

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.09.2020. године, прихваћен је извештај ментора, др Жарка Ивановића и др Јелене Вукојевић, да је урађена докторска дисертација кандидаткиње **Јоване Д. Благојевић**, истраживача сарадника у Одсеку за болести биља, Института за заштиту биља и животну средину под насловом „**Морфо-физиолошка и молекуларна карактеризација врста рода *Alternaria*, патогена биљака из фамилије Brassicaceae у Србији**“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Жарко Ивановић, виши научни сарадник, Институт за заштиту биља и животну средину, др Јелена Вукојевић, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, и др Милица Љаљевић Грбић, ванредни професор, Универзитет у Београду- Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи:

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Јоване Д. Благојевић**, под насловом „**Морфо-физиолошка и молекуларна карактеризација врста рода *Alternaria*, патогена биљака из фамилије Brassicaceae у Србији**“, је написана на укупно 129 страна компјутерски обрађеног текста. Пагинирани текст (113 страна) садржи Биографију (1 страна) и 7 поглавља докторске дисертације (112 страна): Увод (17 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (9 страна), Резултати (44 стране), Дискусија (15 страна), Закључак (2 стране), Литература (24 стране). Дисертација садржи 12 табела (1 у поглављу Увод, 11 у поглављу Резултати) и 24 слике (24 у поглављу Резултати). Поглавље Литература садржи 349 библиографске јединице које се адекватно наводе у тексту. Непагинирани текст (16 страна) обухвата насловне стране и сажетке на српском и енглеском језику, листу ментора и чланова комисије, захвалницу, садржај и прилоге (изјава о ауторству, изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјава о коришћењу).

#### Анализа докторске дисертације:

У докторској дисертацији кандидаткиња **Јована Д. Благојевић** је проучавала присуство, морфо-физиолошке особине као и интер- и интрагенетичку варијабилност врста рода *Alternaria*, проузроковача лисне пегавости биљака из фамилије Brassicaceae, у главним производним регионима у Србији у периоду од 2013. до 2016. године. Испитивана је и патогеност изолата и број биљака домаћина, као и осетљивост патогена *Alternaria brassicicola* на дејство фунгицида из групе азоксистробина. Додатно, проучавала је антагонистичко деловање сапробних изолата гљива са

купусњака на најзначајније патогене ових биљака, као потенцијалног вида биолошке борбе.

Поглавље **УВОД** садржи седам тематских целина у којима је аргументована проблематика докторске дисертације и истакнута њена релевантност. У првом потпоглављу је представљен економски, нутритивни и медицински значај биљака из фамилије Brassicaceae као и историјски осврт на порекло и значај ових биљака. Друго потпоглавље обухвата детаљнији преглед и опис економски најзначајнијих врста и сорти купусњака и обим производње ових биљака у Србији и свету. У трећем потпоглављу наведене су најчешће болести купусњака изазване фитопатогеним гљивама међу којима су и врсте рода *Alternaria*: опис симптома, патогенеза и економски значај. Главне карактеристике врста рода *Alternaria* описане су у четвртном потпоглављу где је у првој целини овог потпоглавља детаљно представљен опсег домаћина, изглед симптома, епидемиологија као и циклус болести према фазама патогенезе а у другој је приказан историјат истраживања рода *Alternaria*, преглед резултата филогенетских студија и наведене су главне филогрупе у оквиру овог рода, према досадашњим литературним подацима. У петом потпоглављу је указано на економске штете изазване губитком приноса култура купусњака у свету насталих под утицајем заразе патогеним *Alternaria* spp. У шестом потпоглављу истакнут је значај проучавања генетичке варијабилности популација патогена и употреба микросателитских маркера у ове сврхе. У седмом потпоглављу представљене су најчешће примењиване хемијске (посебно примена фунгицида из групе азоксистробина) и биолошке (посебно примена корисних микроорганизама) мере контроле патогених врста рода *Alternaria* на купусњачама.

У поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** постављено је осам циљева који се односе на карактеризацију болести у засадима купусњака, изолацију и идентификацију патогена до нивоа врсте, како морфолошком тако и молекуларном карактеризацијом изолата. Један од циљева био је и испитивање утицаја хранљивих подлога и температуре, као важног еколошког фактора, на морфологију колонија и конидија ових врста. Осим утврђивања таксономске припадности и генетичке варијабилности изолата, формулисани циљ је био и провера осетљивости патогена на рутински примењиване комерцијалне фунгициде - азоксистробине. Завршни циљ рада је обухватио испитивање потенцијалног антагонистичког деловања одабраних сапробних врста родова *Trichoderma* и *Fusarium* као алтернативне методе биолошке борбе тј. сузбијања патогених врста рода *Alternaria*.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** налази се десет потпоглавља. У првом потпоглављу је описан начин прикупљања биљног материјала са симптомима болести код уљане репице, рена, купуса, броколија, карфиола, келерабе и кеља са 24 локалитета на територији Србије и утврђивање учесталости појаве болести. У другом потпоглављу детаљно су представљене фитопатолошке методе коришћене за изолацију патогена, добијање чистих култура, формирање и чување колекције изолата проузроковача лисне пегавости купусњака у Србији. У трећем потпоглављу описано је гајење испитиваних *Alternaria* spp. на V8 подлози као и праћене макроскопске (стопа раста, текстура, боја и изглед ивице колоније) и микроскопске (димензије конидија и врата конидија) карактеристике проучаваних колонија. Описана је и метода прављења суспензије спора и микроскопских препарата. У четвртном потпоглављу представљена је метода коришћена за испитивање утицаја састава хранљиве подлоге и температуре на изглед колонија, стопу раста, интензитет спорулације, дужину конидија и врата конидија испитиваних изолата. Наведене су тестиране подлоге и њихов састав (V8, MA, PDA и

CZ) и вредности температуре (0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C и 40 °C). У потпоглављу пет описане су методе за проверу патогености изолованих врста *Alternaria* (процент површине некротичне лезије) на интактним и претходно оштећеним листовима уљане репице, рена, купуса, броколија, карфиола, келерабе и кеља користећи програм ImageJ. У шестој целини наведени су протоколи за коришћене савремене молекуларне методе као што су ДНК екстракција, умножавање специфичних кодирајућих генских региона (*ITS*, *Alt a1*, *GAPDH*, *ATP*, *RPB2*) одговарајућим прајмерима, и секвенцирање. Детаљно су описани програми и процедуре за анализу секвенци испитиваних гена, уношење у постојаће базе података и конструисање генеалогских мрежа хаплотипова и филогенетских стабала испитиваних врста. У седмом потпоглављу представљене су методе испитивања варијабилности микросателитских маркера коришћењем четири микросателитска локуса и дат опис савремених статистичких метода анализе варијансе у популацији патогена. У осмој целини описане су молекуларне методе којима је утврђивано присуство мутација у региону *cutB* гена (F129L, G137A и G143A) које су одговорне за резистентност на фунгициде азоксистробине. У деветом потпоглављу је описана метода *in vitro* испитивања утицаја сапробних гљива из родова *Trichoderma* и *Fusarium* на раст колонија патогена и *in vivo* тестирање антифунгалне активности на изолата проузроковача лисне пегавости купусњача у Србији. На крају су представљене статистичке методе испитивања у програму SPSS верзија 20,0 коришћене за обраду података у овој дисертацији.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ**, подељеном на девет потпоглавља, кандидат је систематично представио резултате истраживања. У првом потпоглављу прецизно су описани симптоми лисне пегавости и развој болести узрокован патогеним врстама рода *Alternaria*, од биљака у расаду до зрелих биљака (1 слика). У другом потпоглављу наведен је број сакупљених узорака и представљена учесталост јављања болести у регионима Србије (1 слика). У трећем потпоглављу је издвојено и описано 8 група изолата на основу изгледа колонија, морфолошких карактеристика конидија и обрасцу спорулације на V8 хранљивој подлози на основу чега је према доступној литератури идентификовано 8 врста рода *Alternaria* (1 слика). У четвртном потпоглављу показано је како изглед колонија, стопа раста, интензитет спорулације, дужина конидија и дужина врата конидија варирају између идентификованих врста на тестираним подлогама што је представљено табеларно (1) и документовано сликама (7). У другом делу овог потпоглавља кандидат је графички путем PCA анализе односно пројекцијом три главне компоненте ове анализе у простору представио одговор *Alternaria* spp на испитиване температуре при чему се издвојило 7 кластера (2 слике). У петом потпоглављу описани су симптоми лисне пегавости и разлике у патогености међу изолованим и идентификованим врстама и изолатима са различитих домаћина након вештачке инокулације на потенцијалним домаћинима из фамилије Brassicaceae (уљана репица, рен, купус, броколи, карфиол, келераба и кељ) што је представљено сликама (2) и табелама (2). У шестом потпоглављу представљени су резултати молекуларних анализа и идентификације изолата, а интер- и интрагенетичка варијабилност графички је приказана преко генеалогске мреже хаплотипова (2 слике) и филогенетских стабала испитиваних географских региона са високом *bootstrap* вредности (3 слике). Такође, табеларно је дат преглед дужине секвенци испитиваних гена *Alternaria* spp. из ове дисертације и приступни бројеви до сада депонованих секвенци гена ових врста и приказ свих референтних изолата коришћених за филогенетске студије и приступни бројеви тих секвенци у GenBank бази (4 табеле). У истом потпоглављу табеларно (1) је представљен списак свих сакупљених изолата *Alternaria* spp. у Србији са географским

регионом и одређеном хаплотипском групом. У седмом потпоглављу табеларно су приказани коришћени изолати (1) и индекси генетичког диверзитета популације на купусњачама (2 табеле) на основу чега је дат увид у генетичку варијабилност врсте *A. brassicicola* у Србији. У потпоглављу осам анализом исте групе изолата представљен је прелимирани скрининг секвенци *cutB* на присуство мутација (1 слика). На крају, резултати испитивања антагонистичких ефеката сапробних врста гљива на раст и инфективност патогена, приказани су у деветом потпоглављу (4 слике и 1 табела).

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, кандидаткиња је критички дискутовала добијене резултате у односу на најновије литературне податке. У првом потпоглављу, је дискутован изглед симптома на купусњачама и учесталост јављања проузроковача лисне пегавости у Србији у поређењу са другим налазима у свету. Такође, кандидаткиња дискутује диверзитет врста у Србији где је поред често идентификованих патогена на купусњачама детектовано и четири врсте о којима постоји мало литературних података. У другом потпоглављу дискутује се о морфолошким карактерима и њиховој поузданости за идентификацију врста рода *Alternaria* након чега се дискусија проширује и на утицај састава тестираних подлога (MA, PDA и CZ). У трећем потпоглављу истакнуте су сличности и разлике у одговору појединих врста на утицај температуре и на основу разлика у заступљености *Alternaria* spp. истакнут је значај проучавања епидемиолошких аспеката и заступљености одређених врста патогена у региону током различитих периода године. У четвртном потпоглављу разматрани су аспекти дуалне природе врсте *A. alternata* и значај присуства различитих чинилаца који утичу на патогенезу као што су осетљивост домаћина, генетичка варијабилност патогена као и улога различитих једињења, продукованих како од стране домаћина тако и од стране патогена, која могу моделовати деловање патогена или резистентност домаћина. У петом потпоглављу дискутован је утицај различитих фактора патогености, раста и репродукције који заједно утичу на адаптацију и преживљавање патогена. У шестом потпоглављу на основу испитиваних генетичких маркера и добијених филогенетских односа дискутована је генетичка варијабилност изолованих врста са купусњача у Србији и поређена са доступном литературом. У седмом потпоглављу наведена су истраживања генетичке варијабилности различитих врста овог рода у свету и Србији и појашњени су могући генетички догађаји због којих може доћи до одступања од очекиване интрагенеричке варијабилности која је показана и у овој дисертацији. Присуство резистентности неких *Alternaria* spp. на азоксистробине у свету и значај даљег мониторинга присутва ових мутација на купусњачама у Србији изложен је у осмом потпоглављу. У деветом потпоглављу разматран је механизам инхибиторног деловања изолованих антагониста и ефикасност дејства на различите *Alternaria* spp. где је истакнуто да превентивна апликација антагониста даје добре резултате контроле ових патогена.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња изводи закључке на основу чињеница изложених у потпоглављима резултата а у складу са постављеним циљевима дисертације. Наиме, кандидаткиња констатује да су прегледом усева купусњача детектовани симптоми на листовима, стабљикама и љускама као и њихова врло висока учесталост јављања на уљаној репици, рену, купусу, броколију, карфиолу, келераби и кељу. На основу морфолошких и молекуларних анализа поред најчешће описиваних патогена детектовано је још четири врсте. Показано је да састав хранљиве подлоге различито утиче на морфолошке карактеристике колонија и конидија које се користе за идентификацију овог рода при чему се V8 подлога показала као најпоузданија за

идентификацију врста. *In vitro* испитивањем утицаја температуре закључено је да су изоловане врсте различито адаптиране и да присуство врста рода *Alternaria* на купусњачама у Србији сезонски флукутира. Истакнуто је да патогеност врста није иста за све тестиране биљке, као и то да патогеност неких изолата исте врсте са различитих домаћина варира. Наглашено је да повреда ткива листа значајно повећава осетљивост биљке што истиче значај механичког оштећења биљке у пољу и заштите биљака у засаду од инсеката. Поред тога, закључено је да више различитих домаћина може бити извор инокулума за детектоване *Alternaria* spp. одакле се могу ширити на нове варијетете купусњача и у друге географске регионе. Један од закључака је и да је молекуларна карактеризација испитиваних генских региона пружила нове увиде у генетичку сродност изолованих врста и дистрибуцију детектованих хаплотипова на територији Србије. Одступање од очекиване генетичке варијабилности *A. brassicicola* довело је до закључка да иако везаност локуса указује да је клонално размножавање преовлађујући начин размножавања ређе долази и до размене генетичког материјала. Закључено је да за сада није регистрована смањена осетљивост патогена на фунгициде из групе азоксистробина који се примењују на купусњачама, али исто тако сугерисано је да коришћени антагонисти *Trichoderma harzianum* i *Fusarium lateritium* показују висок степен инхибиције раста и инфективности патогена *A. brassicae* i *A. brassicicola* чиме је указано на потенцијал њихове шире употребе.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 349 библиографске јединице из интернационалних и домаћих извора. Литературни извори су адекватно одабрани, правилно и на одговарајућим местима цитирани у докторској дисертацији.

#### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације: Радови у часописима међународног значаја**

1. Blagojević, J., Ivanović, Ž., Oro, V., Dolovac, N., Popović, T., Ignjatov, M., & Vukojević, J. M21 (2015). First report of horseradish leaf spot caused by *Alternaria brassicae* in Serbia. *Plant Disease*, 99(5), 730-730.  
DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1181-PDN> **M21/2**  
Линк: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-11-14-1181-PDN>
2. Blagojević, 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.  
DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0289-RE> **M21**  
Линк: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-02-19-0289-RE>
3. Blagojević, 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.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13168> **M21**  
Линк: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.13168>

## Мишљење и предлог Комисије:

На основу изложеног, Комисија сматра да докторска дисертација кандидаткиње **Јоване Д. Благојевић**, под насловом „**Морфо-физиолошка и молекуларна карактеризација врста рода *Alternaria*, патогена биљака из фамилије *Brassicaceae* у Србији**“, представља оригиналну научну студију, урађену по свим критеријумима научно-истраживачког рада. Дисертација представља опсежну студију патогена, проузроковача лисне пегавости гајених биљака из фамилије *Brassicaceae*, који су важан ограничавајући чинилац у пољопривредној производњи купусњача и утичу на принос и квалитет производа. Ова докторска дисертација је дала допринос у познавању патогених врста рода *Alternaria*, њихове биологије, услова за појаву и развој болести, преношења и начина одржавања инфективних пропагула у природи, изгледу симптома на домаћину и диверзитету врста у Србији. Молекуларне анализе су допринеле идентификацији изолата, као и сагледавању интер- и интрагенетичке варијабилности и филогенетских односа проучаваних врста. Велики допринос је дат и описом антагонистичког дејства сапробних изолата гљива са биљака домаћина чије присуство инхибира раст и инфективност појединих патогена изазивача лисне пегавости купусњача и представља потенцијални вид биолошке борбе.

Имајући у виду све наведено, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње **Јоване Д. Благојевић**, под насловом „**Морфо-физиолошка и молекуларна карактеризација врста рода *Alternaria*, патогена биљака из фамилије *Brassicaceae* у Србији**“, и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да **прихвати Извештај и одобри јавну одбрану** ове докторске дисертације.

У Београду, 14.09.2020.

**КОМИСИЈА:**

---

**др Жарко Ивановић**, виши научни сарадник  
Институт за заштиту биља и животну средину

---

**др Јелена Вукојевић**, редовни професор  
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

---

**др Милица Љаљевић Грбић**, ванредни професор  
Универзитет у Београду- Биолошки факултет