

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Датум: 01.11.2018. год.

Предмет: **Оцена урађене докторске дисертације Биљане Мирковић, маг. инж.**

Одлуком Наставно-научног већа факултета бр. 33/10-6.2. од 26.09.2018. године, именовани смо у Комисију за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Биљане Мирковић, маг. инж., под насловом: **"Ефекти фунгицида на *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. *in vitro* и могућност хемијске заштите малине"**. На основу прегледа достављене докторске дисертације, Комисија подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Биљане Мирковић, маг. инж., написана је на 104 стране и укључује 23 табеле, 3 графикана и 27 оригиналних фотографија. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи осам основних поглавља, и то: Увод (стр. 1-2), Преглед литературе (стр. 3-22), Материјал и методе (стр. 23-36), Резултати (стр. 37-65), Дискусија (стр. 66-74), Закључак (стр. 75-76), Литература (стр. 77-104) и Прилози (105-108). На крају текста налази се Биографија кандидата (стр. 109-110), Изјаву о ауторству (стр.111.), Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације (стр. 112.) и Изјаву о коришћењу (стр.113.).

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводу кандидат наводи податке о површинама и привредном значају гајења малине у нашој земљи и у свету, као и значај проучавања обољења кестењасте пегавости изданака малине, коју проузрокује гљива *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. Такође, наводе се и подаци о штетности које овај патоген, нарочито у годинама повољним за његово развиће, наноси. Истиче се да, као последица сушења изданака, принос у наредној сезони може бити смањен и за 60 %. Кандидат у уводном делу указује и на недостатак доступних података о присутности и распрострањености *D. applanata* у Србији, као и о осетљивости патогена на фунгициде, чија примена представља једини ефикасан начин сузбијања овог патогена. Указано је на потребу свеобухватног проучавања и сагледавања, како ефикасности фунгицида различитих механизма деловања у условима практичне примене, тако и улоге укупног броја и распореда третирања у односу на фенофазу развоја мелине у постигнутом нивоу заштите.

Преглед литературе. У овом поглављу, који има осам потпоглавља, детаљно су обрађени доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. Прво потпоглавље *Didymella applanata* – Таксономска припадност и порекло, детаљно описије таксономску припадност и порекло фитопатогене гљиве *D. applanata*. У оквиру другог потпоглавља, *Биљке домаћини*, наведене су биљке домаћини које овај патоген паразитира. У потпоглављу *Распрострањеност* обрађени су литературни подаци о распрострањености овог

патогена. У четвртном потпоглављу *Симптоми обољења* дат је детаљан опис симптома које ова гљива проузрокује, као и штете које она наноси. У потпоглављу *Особине патогена* описане су морфолошке карактеристике колоније на различитим одгајивачким подлогама и детаљан опис плодонских творевина патогена. У шестом потпоглављу посебна пажња посвећена је циклусу развоја патогене гљиве *D. applanata*. У потпоглављу *Мogućности сузбијања D. applanata* наведене су и описане мере сузбијања (селекција отпорних сорти, агротехничке, биолошке и хемијске мере сузбијања). У осмом потпоглављу *Фунгисиди намењени за сузбијање D. applanata*, описане су карактеристике фунгицида из осам различитих група: нерганских једињења бакра, дитиокарбамата, фталимида, хлоронитрила, хинона, 2,6-динитро-анилина, SDHI, QoI и DMI фунгицида.

Материјал и методе. У шест потпоглавља обухваћене су методе рада примењене за испитивања спроведена у лабораторијским и пољским условима. Као почетни материјал коришћени су оболели делови изданака малине са симптомима кестењасте пегавости, прикупљених са шест локалитета из пет водећих рејона гајења малине у Србији (Ариље, Ивањица, Пожега, Шабац и Ваљево) током четири године (2013-2016.) (*Узорковање и изолација патогена*). Из прикупљених узорака обављена је изолација патогена на подлози од кромпира, декстрозе и агара, (KDA) (PDA, potato dextrose agar) према стандардним фитопатолошким методама (Dhingra and Sinclair, 1995). У поменутом потпоглављу описан је поступак добијања и чувања монохифалних изолата. У потпоглављу *Провера патогености изолата* тестови патогености обухватили су вештачку инокулацију повређених и неповређених изданака биљке домаћина из које су изолати изоловани. У оквиру потпоглавља *Идентификација патогена*, добијена 178 изолата доказане патогености, идентификована су до нивоа врсте на основу на основу проучаваних макроскопских (боја колоније, одлике руба и облик колоније) и микроскопских одлика изолата (изглед плодноних творевина изолата), као и применом ланчане рекације полимеразе (polymerase chain reaction, PCR) (молекуларна идентификација). Молекуларна идентификација изолата *Didymella* spp. обављена је секвенционирањем ITS rDNK геномног региона. Након секвенционирања ампликона и њихове обраде, вишеструким поређењем са доступним секвенцама одговарајућег региона генома гљива у GenBank бази података, као и прорачуном генетичке сличности помоћу BLAST анализе и софтверског пакета MEGA 5. У потпоглављу *Оптимизација експерименталних услова за испитивање осетљивости изолата D.applanata на фунгициде in vitro* са циљем одређивања најбољих услова за развој овог патогена *in vitro*, проучен је утицај пет хранљивих подлога: кромпир декстрозна подлога (PDA), овсена подлога (OA), подлога од малта (MA) и подлога од шаргарепе (CA), четири температуре (20°C, 22°C, 24°C и 26°C) и два светлосна услова (стални мрак и светлосни услов 12 ч светлост/12 ч мрак) на пораст мицелије изолата *D. applanata*. У потпоглављу *Утврђивање осетљивости изолата D.applanata на фунгициде in vitro* детаљно је описана метода испитивања осетљивости 10 одабраних изолата *D.applanata* на 11 фунгицида из различитих хемијских група и различитих механизма деловања и то: фунгициди неспецифичних механизма деловања (Cu-хидроксид, манкозоб, каптан, хлороталонил, дитианон) и фунгициди специфичних механизма деловања (флуопирам, боскалид, пираклостробин, дифенокназол и тебуконазол) (Leroux and Gredt, 1972). Такође, у оквиру овог потпоглавља испитан је утицај различитих температура на токсичност фунгицида за изолате *D.applanata* у *in vitro* условима. Осетљивост изолата је изражена преко вредности средње ефективне концентрације (EC₅₀), концентрације фунгицида која инхибира пораст мицелије за 50 % у односу на контролу, вредности и

нагиба регресионе линије (*b*), који изражава релативну осетљивост изолата. Фактор резистентности (RF) израчунат је као однос EC₅₀ вредности посматраног и EC₅₀ вредности најосетљивијег изолата у истраживању. На основу испољене осетљивости, односно на основу израчунатог фактора резистентности (RF) изолати су класификовани према скали који је предложио Gouot (1994): RF<3-осетљиви изолати; RF=3-20-умерено резистентни; RF=21-100- резистентни и RF>100- високо резистентни. *Испитивање ефикасности фунгицида у заштити малине од D.applanata* обухватило је приказ метода у испитивању ефикасности 10 фунгицида из различитих хемијских група који се разликују по механизму деловања (Cu-хидроксид, манкозеп, хлороталонил, дитианон, боскарид, флуопирам, флуазилам, азоксистробин, пираклостробин и тебуконазол) за сузбијање *D. applanata* у условима практичне примене, тако и улога укупног броја и распореда третирања у односу на фенофазу развоја малине у постигнутом нивоу заштите. Оглед је изведен у складу са стандардним ЕРРО методама, по типу потпуног случајног блок система у четири понављања. Третирања су вршена превентивно, четири пута пре бербе и једном након завршене бербе. Оцена интензитета обољења обављена је након појаве симптома и испољавања јасних разлика између третираних варијанти и контроле. Интензитет обољења израчунат је по Townsend-Heuberger-овој, а ефикасност препарата по Aboott-овој формули.

Резултати. Резултати истраживања обрађени су у оквиру шест потпоглавља. Приказани су јасно, уз прецизна текстуална тумачења, прегледне табеле, графиконе и слике које илуструју делове истраживања. У потпоглављу *Монохифални изолати* описан је поступак изолације фитопатогених гљива из 260 узорка оболелих изданака из којијих је добијено укупно 178 изолата са мицелијом налик врстама рода *Didymella*. Сви добијени изолати *Didymella* spp. пречишћени су до монохифалних изолата, који су коришћени за даљи рад. Тестови провере патогености били су успешни за све изолате. Након седам дана од инокулације, изолати су проузроковали некротичне пеге браон боје, типичне за *D. applanata* (*Патогеност изолата*). У потпоглављу *Идентитет патогена* описане су морфолошке одлике колоније патогена на различитим одгајивачким подлогама и детаљан опис плодонских творевина патогена, на основу којих су изолати идентификовани класичним методама. Добијени резултати анализе ITS региона изолата сагласни су са резултатима добијеним на основу морфолошких одлика, па је и на основу секвенце ITS региона потврђено да изолати припадају врсти *D. applanata*. У потпоглављу *Услови и осетљивост изолата D. applanata на фунгициде in vitro*, описана је оптимизација услова за развој овог патогена *in vitro*. Добијени резултати су показали да хранљива подлога, температура и светлосни услови значајно утичу на брзину пораста мицелије изолата. Осим на брзину раста, врста хранљиве подлоге је утицала и на облик колоније и изглед маргине. Највећи пораст за све изолате утврђен је на овсеној подлози (30,4-42,8 мм/7 дана). Такође, на овој подлози изолати су формирали овалне колоније са равним ивицама. Највећи просечан пораст за већину изолата био је на температури 22°C (32,5-40,6 мм/7 дана) и у светлосном услову 12 ч светлост/12 ч мрак. На основу добијених резултата, дефинисани су експериментални услови за испитивање осетљивости изолата на фунгициде. У петом потпоглављу *Осетљивост изолата D. applanata на фунгициде*, приказане су вредности EC₅₀ за тестиране фунгициде. Вредности средње ефективне концентрације (EC₅₀) показују да је међу фунгицидима на које је испољена хомогена осетљивост, дифеноконазол био најтоксичнији за испитиване изолате, док је најмању токсичност испољио Cu-хидроксид. На основу израчунатих вредности фактора резистентности, сви изолати су сврстани у категорију осетљивих на Cu-хидроксид, манкозеп, каптан, хлороталонил, дитианон,

дифеноконазол и тебуконазол (RF<3). Са друге стране, изолати су испољили разлике у осетљивости на азоксистробин, пиракlostробин, флуазинам, боскалид и флуопирам. Међу проучаваним изолатима, доказано је присуство високо резистентних изолата *D. applanata* на азоксистробин и пиракlostробин, са вредностима RF фактора >200, и умерено резистентних (RF=6,3-11) на флуазинам, боскалид и флуопирам. Од четири умеренорезистентна изолата на боскалид, три су била умеренорезистентна и на флуопирам (RF= 3,2-4,6), што указује на потенцијалну појаву укрштене резистентности између ових фунгицида, који имају исти механизам деловања. У потпоглављу **Утицај различитих температура на токсичност фунгицида за изолате *D. applanata* у *in vitro* условима**, приказани су добијени резултати који показују да различите температуре статистички значајно утичу ($P<0,05$) на токсичност свих испитиваних фунгицида. Такође, утврђено је да је токсичност већине фунгицида била највећа на најнижој (15°C), а најмања на највишој испитиваној температури (26°C). Према досупним подацима, ови резултати представљају први налаз о утицају различитих температура на токсичност фунгицида *in vitro* за праве гљиве. У оквиру потпоглавља **Ефикасност фунгицида у заштити малине од *D. applanata***, приказани су резултати двогодишњих испитивања ефикасности фунгицида. У условима интензитета обољења у контроли од 53,7% и 76,3 %, највећа ефикасност остварена применом тебуконазола, флуопирама и боскалида (94,7-99,3%). Ефикасност фунгицида неспецифичних механизма деловања (Cu-хидроксид, манкозеп, хлороталонил и дитианон) била је у интервалу 64,4-81,7%. Међутим, утврђена је веома слаба ефикасност флуазинама (20,2-27,1%), као и оба фунгицида из групе стробилурина (13,7-16,2% за азоксистробин, односно 32,9-37,8% за пиракlostробин), чиме се потврђује постојање и практичне резистентности *D. applanata* на стробилурине. Такође, утврђивањем критичних периода за примену фунгицида са циљем сузбијања *D. applanata*, установљено је да је највећи утицај на ефикасност имао изостанак примене фунгицида у фенофази када су избојци били 25-40 цм дужине, па се овај период може сматрати као критичан период за примену фунгицида у програму заштите малине од проузроковача кестењасте пегавости.

Дискусија. Добијени резултати дискутовани су уз прецизна тумачења. Пружен је увид у присуство, распрострањеност и значај *D. applanata* у Србији, као и разлике у учесталости појаве обољења по годинама истраживања. Просечна вредност учесталости обољења се мењала од године до године (2013-2016.), у зависности од временских услова (количина и распоред падавина, температуре). Такође, дат је детаљан опис симптома који су уочени на оболелим биљкама у засадима малине током четворогодишњег истраживања. На основу симптома у пољу утврђених на биљкама, истакнуто је да се могла уочити повезаност између типа симптома и патогена (*D. applanata*). Проучавана морфолошка (макроскопске и микроскопске одлике), одгајивачка и патогена својства 178 изолата *Didymella* spp., пореклом из Србије, била су у складу са већ описаним одликама врста рода *Didymella*. Такође, молекуларна идентификација, извршена на основу анализе степена нуклеотидне идентичности секвенци ITS геномног региона изолата патогена, потврдила је идентификацију патогена класичним методама. Дискутовани су резултати испитивања са циљем оптимизације експерименталних услова за испитивање осетљивости изолата *D. applanata* на фунгициде *in vitro* и то: значај пет хранљивих подлога: кромпир декстрозна подлога (PDA), овсена подлога (OA), подлога од малта (MA) и подлога од шаргарепе (CA), четири температуре (20°C, 22°C, 24°C и 26°C) и два светлосна услова (стални мрак и светлосни услов 12 ч светлост/12 ч мрак) на пораст мицелије изолата *D. applanata*. Добијени резултати проучавања осетљивости изолата *D. applanata* на фунгициде *in vitro*, у

оквиру ове докторске дисертације, поређени су са доступним литературним подацима за сродну врсту *D. bryoniae* и друге патогене, имајући у виду да нема литературних података о осетљивости гљиве *D. applanata* на фунгициде, како у нашој земљи, тако и у свету. Добијени резултати на основу вредности средње ефективне концентрације (EC_{50}), показију да је дифенокназол био најтоксичнији, док је најмању токсичност за изолте испољио Су-хидроксид. На основу израчунатих вредности фактора резистентности, сви изолати су сврстани у категорију осетљивих на Су-хидроксид, манкозоб, каптан, хлороталонил, дитианон, дифенокназол и тебуконазол ($RF < 3$). Са друге стране, изолати су испољили разлике у осетљивости на азоксистробин, пираклостробин, флазуинам, боскалід и флауопирам. Такође, истакнут је значај утицаја различитих температура на токсичност фунгицида за изолате *D. applanata* у *in vitro* условима, при чему је утврђено да је токсичност већине фунгицида највећа на најнижој температури ($15^{\circ}C$), а најмања на највишој температури ($26^{\circ}C$). С обзиром да су хемијске мере окосница заштите малине од проузроковача кестењасте пегавости, добијени резултати ефикасности фунгицида различитих механизма деловања у условима практичне примене у току две експерименталне сезоне, треба да допринесу унапређењу заштите, а самим тим и технологије производње ове најзначајније јагодасте воћне врсте у нашој земљи. Такође, утврђивањем критичних периода за примену фунгицида са циљем сузбијања *D. applanata*, установљено је да је критичан период за примену када су избојци малине око 25-40 цм дужине.

Закључак. На основу добијених резултата и њихове дискусије кандидат је извео следеће закључке. Изолацијом фитопатогених гљива из оболелих изданака малине издвојено је укупно 178 изолата *D. applanata*, којима је потврђена патогеност вештачким инокулацијама изданака и који су идентификовани на основу класичних и молекуларних метода. Добијени резултати су показали да хранљива подлога, температура и светлосни режим значајно утичу на брзину пораста мицелије изолта. На основу добијених резултата, дефинисани су експериментални услови за испитивање осетљивости изолата на фунгициде *in vitro*. Вредности средње ефективне концентрације (EC_{50}) показују да је дифенокназол био најтоксичнији за изолате, док је најмању токсичност испољио Су-хидроксид. Такође, утврђено је да различите температуре статистички значајно утичу ($P < 0,05$) на токсичност свих фунгицида. Најбољу ефикасност у условима практичне примене испољили су тебуконазол, боскалід и флауопирам. Задовољавајућа ефикасност постигнута је применом Су-хидроксида, манкозеба, хлороталонила и дитианона, а слаба у случају флазуинама, азоксистробина и пираклостробина. Применом лабораторијских *in vitro* тестова, као тестова ефикасности у пољу, утврђен је висок ниво резистентности *D. applanata* на азоксистробин и пираклостробин. Установљено је и да је токсичност већине фунгицида била највећа на најнижој ($15^{\circ}C$), а најмања на највишој испитиваној температури ($26^{\circ}C$). Значај резултата добијених испитивањем ефикасности фунгицида у заштити малине од *D. applanata* и утврђивање критичног периода примене фунгицида огледа се у могућности ефикаснијег сузбијања овог патогена.

Литература. У дисертацији је на правилан начин наведено укупно 241 литературни извор, који у потпуности одговарају проучаваној проблематици.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација кандидата Биљане Мирковић, маг. инж., под насловом: "ЕФЕКТИ ФУНГИЦИДА НА *DIDYMELLA APPLANATA* (NIESSL.) SACC. *IN VITRO* И МОГУЋНОСТ ХЕМИЈСКЕ ЗАШТИТЕ МАЛИНЕ" представља оригиналан и самостални научно-истраживачки рад, у потпуности реализован у складу са планом и програмом предвиђеним пријавом докторске дисертације. Добијени резултати истраживања су усаглашени са постављеним циљевима и хипотезама и значајни су, како за науку, тако и за праксу. Допринос ове дисертације је што су добијени резултати лабораторијских испитивања и тестова ефикасности у пољу, омогућили прави увид и поуздану процену могућности примене фунгицида, како у смислу избора, тако и времена њихове примене, а све у циљу успешнијег сузбијања проуроковача кестењасте пегавости малине, а самим тим и унапређења технологије гајења ове најзначајније јагодасте воћне врсте у нашој земљи.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Биљане Мирковић, маг. инж., под насловом: "ЕФЕКТИ ФУНГИЦИДА НА *DIDYMELLA APPLANATA* (NIESSL.) SACC. *IN VITRO* И МОГУЋНОСТ ХЕМИЈСКЕ ЗАШТИТЕ МАЛИНЕ" и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да оцену прихвати и омогући кандидату јавну одбрану.

У Београду, 01.11.2018. год.

Чланови Комисије:

др Милан Стевић, ванредни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Пестициди)

др Бранкица Тановић, виши научни сарадник,
Институт за пестициде и заштиту животне средине, Београд
(ужа научна дисциплина: Фитопатологија)

др Емил Рекановић, виши научни сарадник
Институт за пестициде и заштиту животне средине, Београд
(ужа научна дисциплина: Фитофармација и токсикологија)

др Горан Делибашић, редовни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Фитопатологија)

др Михаило Николић, редовни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Посебно воћарство)

Прилог:

Радови кандидата Биљане Мирковић, маг. инж., објављени у научним часописима на SCI листе

1. **Mirković, B.**, Tanović, B., Hrustić, J., Mihajlović, M., Stević, M., Delibašić, G., Vukša, P. (2015): Toxicity of copper hydroxide, dithianon, fluazinam, tebuconazole and pyraclostrobin to *Didymella applanata* isolates from Serbia. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 50 (3): 175-183.
2. **Mirković, B.**, Tanović, B., Stević, M., Hrustić, J., Mihajlović, M., Delibašić, G., Vukša, P. (2015): Toxicity of mancozeb, chlorothalonil, captan, fluopyram, boscalid, and difenoconazole to *Didymella applanata* isolates from Serbia. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. 50: 12, 845-850.

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Датум: 01.11.2018. год.

Након прегледа извештаја о провери оригиналности, достављеног од старне Универзитетске библиотеке, а на основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, који се примењује од 01.10.2018. године, ментори докторске дисертације кандидата Биљане Мирковић, маг. инж., под насловом: **”Ефекти фунгицида на *Didymella applanata* (Niesl.) Sacc. *in vitro* и могућност хемијске заштите малине”**, доносе следећу

О Ц Е Н У

Извештај Универзитетске библиотеке о провери оригиналности докторске дисертације под насловом: **”Ефекти фунгицида на *Didymella applanata* (Niesl.) Sacc. *in vitro* и могућност хемијске заштите малине”**, кандидата Биљане Мирковић, маг. инж., указује да је поменута дисертација оригинални научни рад кандидата, те да се, у складу с тим, прописани поступак за њену одбрану може наставити.

Ментори:

др Милан Стевић, ванредни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Пестициди)

др Бранкица Тановић, виши научни сарадник,
Институт за пестициде и заштиту животне средине, Београд
(ужа научна дисциплина: Фитопатологија)