизовања његове антифунгалне активности као извор угљеника треба да садржи 15,07 г/л глицерола, као извор азота 5,28 г/л екстракта квасца, а садржај фосфата треба да износи 0,81 г/л. Оптимално трајање култивације је 3 до 4 дана. Антифунгално деловање овог микроорганизама засновано је на термостабилним производима метаболизма. Двомесечно складиштење третираних плодова јабуке на ниској температури не умањује антифунгалну активност овог микроорганизама.
- Испарљива фаза етарског уља дивљеог оригана, од 56 испитаних етарских уља, испољила је најизраженије антифунгално деловање. Минималан период експозиције испарљивој фази овог уља за постизање леталног ефекта при концентрацији од 0,02 μl/ml ваздуха износи седам дана.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Резултати су графички и табеларно јасно и прегледно приказани. Приказ резултата је подељен у стручно конципиране, делове који, сваки за себе, представља целину из које произилазе одговарајући закључци. Резултати су дискутовани са научног, биотехнолошког, статистичког и аспекта примене у пракси. Тумачење резултата је студиозно и детаљно уз поређења са сазнањима објављеним у области идентификације и биолошких мера сузбијања врста из рода *Colletotrichum*. Из наведених разлога, оцена начина приказа и тумачења резултата истраживања је позитивна.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме
Докторска дисертација је у потпуности урађена и написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе
Дисертација садржи све битне елементе научног рада укључујући детаљан приказ владајућих ставова у области која је предмет изучавања у дисертацији, у оквиру теоријског дела, затим оригиналног приступа у изведеном експерименталном делу рада и коректно изведене закључке.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци
Спроведеним миколошким, фенотипским и генетичким истраживањима установљена је поузданост различитих метода идентификације испитиваних патогених врста, што је изузетно значајно за њихово успешно сузбијање.

Оригиналан допринос ове докторске дисертације се огледа и у генетичкој карактеризацији патогена из рода *Colletotrichum* присутним на ускладиштеним плодовима јабуке широм Р. Србије, која до сада није извршена.

Уочено антифунгално деловање испитаних микроорганизама на *C. acutatum* и *C. gloeosporioides* указало је на перспективне агенсе који обезбеђују задовољавајућу заштиту ускладиштених плодова јабуке од ових патогена.

Примењен Вох–Benken-ов експериментални план, метода одзивне површине и метода жељене функције за дефинисање оптималних извора азота, угљеника и фосфора и њихових количина у подлози за култивацију *S. hygroscopicus* у циљу максимизовања антифунгалног деловања, и експериментална потврда валидности добијених резултата, представља добру основу за увећање размера процеса производње метаболита овог микроорганизма до индустријских.

Утврђено је да од 56 испитаних етарских уља, испарљива фаза етарског уља органа испољава најјаче антифунгално деловање на испитиване патогене.

Добијени резултати антифунгалног деловања микроорганизама и етарских уља представљају значајан допринос одрживом развоју пољопривредне производње и досадашњим научним сазнањима у области биолошке заштите ускладиштених плодова јабуке од проузроковача трулежи из рода *Colletotrichum*.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања
Недостаци дисертације нису уочени.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија констатује да је докторска дисертација Миле Граховац, дипл. инж-master у потпуности остварила постављене циљеве истраживања, као свеобухватан истраживачки рад у домену могућности биолошке заштите плодова јабуке од проузроковача трулежи из рода *Colletotrichum*. Аналитички приступ проблему, изузетно познавање како теоријских поставки тако и експерименталних техника, примена савремених метода и детаљан увид у друга сазнања објављена у литератури само су неке карактеристике овог рада.

Комисија једногласно предлаже да се докторска дисертација Миле Граховац, дипл. инж-master под називом "Биолошко сузбијање *Colletotrichum* spp. паразита ускладиштених плодова јабуке" прихвати, а кандидату одобри одбрана.

Датум: 21.02.2014.

Проф. др Стеван Маширевић, редовни професор

Проф. др Јелица Балаж, професор у пензији

Проф. др Душанка Инђић, редовни професор

Проф. др Зоран Кесеровић, редовни професор

Проф. др Јелена Додић, ванредни професор

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.

ПРИЛОГ:

Потврда о прихватању рада за штампу

Граховац, М., Балаж, Ј., Граховац, Ј., Додић, Ј., Тановић, Б., Хрустић, Ј., Тадијан, И. (2014): Screening of antagonistic activity of selected microorganisms against apple rot pathogens. Romanian Biotechnoogical Letters, *in press*. **M23**



UNIVERSITY OF BUCHAREST

Bd. Mihail Kogălniceanu, Nr. 36-46, Sector 5,
Cod poștal 050107, București, România
Tel: +40(21)307 73 70; +40(21) 307 73 47;
Fax: +40(1)313 95 75.
<http://www.unibuc.ro>

Romanian Biotechnological Letters Editorial Board

Dear Authors,

We are pleased to inform that your article, attached to this message, is accepted for publication in Vol.19, No. 1 / 2014 of Romanian Biotechnological Letters Journal.

In order to be published please pay 50 EURO + bank fees (bank transfer fee to be supported by the payer) in the following bank account:

**UNIVERSITY OF BUCHAREST
REGISTERED NO.:4505502
Bank account: RO87RNCB0076010452620003
Swift: RNCBROBU
ROMANIAN COMMERCIAL BANK
Sector 5, BUCHAREST, ROMANIA**

**We are kindly asking you to inform us by mail (proof of payment) after the transfer was done at: mirela_diaconescu@yahoo.com, iulicul@yahoo.com
Also please make the final review of your manuscript before publication.**

The final version must be sent together with the proof of payment.

I wait the payment proof and the final form of the article latest February 1, 2014.

Bucharest – January 20, 2014

Best regards,

**Eng. Mirela Diaconescu
Romanian Biotechnological Letters Journal**