

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Miloš Lj. Stevanović

**IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA
FITOPATOGENIH GLJIVA
PROUZROKOVAČA BOLESTI STABLA
KUPINE U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Miloš Lj. Stevanović

**IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION
OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI CAUSING
BLACKBERRY CANE DISEASES IN
SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentori: dr Aleksandra Bulajić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Svetlana Živković, viši naučni saradnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

Članovi komisije: dr Goran Aleksić, viši naučni saradnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

dr Goran Delibašić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Danijela Ristić, naučni saradnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

dr Brankica Tanović, viši naučni saradnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

dr Mihailo Nikolić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Aleksandri Bulajić, redovnom profesoru na ukazanom poverenju, strpljenju, razumevanju i svesrdnoj pomoći u svim fazama izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvalan sam mentoru dr Svetlani Živković, višem naučnom saradniku na konstantnoj pomoći, korisnim savetima i podršci koju mi je pružila tokom celokupnog perioda izrade disertacije.

Zahvalnost za veliku podršku, nesebično prenetom znanju i pomoći pri realizaciji disertacije dugujem dr Veljku Gavriloviću, naučnom savetniku.

Zahvaljujem dr Goranu Aleksiću, višem naučnom saradniku na veoma korisnim sugestijama i savetima koji su doprineli kvalitetu ove disertacije.

Zahvalan sam dr Goranu Delibašiću, redovnom profesoru na korisnim savetima datim tokom pregleda rukopisa.

Zahvalanost dugujem dr Danijeli Ristić, naučnom saradniku na velikoj i bezrezervnoj pomoći i podršci prilikom izvođenja eksperimenata, izrade i finalizacije ove disertacije.

Zahvalnost dugujem i dr Brankici Tanović, višem naučnom saradniku na datim sugestijama i savetima prilikom pregleda rukopisa.

Zahvaljujem dr Mihailu Nikoliću, redovnom profesoru na nesebičnim savetima i stručnim sugestijama koje doprinose kvalitetu ove disertacije.

Zahvalan sam na podršci Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja kao i Istituta za zaštitu bilja i životnu sredinu za obezbeđivanje potrebnih sredstava koja su omogućila izradu ove disertacije.

Posebnu zahvalnost na bezrezervnoj podršci, strpljenju i razumevanju dugujem svojoj porodici koja je bila uz mene onda kada je to bilo najpotrebnije.

IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA FITOPATOGENIH GLJIVA PROUZROKOVAČA BOLESTI STABLA KUPINE U SRBIJI

Rezime: Tokom ispitivanja sprovedenog u periodu od 2013. do 2016. godine, pregledom pet komercijalno značajnijih sorti kupine na 24 lokaliteta u 13 okruga u Srbiji, ustanovljena je široka rasprostranjenost bolesti stabla kupine (incidenca 5 - 80%, prosečno 37,7%), a nekroza i pucanje kore bili su najčešći simptomi. U pojedinim lokalitetima zabeleženo je sušenje 40% biljaka uz direktno smanjenje prinosa od oko 50%. Rasvetljavanje etiologije bolesti stabla kupine u Srbiji obavljeno je kroz morfološku i molekularnu identifikaciju i karakterizaciju 468 izolata dobijenih iz 427 uzoraka. Nakon ispunjenja Kohovih postulata, na osnovu makroskopskih i mikroskopskih osobina dobijeni izolati izdvojeni su u 10 morfoloških grupa što je potvrđeno sekvenciranjem ITS regiona rDNA. Identifikovano je 10 vrsta gljiva prouzrokovala bolesti stabla kupine u Srbiji: *Paraconiothyrium fuckelii*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Septoria* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe betulae* i *Neofusicoccum parvum*. Dodatna karakterizacija na osnovu filogenetskih analiza urađena je za vrste *G. idaeicola*, *B. dothidea*, *D. seriata*, *C. kahawae*, *D. eres*, *D. betulae* i *N. parvum* čime je određena njihova srodnost i međuodnos sa ostalim vrstama rodova *Gnomoniopsis*, *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Colletotrichum*, *Diaporthe* i *Neofusicoccum*. Izolati *Septoria* spp. moguće je bilo identifikovani do nivoa roda na osnovu morfoloških, patogenih i molekularnih odlika i biće predmet daljih istraživanja uz sekvenciranje dodatnih molekularnih markera.

Tokom ovih istraživanja vrsta *G. idaeicola* prvi put je opisana na kupini u Srbiji, a kako se pokazalo da je rasprostranjena u skoro polovini ispitivanih zasada, to predstavlja i prvu masovnu pojavu na kupini u svetu kao i prvi uvid u moguću epidemiologiju nekroze stabla i sušenja kupine izazvane sa *G. idaeicola*. Izolati *G. idaeicola* iz Srbije ispoljili su morfološku, molekularnu i biološku varijabilnost što je ustanovljeno po prvi put u svetu. Utvrđena je različita brzina porasta i izgled kolonija, različito vreme i način sporulacije, kao i različita virulentnost. Filogenetske analize kombinovanih sekvenci za ITS region rDNA, β -tubulin, *tef-1 α* i FG1093 otkriva postojanje dve odvojene grupe u okviru klastera *G. idaeicola*.

Vrste *C. kahawae*, *D. eres*, *D. betulae*, *N. parvum* i *Septoria* spp. prvi put su opisane kao patogeni kupine u Srbiji. Ovo je i prvi nalaz *D. betulae* na kupini u svetu. Od svih ustanovljenih vrsta, okarakterisano je ukupno 52 izolata i u baze podataka deponovano je 106 sekvenci što predstavlja prvi uvid u varijabilnost i strukturu populacija vrsta prouzrokovaca bolesti stabla kupine u Srbiji.

Dobijeni rezultati pokazuju da su prouzrokovaci bolesti stabla kupine u Srbiji veoma značajna i raznovrsna grupa patogena. Brojnost prisutnih vrsta, kao i ispoljena varijabilnost ukazuju na složenost i potrebu za pravilnom identifikacijom na kojoj se i zasniva efikasno suzbijanje bolesti. U okviru ove disertacije prvi put su uspostavljeni protokoli za brzu i pouzdanu identifikaciju i razlikovanje na osnovu morfoloških i molekularnih osobina 10 različitih patogena stabla kupine. To je osnova za sprovođenje mera suzbijanja, naročito za pouzdanu proveru zdravstvenog stanja sadnog materijala kupine.

Ključne reči: kupina, bolesti stabla, *Paraconiothyrium fuckelii*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Septoria* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe betulae*, *Neofusicoccum parvum*, identifikacija, morfologija, molekularna identifikacija, filogenetske analize, virulentnost.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 634.713:632.48(497.11)(043.3)

IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI CAUSING BLACKBERRY CANE DISEASES IN SERBIA

Abstract: A Survey was conducted from 2013 to 2016 which included a total of 24 orchards planted with five of the most commonly grown blackberry cultivars in 13 administrative districts in Serbia. A wide distribution of blackberry cane diseases (incidence of 5 - 80%, with an average of 37,7%) was observed with the most frequent symptoms of bark necrosis and canker. In some of the localities, the wilting of up to 40% of plants was recorded with yield reduction of about 50%. The etiology of blackberry cane diseases was investigated through morphological and molecular identification and characterization of 468 isolates obtained from 427 samples. After fulfilling the Koch's postulates, the isolates were grouped into 10 morphological groups based on macroscopic and microscopic features which were confirmed by the sequencing of the ITS region rDNA. Ten species of fungi causing blackberry cane diseases were identified including *Paraconiothyrium fuckelii*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Septoria* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe betulae* and *Neofusicoccum parvum*. Additional characterization based on phylogenetic analysis was performed for *G. idaeicola*, *B. dothidea*, *D. seriata*, *C. kahawae*, *D. eres*, *D. betulae* and *N. parvum* and revealed their relationship to the additional species within the genera of *Gnomoniopsis*, *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Colletotrichum*, *Diaporthe* and *Neofusicoccum*. Isolates of *Septoria* spp. could be identified to the genus level based on morphological, pathogenic and molecular features and will be subjected to further research through sequencing of additional molecular markers.

During this research *G. idaeicola* was detected on blackberries in Serbia for the first time. As it was found that *G. idaeicola* was distributed in almost half of the orchards, this is the first record of a massive outbreak of *G. idaeicola* on blackberries in the world as well as the first insight into the possible epidemiology of cane necrosis and wilting of blackberries caused by this fungus. The isolates *G. idaeicola* from Serbia exhibited morphological, molecular and biological variability which was recorded for the first time in the world. More specifically, different growth patterns and rates, sporulation patterns and virulence were documented. Phylogenetic analysis of concatenated sequences of ITS

region rDNA, β -tubulin, *tef-1 α* and FG1093 revealed two separated groups within the cluster of *G. idaeicola*.

Species *C. kahawae*, *D. eres*, *D. betulae*, *N. parvum* and *Septoria* spp. were documented for the first time as blackberry pathogens in Serbia. This is the first record of *D. betulae* as a blackberry pathogen worldwide. For all described species a total of 52 isolates were characterized and 106 sequences were generated providing the first insight into the variability and population structure of species causing blackberry cane diseases in Serbia.

These results revealed that the causal agents of blackberry cane diseases in Serbia are an important and diverse group of pathogens. The complexity and variability of the documented species demonstrates the necessity for proper identification as a prerequisite for effective disease control measures. Protocols for rapid and reliable identification and differentiation based on morphological and molecular features of the 10 different pathogens of blackberry cane have been established for the first time within this dissertation. This is the foundation for the development of effective disease control measures, as well as the control of the health status of blackberry planting material.

Keywords: blackberry, cane diseases, *Paraconiothyrium fuckelii*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Septoria* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe betulae*, *Neofusicoccum parvum*, identification, morphology, molecular identification, phylogenetic analysis, virulence.

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 634.713:632.48(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Privredni značaj kupine kao gajene biljke.....	3
2.2. Mesto kupine u sistematici biljaka	5
2.3. Plemenite sorte kupine	5
2.4. Važnije bolesti kupine	7
2.5. Najznačajnije gljive patogeni stabla kupine	9
2.6. Istraživanja bolesti stabla kupine u Srbiji.....	28
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	30
4. MATERIJAL I METODE	31
4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka	31
4.2. Izolacija i dobijanje monosporijalnih izolata	33
4.3. Provera patogenosti	34
4.4. Morfološke osobine.....	35
4.5. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija	37
4.5.1. Ekstrakcija DNA	37
4.5.2. Lančana reakcija polimeraze (Polimerase Chain Reaction - PCR)	38
4.5.3. Vizuelizacija i analiza produkata	41
4.5.4. Prečišćavanje PCR produkata i sekvenciranje	42
4.5.5. Molekularna identifikacija	42
4.5.6. Molekularna karakterizacija	43
4.6. Ispitivanje virulentnosti izolata <i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	53
5.0 REZULTATI	54
5.1. Simptomi bolesti u polju	54
5.2. Izbor izolata za dalji rad	66
5.3. Provera patogenosti ispitivanih izolata.....	75
5.4. Morfološka svojstva	83
5.5. Molekularna identifikacija i karakterizacija.....	101
5.6. Filogenetske analize	109
5.7. Virulentnost izolata <i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	120

6.0 DISKUSIJA	124
6.1. Uočeni simptomi bolesti stabla kupine u polju	124
6.2. Patogene osobine ispitivanih izolata	134
6.3. Morfološka karakterizacija ispitivanih osobina	140
6.4. Molekularna identifikacija i analize sekvenci ispitivanih izolata.....	147
6.5. Filogenetska karakterizacija i taksonomska pozicija ispitivanih izolata	153
6.6. Virulentnost izolata <i>Gnomoniopsis idaeicola</i> poreklom sa različitih lokaliteta.....	156
7. ZAKLJUČAK	157
8. LITERATURA	160
BIOGRAFIJA	178
Izjava o autorstvu	179
Izjava o korišćenju.....	181

1. UVOD

Kupina je jedna od najznačajnijih vrsta voćaka koja je poslednjih decenija u globalnoj ekspanziji i zauzima četvrto mesto u proizvodnji jagodastog voća posle jagode, borovnice i maline. Posle Sjedinjenih Američkih Država, Meksika i Kine Srbija je sa oko 5.300 ha zasađenih površina četvrti svetski proizvođač (Nikolić i Milivojević, 2015). Proizvodnju kupine ograničavaju brojne bolesti različite etiologije. Poznato je da najmanje 21 vrsta gljiva prouzrokuje bolesti stabla i lista kupine, ne računajući prouzrokovaoče rđe, a takođe još najmanje 16 vrsta prouzrokuje bolesti korena (Martin et al., 2017). U uslovima nedostatka novijih podataka, velikih promena u gajenju kupine u vidu širenja proizvodnje i podizanja novih zasada sa promenjenom strukturom sorti, etiologija bolesti stabla kupine u Srbiji uglavnom je nepoznata.

Usled različitih bolesti stabla remeti se normalan tok hranjivih materija i ishrana biljaka što negativno utiče na prinos koji može biti umanjen i preko 80% (Martin et al., 2017). Do danas je opisano 10 vrsta gljiva prouzrokovaoča bolesti stabla kupine u Srbiji i to *Paraconiothyrium fuckelii*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Phomopsis* spp., *Botrytis cinerea*, *Xenodidymella applanata*, *Elsinoë necator*, *Septocytia ruborum*, *Seimatosporium lichenicola* i *Gnomonia rostellata* (Arsenijević, 1989; Arsenijević i sar., 1989; Babović i Delibašić, 1994; Veselić, 1994; Arsenijević and Veselić, 1995; Garić i Ranković, 1996; Arsenijević and Veselić, 1997; Veselić and Arsenijević, 1998; Arsenijević et al., 1999; Arsenijević, 2006a, 2006b; Aleksić et al., 2012). Prisustvo ovih patogena potvrđeno je mikroskopiranjem obolelih uzoraka, izolacijom i morfološkom identifikacijom, dok je detaljnije ispitivanje morfoloških, odgajivačkih i patogenih osobina urađeno samo za pojedine vrste. Malo je istraživanja koja obuhvataju primenu molekularnih metoda koje bi potvrdile rezultate dobijene konvencionalnim metodama.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pružiće uvid u etiologiju, rasprostranjenost i značaj bolesti stabla kupine u Srbiji i obuhvatiće utvrđivanje prisustva fitopatogenih gljiva u zasadima kupine, u većem broju lokaliteta u najznačajnijim rejonima gajenja. Struktura populacije kao i sastav vrsta uključenih u kompleks u Srbiji biće proučena kroz izolaciju, proveru patogenosti, ispitivanje morfoloških i molekularnih karakteristika, filogenetske analize i poređenje rezultata sa dostupnom literaturom.

Rezultati istraživanja pokazaće da su prouzrokovaci bolesti stabla kupine u Srbiji veoma raznovrsni, a neki od njih biće po prvi put detektovani i okarakterisani u našoj zemlji. Izolovanih deset morfoloških grupa čija će patogenost biti potvrđena inokulacijom reznica stabla kupine biće molekularno identifikovano analizom sekvenci ITS regiona rDNA kao i filogenetskim analizama u cilju potvrde konvencionalne identifikacije. Tokom istraživanja biće razvijeni protokoli za detekciju i pouzdanu identifikaciju i karakterizaciju patogena stabla kupine, a to će doprineti razvoju i unapređenju istraživanja bolesti kupine u Srbiji uopšte. Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pružiće osnovu za preduzimanje odgovarajućih mera suzbijanja, naročito u smislu sprečavanja introdukcije i daljeg širenja patogena stabla kupine u nova područja i nove zasade kupine.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Privredni značaj kupine kao gajene biljke

Kupina (*Rubus* L. subgenus *Rubus* Watson) jedna je od najznačajnijih jagodastih voćaka rasprostranjena širom sveta u rejonima koji su pogodni za gajenje. Prirodna staništa divljih vrsta kupina protežu se na severnoj hemisferi kao i u andskom delu Južne Amerike. Zahvaljujući genetičkoj raznovrsnosti, kupina ima široku ekološku valencu i prilagođena je najrazličitijim uslovima spoljašnje sredine od Arktika do tropskih pojaseva (Clark et al., 2007). U Srbiji se, prema privrednom značaju proizvodnje jagodastih voćaka, kupina nalazi na trećem mestu, posle jagode i maline (Nikolić i Milivojević, 2015). Plodovi kupine bogati su šećerima, organskim kiselinama, vitaminima, pektinima, mineralnim materijama, antioksidantima i antocijanima, tako da imaju veliku hranljivu, dijetetsku, profilaktičku i lekovitu vrednost i veoma su korisni za zdravlje ljudi i imuni sistem (Veličković, 2000; Pellegrini et al., 2003; Reyes-Carmona et al., 2005). Kupina je delikatesno voće koje se koristi za potrošnju u svežem stanju, a pogotovo je pogodna za industrijsku preradu i proizvodnju sokova, džemova, slatkog, marmelade, kompota, voćnih jogurta, vina i drugog (Nikolić i Milivojević, 2015).

U svetu, duži niz godina, proizvodnja kupine organizovana je na preko 25.000 ha sa ukupnim prinomom od oko 140.000 t (Strik et al., 2007; Clark and Finn, 2014). Prema podacima Strik et al. (2007) najveći deo proizvodnje odvija se u Evropi na površini od 7.692 ha i Severnoj Americi na površini od 7.159 ha što je oko 75% ukupne svetske proizvodnje. Najmanje se gaje na teritoriji Centralne Amerike (1640 ha), Južne Amerike (1597 ha), Azije (1550 ha), Afrike (100 ha) i Okeanije (297 ha) (Strik et al., 2007). Nema dostupnih literaturnih podataka o dinamici proizvodnje kupine u periodu od 2005. do 2017. godine na području Evrope i Azije. Prema novijim podacima, najznačajnije povećanje u obimu proizvodnje zabeleženo je u Meksiku gde se kupina od 2013. godine gaji na oko 6.500 - 8.000 ha (Clark and Finn, 2014), što je značajno povećanje u Centralnoj Americi u poređenju sa podacima koje su nekoliko godina ranije pružili Strik et al. (2007). Meksiko je u 2016. godini ostvario ukupnu proizvodnju jagodastog voća od 858.488 t od čega 248.512 t kupine (Cook, 2017). Tako velika ekspanzija u proizvodnji desila se zbog uvođenja veoma kvalitetne sorte Tupy koja se bere u periodu oktobar –

jun, kada nije sezona u Severnoj Americi i Evropi, pa je veoma tražena za potrošnju u svežem stanju. U Severnoj Americi nije došlo do značajnih promena u proizvodnji pa je 2015. godine kupina gajena na 6.920 ha, a 2016. godine na 7.000 ha (USDA, 2018).

Srbija se prema proizvodnji kupine nalazi na četvrtom mestu u svetu, posle Sjedinjenih Američkih Država (SAD), Meksika i Kine, a prva je u Evropi (Strik et al., 2007) sa oko 5.300 ha (Nikolić i Milivojević, 2015) i učestvuje sa oko 18% u ukupnoj proizvodnji u svetu (Strik et al., 2007). Najznačajnija područja gajenja kupine u Srbiji su u okolini sledećih gradova: Knjaževac, Valjevo, Šabac, Osečina, Krupanj, Rekovac, Varvarin, Aleksinac, Čačak, Brus, Aleksandrovac, Leskovac, Vladičin Han, Vučje, Beograd, Sopot, Dragačevo, Bajina Bašta, Ljubovija i Požarevac (Nikolić i Milivojević, 2015). Prosečna veličina kupinjaka u Srbiji je 0,3 ha i najveći deo je u vidu individualnih porodičnih gazdinstava (Nikolić and Tanović, 2012). Krajem XX i početkom XXI veka, a posebno poslednjih godina, beleži se tendencija povećanja obima proizvodnje kupine u Srbiji. Tako je 1997. godine proizvedeno oko 12.000 t kupine (Milutinović i sar., 1999) da bi do 2005. godine ta proizvodnja porasla na oko 25.000 t (Strik et al., 2007; Nikolić i Milivojević, 2015). Narednih godina ovaj trend se nastavlja da bi proizvodnja kupine 2008. godine prešla 30.000 t (Nikolić and Tanović, 2012). Od 2008. godine dolazi do opadanja proizvodnje zbog ekonomske krize koja je pogodila svet, ali i velike produkcije i loše cene na svetskoj berzi u tom periodu. Međutim, posle pada 2009. i 2010. godine, proizvodnja kupine ponovo pokazuje trend povećanja (Keserović i Magazin, 2012). Poslednjih nekoliko godina, zbog dobre i stabilne cene dolazi do sve većeg interesovanja i podizanja novih zasada kupine i osavremenjivanja proizvodnje. Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku (2017) u Srbiji je 2015. odnosno 2016. godine kupina gajena na 4.238 ha (ukupan obim proizvodnje od 27.547 t), odnosno na 4.421 ha (ukupan obim proizvodnje od 26.716 t), a značajnije povećanje obima proizvodnje zabeleženo je 2017. godine kada su površine značajno porasle na 5.076 ha (ukupni obim proizvodnje od 28.334 t). Obim proizvodnje prikazan u podacima Republičkog zavoda za statistiku ne obuhvata mnoge zasade u sklopu gazdinstava koja nisu registrovana pa se procenjuje da je proizvodnja kupine u Srbiji verovatno znatno veća. Kao rezultat povoljnih prilika na tržištu i dalje se očekuje pozitivan trend i povećanje obima proizvodnje kupine koja je postala ekonomski značajna voćna vrsta u Srbiji. Velika količina kupine se izvozi što povoljno utiče na privredni rast. Pored toga, veliki potencijal leži u mogućnosti

industrijske prerade, pa rast u proizvodnji kupine može da podstakne razvoj prerađivačkih kapaciteta u Srbiji.

2.2. Mesto kupine u sistematici biljaka

Kupina pripada višegodišnjim, žbunastim skrivenosemenicama. Većina vrsta su listopadne, ali postoje i zimzelene (Nikolić i Milivojević, 2015). U sistematici biljaka kupina je svrstana u odeljak Spermatophyta (semenice), pododeljak Magnoliophytina (Angiospermae, skrivenosemenice), klasu Magnoliatae (Dicotyledonae, dikotile), podklasu Rosidae (Rosiflorae, ruže), nadred Rosanae (ruže), red Rosales (ruže), familiju Rosaceae (ruže), podfamiliju Rosoideae (jagodaste voćke), rod *Rubus* (Tourn) L. (malina i kupina). Focke (1910-1914), Jennings (1988), i Daubeny (1996) (loc. cit. Nikolić i Milivojević, 2015) navode da 21 vrsta kupine svrstane u podrodove *Eubatus*, *Caesii*, *Suberecti* i *Corylifolii* predstavljaju najvažnije pretke današnjih plemenitih sorti kupine.

2.3. Plemenite sorte kupine

Početak korišćenja kupine seže u daleku prošlost. Čovek je najverovatnije oduvek koristio plodove divlje kupine u svojoj ishrani jer je široko rasprostranjena kao samonikla biljka. Prvi pisani podaci u kojima se spominje kupina datiraju iz III veka pre nove ere u spisima Teofrasta (Clark et al., 2007). Iako postoje pisani podaci koji ukazuju da se kupina oduvek koristila u ishrani ljudi, nastanak i gajenje plemenitih sorti kupine novijeg su datuma. Kupina je počela da se gaji u Severnoj Americi u prvoj polovini XIX veka dok je u Evropu stigla u drugoj polovini XIX veka. Prva plemenita sorta Dorchester selekcionisana je 1841. godine u SAD. Prve bestrne sorte Dodge Thornless i Hoosae Thornless takođe su selekcionisane u SAD oko 1870. godine (Nikolić i Milivojević, 2015). Plemenite sorte kupine selekcionisane su od vrsta koje pripadaju podrodovima *Eubatus*, *Caesii*, *Suberecti* i *Corylifolii*. Podrod *Eubatus* obuhvata vrste *Rubus ulmifolius* Schott (mediteranska maljava kupina), *R. rusticanus* E. Merc. (seoska kupina), *R. procerus* Muell. (visoka kupina), *R. thysiger* Bann. et Focke, *R. bartoni* Newton, *R. laciniatus* Willd. (peršunasta kupina), *R. nitidioides* Wats., *R. plicatus* Weihe et Nees = *R. fruticosus* L. (evropska crna - obična kupina), *R. ursinus* Cham. et Schlecht, *R.*

macropetalus Dougl. i *R. vitifolius* Cham. et Schlecht (zapadnoamerička kupina). Podrod *Caesii* obuhvata vrstu *R. caesius* L. (evropska plava kupina ili ostruga). Podrod *Suberecti* obuhvata vrste *R. allegheniensis* Porter (američka visokožbunasta kupina), *R. argutus* Link. (američka uspravna kupina), *R. cuneifolius* Pursh. (peščana kupina), *R. setosus* Bigel. i *R. frondosus* Bigel. Podrod *Corylifolii* obuhvata vrste *R. trivales* Michaux (puzeća kupina), *R. canadensis* L. (kanadska kupina), *R. rubrisetus* Rydl. i *R. baileyanus* Britt. (Nikolić i Milivojević, 2015).

Prve komercijalne sorte kupine uvedene su u proizvodnju sredinom osamdesetih godina XX veka u SAD (Clark and Fin, 2011). U selekciji savremenih sorti koje se danas gaje učestvovala su evropske i američke vrste kupine: evropska crna (obična) kupina (*R. plicatus* Weihe et Nees = *R. fruticosus* L.), peršunasta kupina (*R. laciniatus* Willd.), visoka kupina (*R. procerus* Muell.), američka visokožbunasta kupina (*R. allegheniensis* Porter), američka uspravna kupina (*R. argutus* Link.) i puzeća kupina (*R. trivales* Michaux) (Clark and Fin, 2011; Nikolić i Milivojević, 2015). U Evropi gajenje kupine počinje krajem XIX veka, a na prostorima bivše Jugoslavije tek od 1951. godine. Prva domaća sorta, Čačanska bestrna, dobijena je ukrštanjem sorti Dirksen Thornless x Black Satin (Stanisavljević, 1998) i danas se gaji na oko 5% ukupnih svetskih površina (Strik, 2007). Razlog tolike zastupljenosti leži u tome što je ova sorta veoma popularna kod proizvođača u Srbiji koja je jedna od zemalja najvećih proizvođača kupina u svetu. Privredno značajne sorte kupine u Srbiji su Čačanska bestrna, Thornfree, Loch Ness, Chester Thornless, Black Satin, Dirksen Thornless. Plemenite sorte kupine imaju dvogodišnji ciklus razvića. Korenov sistem i podzemni deo stabla su višegodišnji, dok je nadzemni deo biljke dvogodišnji. U prvoj godini izdanci su vegetativni dok u generativnu fazu ulaze tek druge godine. U drugoj godini izdanci koji su doneli rod se suše. Iz podzemnog višegodišnjeg stabla iz pupoljaka obrazuju se novi vegetativni izdanci koji će u drugoj godini ući u generativnu fazu i tako se ciklus ponavlja. Prema tipu rasta izdanka, kupine se dele na sorte puzećeg rasta, sorte poluuspravnog rasta i sorte uspravnog rasta (Strik, 2007; Nikolić i Milivojević, 2015). U Srbiji su uglavnom rasprostranjene sorte puzećeg i poluuspravnog rasta, bez trnja, kao što je Čačanska bestrna (Nikolić i Milivojević, 2015).

2.4. Važnije bolesti kupine

Na kupini je do danas opisan veliki broj bolesti različite etiologije. One mogu biti prouzrokovane patogenim organizmima ili nepovoljnim delovanjem faktora spoljašnje sredine. Najznačajniji patogeni kupine su fitopatogene gljive, pseudogljive, bakterije, fitoplazme i virusi. Do danas je opisan veliki broj fitopatogenih gljiva i pseudogljiva prouzrokovala bolesti kupine među kojima se ističu: *Elsinoë necator* (Ellis & Everh.) Rossman & W.C. Allen., prouzrokovatelj antraknoze kupine (**Travis and Williamson, 2017**), *Paraconiothyrium fuckelii* (Sacc.) Verkley & Gruyter, prouzrokovatelj sušenja stabla maline i kupine (**Ellis et al., 1984**), *Xenodidymella applanata* (Niessl) Q. Chen & L. Cai, prouzrokovatelj kestenaste pegavosti maline (**Williamson, 2017a**), *Botrytis cinerea* Pers., prouzrokovatelj sive truleži (**Li et al., 2014**), *Septocita ruborum* (Lib.) Petr., prouzrokovatelj purpurne pegavosti kupine (**Aleksić et al., 2012; Williamson, 2017b**), *Seimatosporium lichenicola* (Fuckel) Shoemaker & E. Muller, prouzrokovatelj sušenja stabla maline i kupine (**Arsenijević et al., 1999; Sutton and Williamson, 2017**), *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not., prouzrokovatelj rak rana stabla kupine (**Stewart et al., 2005; Smith and Maas, 2017**), *Diplodia seriata* De Not., prouzrokovatelj rak rana stabla kupine (**Ellis et al., 1984**), *Cercospora rubi* (G. Wint.) Plakidas, prouzrokovatelj rozetavosti (veštičijih metli) kupine (**Lyman et al., 2004**), *Peronospora sparsa* Berk., prouzrokovatelj plamenjače (**Boyzo-Marin et al., 2015; Gubler and Rebbollar-Alviter, 2017**), *Sphaerulina westendorpii* (Westend) Verkley, prouzrokovatelj septorijske pegavosti lista kupine (**Brannen and Ellis, 2017**), *Sydowiella depressula* (P. Karst.) Barr, prouzrokovatelj raka stabla (**Nordskog et al., 2003; Williamson, 2017c**), *Gnomonia rubi* (Rehm) Winter, prouzrokovatelj raka stabla (**Nordskog et al., 2003; Williamson, 2017c**), *Chondrostereum purpureum* (Pers.:Fr.) Pouzar, prouzrokovatelj olovne bolesti (**Locke, 2017**), *Hapalosphaeria deformans* (Syd.) Syd., prouzrokovatelj plamenjače prašnika (**Montgomerie, 2017**), *Arthuriomyces peckianus* (E. Howe) Cumminis & Y. Hirasutka, prouzrokovatelj narandžaste rđe (**Mims and Richardson, 2007**), *Gymnoconia nitens* (Schwein.) F. Kern & H. W. Thurston, prouzrokovatelj narandžaste rđe (**Mims and Richardson, 2007**), *Kuehneola uredinis* (Link.) Arth., prouzrokovatelj rđe izdanka i lista kupine (**Ivanović i Ivanović, 2005**), *Phragmidium violaceum* (C. F. Schultz) G. Wint., prouzrokovatelj rđe kupine (**Morin et**

al., 2013), *Hamasporea longissima* (Thüm.) Körn., prouzrokovač subtropske rđe (Williamson, 2017d), *Verticilium albo-atrum* Reinke & Berthier i *Verticilium dahliae* Kleb., prouzrokovači verticilioznog uvenuća (Mercier and Kong, 2017), *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, prouzrokovač fuzarioznog uvenuća (Pastrana et al., 2017) i *Phytophthora* spp., prouzrokovači truleži korena (Aghighi et al., 2016). Posebnu grupu veoma štetnih gljiva predstavljaju patogeni plodova kupine koje se javljaju u periodu zrenja kao i posle berbe. To su prouzrokovači meke truleži *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., i *Mucor piriformis* Scop. (Kudela et al., 2012; Davis, 2017), kao i ređe i manje značajne vrste rodova *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicilium* i *Colletotrichum*.

Od fitopatogenih bakterija na kupini značajni su prouzrokovači raka korena i korenovog vrata, *Agrobacterium tumefaciens* (E. F. Smith & Townsend) Conn (Garrett, 1978) i *A. rubi* (Hildebrand) Starr & Weiss (Kudela et al., 2012; Putnam, 2017) i prouzrokovač bakteriozne plamenjače, *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al. (Stewart et al., 2003; Braun, 2017). Više vrsta fitoplazmi prouzrokuje bolesti kupine. Najznačajnija fitoplazmoza je kržljivost kupine (*Rubus stunt*) poznata i kao veštičije metle koju prouzrokuju ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’, ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’, ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ (Cieslinska, 2011; Martin et al., 2017), i ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ (Borroto Fernandez et al., 2007).

Do sada je identifikovan veći broj virusa prouzrokovača bolesti kupine: virus mozaika jabuke (*Apple mosaic virus*, AMV) (Grimova et al., 2016), virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Kudela et al., 2012; Converse and Martin, 2017a), E virus kupine (*Blackberry virus E*, BVE) (Martin et al., 2013), S virus kupine (*Blackberry virus S*, BIVS) (Martin et al., 2013), virus nekrotične pegavosti impatiensa (*Impatiens necrotic spot orthotospovirus*, INSV) (Tzanetakis et al., 2009), virus uvijenosti lista trešnje (*Cherry leaf froll virus*, CLRV) (Kudela et al., 2012), virus prstenaste pegavosti duvana (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) (Martin et al., 2013), virus hlorotične prstenaste pegavosti kupine (*Blackberry chlorotic ringspot virus*, BCRV) (Martin et al., 2013), virus žutog mozaika kupine (*Blackberry calico virus*, BCV) (Converse and Martin, 2017b), virus žbunaste patuljivosti maline (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV) (Martin et al., 2013), virus uvijenosti lista maline (*Raspberry leaf curl virus*, RLCV) (Martin and Converse, 2017), virus prstenaste pegavosti maline (*Raspberry ringspot virus*, RpRSV) (Wetzel and Krczal, 2007), latentni virus prstenaste

pegavosti jagode (*Strawberry latent ringspot virus*, SLRSV) (**Kudela et al.**, 2012), virus crne prstenavosti paradajza (*Tomato black ring virus*, TBRV) (**Martin et al.**, 2013), Y virus kupine (*Blackberry virus Y*, BVY) (**Martin et al.**, 2013), *Beet pseudoyellows virus*, BPYV (**Martin et al.**, 2013), virus prstenaste pegavosti paradajza (*Tomato ringspot virus*, TRSV) (**Converse**, 1991), *Blackberry yellow vein-associated virus*, BYVaV, *Blackberry leaf mottle associated virus*, BLMaV, *Blackberry vein banding-associated virus*, BVBaV, (**Tzanetakis et al.**, 2017), F virus kupine (*Blackberry virus F*, BVF) (**Tzanetakis**, 2017) i *Rubus canadensis virus 1* (**Martin and Tzanetakis**, 2017) i drugi.

2.5. Najznačajnije gljive patogeni stabla kupine

Do danas je identifikovano najmanje 15 vrsta gljiva prouzrokovaca bolesti stabla gajene kupine (**Ellis et al.**, 1984; **Vrandečić et al.**, 2011; **Rueda-Hernandez et al.**, 2013; **Martin et al.**, 2017). Značaj bolesti koje prouzrokuju ovi patogeni može da bude limitirajući u proizvodnji. Gubici se ogledaju u smanjenju kvaliteta i visine prinosa kupine, a u izuzetnim slučajevima može doći do potpunih gubitaka pa i krčenja čitavih zasada (**Martin et al.**, 2017). U zasadima sa visokim intenzitetom bolesti, u povoljnim uslovima, najčešće dolazi do sušenja stabala i cvetnih grana ili njihovog lomljenja usled slabljenja mehaničke čvrstine. To direktno smanjuje prinos, a može uticati i na smanjenje prinosa u narednoj sezoni. U svetu se po značaju ističe više potpuno različitih gljiva prouzrokovaca bolesti stabla kupine, a sve se odlikuju veoma različitim osobinama, uključujući simptome, krug domaćina, morfološke, epidemiološke i ekološke osobine. Od izuzetnog je značaja poznavanje strukture populacije i sastava i prisustva pojedinih vrsta u svakom regionu.

➤ *Paraconiothyrium fuckelii* (**Sacc.**) **Verkley & Gruyter** (teleomorf *Leptosphaeria coniothyrium* (**Fuckel**) **Sacc.**), prouzrokovac sušenja stabla maline i kupine, jedan je od značajnijih prouzrokovaca bolesti na gajenoj kupini u svetu. Vrsta ima širok krug domaćina, parazitira pre svega biljke iz rodova *Rubus* i *Rosa*, a pored kupine značajan je prouzrokovac bolesti na malini i ružama. Krug domaćina uključuje još i jabuku, krušku, jagodu, borovnicu, ribizlu i ogrozd (**Alfieri**, 1969; **Humphreys**, 1975; **Williamson**, 2017e). Iako je nedovoljno proučena, *P. fuckelii* se smatra ekonomski značajnim

patogenom maline i kupine u Srbiji. **Arsenijević** (2006b) je na osnovu morfoloških osobina identifikovao ovog patogena na kupini u našoj zemlji, međutim nema podataka o štetnosti i rasprostranjenosti. *P. fuckelii* je parazit rana i inficira stablo povređenih izdanaka i oštećuje vaskularno tkivo, izaziva propadanje pupoljaka u proleće, uvenuće bočnih grana, pa i odumiranje čitavih izdanaka (**Williamson**, 2017e). Mehaničko povređivanje biljaka favorizuje masovnu pojavu bolesti (**Williamson and Hargreaves**, 1978; **Williamson et al.**, 1986), a naročito oštećenja od malinine mušice (*Resseliella theobaldi* Barnes). Najznačajnija je gljiva u kompleksu bolesti udruženih sa oštećenjima nastalih ishranom *R. theobaldi* (**Seemüller et al.**, 1978). Eksperimentalno je dokazano da *P. fuckelii* može da inficira biljke i u odsustvu povreda, međutim tada kolonizira epidermis i koru ali ne i sprovodne sudove stabla pa ne dolazi do izumiranja (**Williamson and Hargreaves**, 1978). Simptomi na kupini javljaju se na stablu u vidu tamnocrvenih do purpurnih pega sa nepravilnom tamnoljubičastom ivicom. Vremenom centralni deo pege dobija sivkastu boju i formiraju se piknidi, pojedinačno ili u grupama (**Humphreys**, 1975; **Nordskog et al.**, 2003; **Williamson**, 2017e). Slične simptome na kupini prouzrokuje i *Diplodia seriata* (**Ellis et al.**, 1984). Ukoliko do infekcije dođe ranije u toku vegetacije dolazi do sušenja izdanaka, dok su simptomi kasnijih infekcija manje uočljivi, a sušenje se javlja u proleće naredne godine. *P. fuckelii* prouzrokuje gubitak celuloze iz ćelija floema što dovodi do gubitka mehaničke čvrstine i slabljenja stabla koje postaje lomljivo. Održava se u zaraženim stablima izumrlih izdanaka koji su doneli rod. *P. fuckelii* formira kako tvorevine polnog (pseudotecije, askuse i askospore) tako i tvorevine bespolnog razmnožavanja (piknide i konidije) koje su detaljno opisali **Humphreys** (1975) i **Ariyawansa et al.** (2014). Askospore se oslobađaju početkom proleća ali nema puno informacija o njihovoj infektivnosti. U epidemiološkom smislu najznačajnije su konidije koje se formiraju u piknidima koji sazrevaju u proleće i šire se kišnim kapima nošenim vetrom (**Williamson**, 2017e).

➤ ***Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr.) Cesati & De Notaris** (Anamorf: *Fusicoccum aesculi* Corda in Sturm), jedan je od najznačajnijih prouzrokovaca nekroze i rak rana stabla bestrne kupine u svetu. Nekroza često dovodi do potpunog izumiranja izdanaka i smanjenja prinosa ispod nivoa ekonomske isplativosti (**Smith and Maas**, 2017). Osim na kupini, značajna je na mnogim višegodišnjim drvenastim biljkama (**Maas and**

Uecker, 1984; Rumbos, 1987; Michailides, 1991), uključujući jabuku, breskvu, vinovu lozu, borovnicu, maslinu i druge (Stewart et al., 2003; Phillips et al., 2005; Jiye et al., 2012). *B. dothidea* je poznati parazit rana mnogih biljaka (Maas and Uecker, 1984; Smith and Maas, 2017). Na osnovu morfoloških karakteristika identifikovana je kao patogen kupine u Srbiji (Arsenijević, 2006b), a morfološki i molekularno identifikovana kao patogen šumskih i ukrasnih biljaka i jabuke u skladištu (Karadžić i sar., 2000; Milijašević i Karadžić, 2003; Vasić et al., 2013). Na kupini prvi put je nađena u SAD u uzorcima sa simptomima raka stabla (Maas and Uecker, 1984). Nekroza se obično javlja oko jednog ili više pupoljaka na glavnom stablu rodnih izdanaka. Nekrotično tkivo crvenkasto-braon do tamnobraon boje nalazi se obično ispod ili sa jedne strane lisne drške. Pupoljak ili bočna grana na zaraženoj internodiji najčešće izumiru. Nekroza može da zahvati i internodije, ali samo sporadično i to ukoliko su povređene. Kada zahvati nodus nekroza može da prstenasto zahvati stablo uz mestimično pucanje kore. Simptomi postaju uočljivi tek u vreme zrenja plodova kada lišće na čitavom izdanku ili delu iznad nekroze počinje da žuti i vene i dolazi do prekida u rastu i razviću plodova. Patogen se u prirodi održava u izumrlim biljkama kao i zaraženim stablima živih izdanaka. Izvor inokuluma mogu da budu i druge biljake domaćini, naročito jabuka. Epidemiologija bolesti nije u potpunosti rasvetljena. Smatra se da su pupoljci primarno mesto infekcije, ali i razne povrede naročito od mraza i orezivanja kao i oštećenja od insekata, grada i vetra. Pknidi su subepidermalni, raspoređeni u okviru zaraženog tkiva. Izgled bespolnih tvorevina, pknida i konidija opisani su na kupini (Smith and Maas, 2017) kao i na drugim domaćinima (Phillips et al., 2005; Jiye et al., 2012). Tvorevine polnog razmnožavanja ove kao i drugih vrsta iz roda *Botryosphaeria* retko se nalaze u prirodi i manje su značajne za epidemiologiju bolesti (Úrbez-Torres et al., 2006).

Identifikacija vrsta iz roda *Botryosphaeria* je složena. Teleomorfni stadijum se retko formira, a morfološke razlike često nisu dovoljne za identifikaciju do nivoa vrste. Morfološka identifikacija bazira se na osobinama anamornog stadijuma (Jacobs and Rehner, 1998; Denman et al., 2000). Variranje morfoloških i odgajivačkih karakteristika izraženo je i zavisi od brojnih faktora što otežava korišćenje u identifikaciji. Osim toga specijalizacija za određenu biljku domaćina nije izražena pa se ni ovaj aspekt ne može primeniti za identifikaciju (Alves et al., 2005). Molekularne metode omogućile su veliki napredak u identifikaciji vrsta iz roda *Botryosphaeria*. ITS region rDNA, kodirajući geni

za β -tubulin i translacioni elongacioni faktor 1-alpha (EF1- α) najkorisniji su u identifikaciji ali i proučavanju filogenije vrsta iz roda *Botryosphaeria* (Smith and Stanoszl, 2001; Slippers et al., 2004; Taylor et al., 2005; Alves et al., 2005; Phillips et al., 2005; Úrbez-Torres et al., 2006; Slippers et al., 2007; Qiu et al., 2008; Pitt et al., 2010; Jiye et al., 2012). Polimorfizam dužine restrikcioniha fragmenata (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP), MSP-PCR (microsatellite-primed polymerase chain reaction) i rep-PCR (repetitive-sequence-based polymerase chain reaction) sa uspehom se koriste u identifikaciji i ispitivanju genetičke varijabilnosti *B. dothidea* (Alves et al., 2005; Slippers et al., 2007; Alaves et al., 2007). Na osnovu ITS regiona rDNA i kodirajućeg gena za β -tubulin dizajnirani su specifični prajmeri za brzu rutinsku identifikaciju *B. dothidea* na borovnici (Cheng-nan et al., 2016). Hui-Fang et al. (2012) su na osnovu ITS regiona rDNA dizajnirali specifične prajmere za istovremenu i brzu identifikaciju *Fusicoccum aesculi*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum* i *N. mangiferae* (anamorfi srodni vrstama roda *Botryosphaeria*) na mangu.

Iako se retko javlja u prirodi, proces polnog razmnožavanja važan je izvor genetičke varijabilnosti u *B. dothidea* (Ma et al., 2001; Phillips, 2002). Ma et al. (2001) su primenom RAPD (random amplified polymorphic DNA) i MP-PCR (microsatellite-primed polymerase chain reaction) tehnika ustanovili mali stepen varijabilnosti u okviru populacije *B. dothidea* sa pistaća iz centralne i južne Kalifornije nasuprot visokoj varijabilnosti izolata takođe sa pistaća u severnoj Kaliforniji, gde se procenjuje da je populacija starija. Varijabilnost je izraženija u populaciji sa biljaka domaćina kod kojih se povremeno javlja polni proces (kupina, maslina, avokado). Pretpostavlja se da je varijabilnost izolata ove gljive poreklom sa kupine relativno visoka zahvaljujući činjenici da povremeno dolazi do polnog procesa na ovom domaćinu (Ma et al., 2001).

➤ *Diplodia seriata* De Not., prouzrokovatelj nekroze stabla kupine, kosmopolitiska, izrazito polifagna vrsta, poznata je i pod starim nazivom *Botryosphaeria obtusa*. Filogenetskom analizom zasnovanom na kombinovanju 5 genskih regiona (small subunit 18S rRNA, large ribosomal subunit nrDNA, ITS region rDNA, β -tubulin, i EF1- α) (Phillips et al., 2013; Slippers et al., 2014; Ariyawansa et al., 2016; Zhou et al., 2016) rod *Botryosphaeria* u širem smislu ograničen je na 10 vrsta uključujući *B. agaves* (Henn.) E. J. Butler, Slippers & G. J. Marais, *B. cortices* (Demaree & Wilcox) Arx & E.

Müll., *B. dothidea* (Moug.) Ces. & De Not., *B. fabicerciana* (Pavlic, M. J. Wingf. & X. D. Zhou, S. F. Chen) A. J. L. Phillips & A. Alves, *B. fusispora* Boonmee, J. K. Liu & K. D. Hyde, *B. ramosa* (Pavlic, T. I. Burgess & M. J. Wingf.) A. J. L. Phillips & A. Alves and *B. scharifii* Abdoll., Zare & A. J. L. Phillips, *B. auasmontanum* F. J. J. Van der Walt, *B. minutispermatia* Ariyawansa, K. D. Hyde & Z. Y. Liu i *B. sinensia* Y. P. Zhou, Y. Zhang. Anamorfni stadijum roda *Botryosphaeria* je *Fusicoccum*. Prema navedenoj klasifikaciji, *D. seriata* opisana na osnovu izgleda i osobina anamorfa ne pripada rodu *Botryosphaeria* (Crous et al., 2006; Phillips et al., 2007; Úrbez-Torres et al., 2008; Phillips et al., 2013).

Krug domaćina *D. seriata* širi je nego što se pretpostavljalo, pa je do sada utvrđeno da je patogen preko 200 vrsta iz više od 130 familija, uglavnom drvenastih ali i zeljastih biljaka (Farr and Rossman, 2013). Najznačajniji domaćini među gajenim biljkama su: jabuka, kruška, breskva, šljiva, dunja, vinova loza, kajsija, kupina, ribizla (Phillips, 2002; Phillips et al., 2007; Slippers et al., 2007; Moral et al., 2007). U Srbiji, na osnovu morfoloških osobina, identifikovana je kao prouzrokovač bolesti na jabuci, vinovoj lozi i paulovnji (Stojanović i sar., 2003; Gajić i sar., 2006; Milijašević, 2009). Opisani su brojni simptomi kao što su rak rane, nekroza, izumiranje, trulež plodova, pegavost lista i dr. (Elena et al., 2015). Kao prouzrokovač nekroze stabla kupine odavno je poznata i rasprostranjena u najvažnijim područjima gajenja u Americi i Evropi (Ellis et al., 1984; Maas et al., 1989; Varadi et al., 1993). Na kupini prouzrokuje nekrotične pege na stablu koje su u središnjem delu tamnobraon, sa zonama svetlobraon ili sive boje koje se nalaze nepravilno raspoređene oko tamnijeg centralnog dela. Pege su nepravilne, oivičene tamnobraon ili ljubičastom bojom. Piknidi se formiraju u centralnom delu pega, subepidermalno, loptastog su oblika i lako se uočavaju. Formiraju se pojedinačno ili u grupama i tada su često linearno raspoređeni. Patogen se tokom godine održava u zaraženim izdancima (Ellis et al., 1984). Konidijski stadijum poreklom sa kupine (Ellis et al., 1984) morfološki odgovara izolatima sa velikog broja drugih domaćina kao i tipskom taksonomskom opisu (Phillips et al., 2007).

Rod *Diplodia* obuhvata preko 1000 do sada opisanih vrsta, što samo po sebi govori o složenosti pravilne identifikacije (Phillips et al., 2012). Molekularne metode omogućile su lakše proučavanje filogenetskih karakteristika ove grupe gljiva i njihovo međusobno razlikovanje. Osnovu za brzu i pouzdanu identifikaciju, proučavanje filogenije i genetičke

varijabilnosti *D. seriata* čini proučavanje i analiza sekvenci ITS regiona rDNA, kodirajućih gena za β -tubulin i EF1- α (Niekerk et al., 2004; Slippers et al., 2007; Phillips et al., 2007; Úrbez-Torres et al., 2008; Wet et al., 2008; Phillips et al., 2012; Quaglia et al., 2014; Elena et al., 2015). D1 i D2 region 28s rDNA pokazao se naročito varijabilnim i korisnim u identifikaciji (Alves et al., 2005). Primenom RFLP metode dobija se profil fragmenata različite dužine što se može koristiti u identifikaciji ili za utvrđivanje genetičke različitosti u okviru vrste (Alves et al., 2005; Slippers et al., 2007). Martin et al. (2014) dizajnirali su specifične SCAR prajmere za identifikaciju *D. seriata* primenom PCR metode. Za ispitivanje genetičke varijabilnosti u novije vreme sa uspehom se koristi ISSR metoda (inter-simple sequence repeat) poznata i kao MSP-PCR, koja je ukazala na postojanje varijabilnosti koja nije mogla da se poveže sa drugim osobinama kao što je virulentnost (Elena et al., 2015). Ovi nalazi u skladu su sa osobinama drugih vrsta roda *Botryosphaeria* (Baskarathevan et al., 2012; Billones-Baaijens et al., 2013).

➤ *Diaporthe eres* Nitschke (Anamorf: *Phomopsis oblonga* (Desm.) Traverso), prouzrokovatelj sušenja stabla kupine, kompleksna je vrsta, morfološki i biološki veoma varijabilna. *D. eres* ima veoma širok krug domaćina i opisana je na biljkama koje pripadaju 41 rodu svrstanom u 29 familija. Opisuje se kao manje značajan prouzrokovatelj bolesti na drvenastim biljkama iz najmanje 6 familija na kojima prouzrokuje nekrozu stabla ili lisnu pegavost (Anagnostakis, 2007; Thomidis and Michailides, 2009; Vrandečić et al., 2010; Baumgartner et al., 2013). Poznat je parazit na voćnim vrstama iz rodova *Prunus*, *Pyrus*, *Ribes* i *Rosa* u umerenoj klimi severne hemisfere (Farr et al., 1989). Prema najnovijim podacima prouzrokuje bolesti na soji u Srbiji (Petrović et al., 2015), kupini u Hrvatskoj (Vrandečić et al., 2011), *Juglans cinerea* u Americi (Anagnostakis, 2007), breskvi u Grčkoj (Thomidis and Michailides, 2009), *Salsola tragus* u Rusiji (Kolomiets et al., 2009), vrstama roda *Vaccinium* u Evropi (Lombard et al., 2014) i vinovoj lozi u Hrvatskoj i SAD (Kaliterna et al., 2012; Baumgartner et al., 2013). Ređe se javlja na zeljastim biljkama kao što su biljke iz familije Cucurbitaceae (Garibaldi et al., 2011; Gomes et al., 2013). U Srbiji opisana je na soji, ruži, šljivi, dunji, kantaronu i paulovnici gde je identifikovana na osnovu morfologije i molekularnim putem korišćenjem ITS regiona rDNA, LSU nrDNA i EF1- α (Milijašević, 2005;

Milijašević, 2009; Živković et al., 2012a; Pavlović i sar., 2012; Petrović et al., 2015; Ristić et al., 2016). U Hrvatskoj je opisana kao prouzrokovatelj nekroze stabla kupine sorte Thornfree (**Vrandečić et al., 2011**). **Arsenijević (2006a)** identifikovao je određeni broj izolata do nivoa roda *Phomopsis* kao značajne prouzrokovatelje bolesti stabla kupine u Srbiji. Međutim, do nivoa vrste nije bila moguća identifikacija (**Arsenijević, 2006a**). Simptomi su se manifestovali u vidu beličastih zona između ili oko nodusa što je ponekad praćeno uvenućem izdanaka. Zaraženo tkivo pokriveno je crnim piknidima uronjenim u epidermis u kojima se formira mnoštvo α i β konidija. Morfološke osobine *D. eres* kao što su karakteristike peritecija, askusa, askospora, piknida, α i β konidija opisali su **Udayanga et al. (2014a)**.

Molekularna identifikacija *D. eres* i proučavanje filogenije zasniva se na ITS regionu rDNA, LSU nrDNA, kodirajućem genu za β -tubulin, EF1- α , histon H3 (HIS), kalmodulin (CAL), aktin (ACT), 60s ribozomalni protein L37 (FG1093) i genu za DNA liazu (Apn2) (**Castlebury et al., 2002; Thomidis and Michailides, 2009; Kolomiets et al., 2009; Vrandečić et al., 2011; Udayanga et al., 2012; Gomes et al., 2013; Baumgartner et al., 2013; Udayanga et al., 2014a; Dissanayake et al., 2015; Petrović et al., 2015**). Rod *Diaporthe* sačinjen je od vrsta koje su relativno specijalizovane za domaćina pa do vrsta koje imaju širok krug domaćina. Prva grupa se karakteriše manjom genetičkom varijabilnošću, jako izraženom virulentnošću, a bolesti koje prouzrokuju najčešće su veoma ekonomski značajne. *D. eres* spada u drugu grupu vrsta koje imaju širok krug domaćina, izraženiju genetičku varijabilnost i smatraju se parazitima slabosti. Bolesti koje ova druga grupa vrsta izaziva po pravilu su manje štetne. Kao najznačajniji izvor varijabilnosti vrste *D. eres* navode se polni procesi (**Gomes et al., 2013; Udayanga et al., 2014b**).

➤ ***Botrytis cinerea* Pers.** (Teleomorf: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), prouzrokovatelj sive truleži, javlja se na preko 230 biljnih vrsta širom sveta (**Fernández-Ortuño et al., 2014**). Smatra se drugom najznačajnijom fitopatogenom gljivom uopšte (**Dean et al., 2012**). *B. cinerea* inficira većinu biljnih organa, cvetove, plodove, lišće, izdanke i podzemne organe za skladištenje (kao što su krompir, mrkva) ali ne smatra se pravim patogenom korena. Povrće i jagodasto voće (uključujući i kupinu) najteže je pogođeno sivom truleži (**Williamson et al., 2007**). U Srbiji je rasprostranjen, dobro

poznat i veoma štetan patogen. Javlja se na vinovoj lozi, jagodi, malini, kupini, salati, krastavcu, jabuci, suncokretu, ukrasnim i mnogim drugim biljkama (Miletić, 2000; Maširević i Jasnić, 2006; Arsenijević, 2006b; Grahovac i sar., 2011; Tanović et al., 2009; Tanović, 2012; Balaž i sar., 2013; Stević i sar., 2014; Zdravković i sar., 2015). Napada većinu vrsta iz roda *Rubus*, ali najštetnija je na malini i kupini. Siva trulež verovatno je najznačajnija bolest plodova kupine u periodu zrenja, berbe i skladištenja (Li et al., 2012). Osim plodova može da zahvati stablo, listove i cvetove kupine (Williamson, 2017f; Bristow and Williamson, 2017). Malo je literature koja se bavi proučavanjem *B. cinerea* kao prouzrokovača bolesti stabla kupine u Srbiji. Arsenijević (2006b) opisao je simptome na stablu i pružio morfološku identifikaciju patogena, ali nema podataka o rasprostranjenosti i štetnosti bolesti na stablu kupine. Tanović et al. (2009, 2014) izvršili su molekularnu karakterizaciju izolata *B. cinerea* poreklom sa plodova kupine, maline, jagode i vinove loze korišćenjem transpozona 'Flipper' i 'Boty'. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivani izolati grupisani su u četiri tipa i to, *vacuma* (ne sadrže transpozone), *transposa* (sadrže oba transpozona 'Flipper' i 'Boty'), *boty* (sadrži samo 'Boty'), i *flipper* (sadrži samo 'Flipper'). Većina izolata poreklom sa kupine pripadalo je tipu *boty*.

Rod *Botrytis* obuhvata više desetina različitih vrsta koje se često javljaju u mešanim infekcijama. Usled velike raznovrsnosti vrsta u okviru roda čak i kod različitih izolata iste vrste poreklom sa jedne bobice, morfološka identifikacija je teška i često nedovoljna (Khazaeli et al., 2010; Li, 2015). Molekularna identifikacija pruža neuporedivo bolju rezoluciju, a najkorisniji u identifikaciji su ITS region rDNA, kodirajući geni za β -tubulin, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (G3PDH), "the heat shock protein" HSP60 (protein za toplotni udar 60), kao i subjedinicu II DNA zavisne RNA polimeraze (RPB2) (Li et al., 2012; Behr et al., 2013; Li, 2015). Vrsta *B. cinerea* veoma je raznovrsna u pogledu morfologije i genetskih osobina (Martinez et al., 2003), tako da izolati poreklom sa iste bobice mogu biti veoma različiti. Kako *B. cinerea* u prirodi retko formira polni stadijum, pretpostavlja se da je varijabilnost rezultat drugih izvora, a ne polne reprodukcije (Li, 2015). U epidemiološkom smislu značajan je anamorfnu stadijum *B. cinerea* dok se teleomorfnu stadijum opisuje kao jedan od izvora genetičke varijabilnosti (Williamson et al., 2007). Genetička varijabilnost *B. cinerea* ispitivana je primenom raznih molekularnih tehnika, RFLP (Giraud et al., 1997), PCR detekcija transpozabilnih elemenata (Levis et

al., 1997), RAPD (**Kerssies et al.**, 1997), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (**Moyano et al.**, 2003), MP-PCR (**Ma and Michailides**, 2005) i drugim. Trenutno se ova kompleksna vrsta deli na dve filogenetske grupe, grupa I (*B. pseudocinerea*) i grupu II (*B. cinerea sensu stricto*) koja se odnosi na vrstu u užem smislu (**Assadollahi**, 2013).

Prvi simptomi na kupini javljaju se sredinom ili krajem leta na vegetativnim izdancima, na starijem ili potpuno razvijenom lišću u vidu svetlobraon pega. Pege se šire preko lisne drške na nodus odnosno stablo na kojem se uočavaju pege svetlo braon boje. Iako retko, stablo može biti prstenasto zahvaćeno. Mlado ili lišće koje raste nije osetljivo, a zaraženi listovi obično prevremeno opadaju. U toku jeseni izdanci prirodno menjaju boju pa se teško može razlikovati zdravo od zaraženog tkiva. Međutim, pege tokom zime dobijaju sivkast ili beličast izgled pa se lako mogu prepoznati izdanci koji su zaraženi. U okviru pega, tokom zime, obično se formiraju sklerocije u vidu plikova koji na proleće probijaju epidermis i obrazuju miceliju i konidije patogena. Simptomi mogu da liče na kestenjastu pegavost koju prouzrokuje *Xenodidymella applanata*, međutim, pege koje izaziva *B. cinerea* su svetlije i često sa koncentričnim šarama. Cvetovi su osetljivi od momenta otvaranja, a plodovi su osetljivi tokom čitavog perioda zrenja i skladištenja i na njima se javljaju karakteristični simptomi sive truleži. Mada se održava u zaraženim biljnim ostacima i u vlažnim uslovima sporuliše (**Williamson**, 2017f), formira i sklerocije koje se smatraju značajnim za dugoročno održavanje (**Li**, 2015; **Bristow and Williamson**, 2017). Hlamidospore takođe mogu da posluže za održavanje patogena (**Li**, 2015). Detaljan izgled konidiofora i konidija *B. cinerea* opisali su **Bristow and Williamson** (2017), a izgled apotecija, askospora i askusa pružili su **Bulit and Dubos** (1988) i **Li** (2015). Sivu trulež kupine mogu da prouzrokuju još dve vrste ovog roda i to *B. patula* i *B. caroliniana* koje su detektovane u SAD, međutim njihov značaj nije veliki usled ograničene rasprostranjenosti (**Li et al.**, 2012; **Li**, 2015).

➤ *Xenodidymella applanata* (**Niessl**) **Q. Chen & L. Cai** (syn. *Didymella applanata* (**Niessl**) **Sacc.**), prouzrokovatelj kestenjaste pegavosti maline (sušenje izdanaka maline), jedan je od najznačajnijih prouzrokovatelja bolesti na malini, specijalizovan za rod *Rubus*. Ova vrsta pripada familiji Didymellaceae koja je ustanovljena 2009. godine da bi se rešio taksonomski položaj rodova *Ascochyta*, *Didymella* i *Phoma*, kao i nekoliko rodova

srodnih rodu *Phoma* (**Chen et al.**, 2015). Multilokus filogenetska analiza zasnovana na ITS regionu rDNA, LSU nrDNA, RPB2 i β -tubulin, pokazala je da u okviru familije Didymellaceae postoji 17 monofiletičkih grupa, formirano je devet novih rodova, uključujući i *Xenodidymella* u koji je reklasifikovana vrsta *D. applanata* **Chen et al.** (2015). Anamorfnu stadijum *X. applanata* opisan je pod imenom *Phoma argillacea* (**De Gruyter et al.**, 2002; **Lindqvist-Kreuze**, 2003). *X. applanata* parazitira malinu, kupinu kao i hibride koji nastaju njihovim međusobnim ukrštanjem. Prisutna je širom sveta, a najznačajnija je na teritoriji Evrope i Amerike (**Williamson**, 2017a). U Srbiji prvi put je detektovana 1949. godine u okolini Valjeva (**Perišić**, 1951), a danas je rasprostranjena u svim regionima gajenja maline (**Stojanović**, 2004). Malo je podataka u svetu i u Srbiji o pojavi bolesti na kupini. **Arsenijević** (2006a) je na osnovu simptoma i morfologije identifikovao *X. applanata* na kupini u Srbiji navodeći da je nalažena u obolelim uzorcima kupine poreklom iz okoline Šapca sa simptomima nekrotične pegavosti stabla. Nekrotične pege se šire, zahvataju čitave internodije i prouzrokuju uvelost i sušenje izdanaka uz pucanje i ljušćenje kore. U zoni nekrotiranog tkiva formiraju se piknidi i pseudotecije. Prema **Williamson** (2017a) infekcija nastaje i širi se od ivice lista duž lisnih nerava sve do centralnog nerva, a zatim kroz lisnu dršku inficira stablo. Patogen zaražava samo primarnu koru. Nekrotične zone mogu biti krupne i spajanjem pega čitave internodije su zahvaćene što izaziva uvelost, a potom i sušenje izdanaka. Zaražena tkiva postaju svetlija i vremenom dobijaju sivkasto-beličastu boju, dolazi do pucanja kore i njenog ljušćenja. Patogen se u prirodi održava polnim i bespolnim tvorevinama odnosno pseudotecijama i piknidima u nekrotičnim tkivu. Izgled pseudotecija, askospora, piknida, i konidija detaljnije je opisan u radu **Williamson** (2017a).

➤ ***Elsinoë necator* (Ellis & Everh.) Rossman & W. C. Allen** (syn. *Elsinoë veneta* (Burk.) Jenk); anamorf: *Sphaceloma necator* (Ellis & Everh.) Jenk. & Shear, prouzrokovatelj je antraknoze i javlja se na više biljnih vrsta iz roda *Rubus* uključujući i kupinu. Najštetnija je na crnoj malini (*Rubus occidentalis*), ali može biti značajna i na malini, kupini, kao i njihovim hibridima. Ozbiljni gubici u prinosu nastaju usled defolijacije, uvenuća i izumiranja stabla (**Munro et al.**, 1988; **Travis and Williamson**, 2017). U Srbiji je na osnovu simptoma i morfologije identifikovana kao patogen kupine (**Arsenijević**, 2006b). Simptomi antraknoze najuočljiviji su na stablu iako se javljaju i na

lišću, lisnim drškama, pupoljcima i plodovima. Pege su crvenkasto-ljubičaste, okruglaste do eliptične. Razvojem bolesti pege se uvećavaju i postaju ulegnute u centru dobijajući karakterističan antraknozni izgled i menjaju boju u bledožutu do pepeljastosivu. Pege mogu da se spoje pa čak i prstenasto zahvate stablo izazivajući sušenje a često i lomljenje usled gubitka mehaničke čvrstine. Na kupini pege mogu da imaju širok ljubičasti oreol (**Travis and Williamson, 2017**). Zaraženi izdanci mogu izumreti tokom zime, ili daju rodne grane sa deformisanim plodovima, pogotovo u uslovima suše. Što su infekcije ranije to su antraknozne pege krupnije i dublje zahvataju tkivo dok kasnije infekcije rezultiraju plićim pa i površinskim nekrozama koje su i manje štetne. Prema podacima **Nordskog et al. (2003)** bolest se javlja samo na rodnim ali ne i na vegetativnim izdancima kupine i nije detektovana na drugim biljnim organima. Pege su izdužene, ulegnute, sivkaste, dužine do 0,5 cm. Međutim **Travis and Williamson (2017)** opisuju simptome i na lišću kupine koji mogu da podsećaju na simptome rđe koje izaziva *Phragmidium violaceum*. Prvi simptomi slični su onim na stablu u vidu purpurnih pega (1,5 mm u prečniku) koje vremenom dobijaju beličast izgled u centralnom delu koji može da ispadne dovodeći do šupljikavosti. Slični simptomi pegavosti i antraknoze mogu se uočiti i na cvetovima i plodovima. Prezimljava u zaraženim stablima u kojima formira polne i bespolne plodonosne tvorevine. U proleće formiraju se konidije i askospore koje su izvor inokuluma i sposobne su da zaraze jedino mlado zeljasto tkivo. Za nastanak i širenje bolesti neophodno je vlažno vreme praćeno kišom. U proleće formiraju se strome ispod epidermalnog i subepidermalnog sloja koji puca i uočavaju se acervule sa kratkim nerazgranatim konidioforama koje nose konidije. Pseudotecije se razvijaju tokom leta ali sazrevaju u proleće iduće godine kada se u njima razvijaju askusi sa askosporama (**Travis and Williamson, 2017**).

➤ *Septocytia ruborum* (**Lib.**) **Petr.** (syn. *Rhabdospora ramealis* (Roberge ex Desmaz Sacc.), prouzročivač purpurne pegavosti kupine, javlja se kako na gajenoj tako i na divljoj kupini, na bestnim ali i na sortama kupine koje imaju bodlje. Parazitira kupine, a pre svega vrstu *Rubus fruticosus* i nije potvrđena na drugim domaćinima (**Adair et al., 2012**), osim nedovoljno dokumentavonog nalaza na *Potentilla* sp. (**Feige et al., 2001**). Purpurna pegavost je bolest stabla i bočnih grana kupine, a može da zahvati i zeleno lišće (**Nordskog et al., 2003; Williamson, 2017b**). Javlja se širom Evrope i prvi put je nađena

u Francuskoj (**Williamson**, 2017b). Najviše informacija vezanih za pojavu bolesti koju prouzrokuje *S. ruborum* dobijeni su iz eksperimenata inokulacije i epidemioloških istraživanja u Švajcarskoj gde su beleženi veliki gubici u prinosu, čak i do 80%. Sa druge strane, vrsta je ocenjena i kao potencijalni agens za biološko suzbijanje evropske kupine koja je veoma značajna korovska vrsta u Australiji (**Adair et al.**, 2012; **Williamson**, 2017b). U Srbiji, sedamdesetih godina XX veka pažnju je privukla masovna pojava bolesti kupine u rejonu Iriga, Šapca, Loznice, kasnije i Valjeva, koja je dovela do značajnog smanjenja prinosa, čak i do 80 % (**Garić i Ranković**, 1996). Na osnovu morfologije i simptoma prouzrokovatelj bolesti identifikovan je kao *S. ruborum* (**Arsenijević**, 1989; **Arsenijević i sar.**, 1989; **Babović i Delibašić**, 1994), a danas se smatra značajnim patogenom kupine u Srbiji. Patogen je identifikovan i primenom molekularnih metoda, sekvenciranjem ITS regiona rDNA (**Aleksić et al.**, 2012). Prisutna je i u Hrvatskoj i na prostorima BiH (**Karačić i sar.**, 2011). Simptomi se javljaju obično krajem leta u vidu tamnozelenih pega na vegetativnim izdancima, bliže površini zemljišta, a širi se na gornje delove stabla tokom jeseni i zime. Pege vremenom dobijaju crvenkasto-ljubičastu boju sa crvenom ivicom koja ih okružuje i mogu da se spoje zahvatajući veliki deo pa i čitave internodije. U proleće centralni deo pege dobija svetlobraon boju i uočavaju se crni sitni piknidi koji izbijaju kroz epidermis. U vlažnim uslovima tokom proleća dolazi do oslobađanja spora iz piknida u vidu želatinozne mase (do 1 mm dužine). Simptomi mogu da podsećaju na oštećenja od poznih mrazeva (**Garić and Ranković**, 1996; **Williamson**, 2017b). Iako retko, može da napadne lišće na kome se javljaju sitne sivkaste pege oivičene crvenkastom bojom (**Nordskog et al.**, 2003). Do sada nije utvrđeno da li *S. ruborum* formira teleomorfni stadijum (**Adair et al.**, 2012). Izgled piknida i konidija detaljnije je opisao **Williamson** (2017b). Malo je podataka o molekularnoj identifikaciji i karakterizaciji *S. ruborum*. Sekvenciranje ITS regiona rDNA nije pokazalo zadovoljavajuću rezoluciju, tako da su sekvence *S. ruborum* identične ili veoma slične vrstama roda *Septoria* (**Adair et al.**, 2012). Sa druge strane novija istraživanja ukazuju da je *S. ruborum* ne samo molekularno slična rodu *Septoria* i zauzima centralnu poziciju u *Septoria sensu stricto* filogenetskom klasteru, već i prema svojim morfološkim osobinama može da se poveže sa ovim rodnom (**Quaedvlieg et al.**, 2013). Međutim, kako je mali broj izolata okarakterisan i osnovni materijal nedostupan, status ove vrste nije konačan i potrebna su dodatna istraživanja (**Quaedvlieg et al.**, 2013).

Genetička varijabilnost *S. ruborum* ispitivana je primenom RFLP tehnike, uz značajnu varijabilnost Evropskih populacija, a kao centar biodiverziteta označene su Francuska, Italija i Engleska. Nije ustanovljena veza između filogenetskih grupa i virulentnosti, kao ni sa biljkom domaćinom (**Adair et al.**, 2012).

➤ *Seimatosporium lichenicola* (**Corda**) **Shoemaker & Müller**, prouzrokovač sušenja stabla maline i kupine u Severnoj Americi i Evropi (**Sutton and Williamson**, 2017), opisan je i na većem broju biljaka domaćina iz najmanje 17 različitih rodova (**Sutton**, 1980; **Farr et al.**, 1989; **Melnik and Popushoj**, 1992). U Srbiji je identifikovana na osnovu morfoloških osobina i to samo na kupini kao domaćinu (**Arsenijević et al.**, 1999). Simptomi se javljaju krajem leta ili rano u jesen i najuočljiviji su na rodnim izdancima, pogotovo posle povreda od zimskih mrazeva. Pege su pepeljasto-beličaste, često oivičene crvenkastom marginom, krupne (7 - 20 cm) i retko prstenasto obuhvate stablo. Prvenstveno se javlja na nodusima jer do infekcije najverovatnije dolazi preko lisne peteljke ili lisnog ožiljka. U proleće pege dobijaju tačkast izgled usled formiranja acervula crvenkasto-braon boje. Ponekad formiranje acervula i sporulacija mogu da započnu krajem leta prethodne godine. Nakon pražnjenja acervula pege dobijaju čađavo crnu boju, a tkivo kore puca i dobija ljuspast izgled. Nije do kraja rasvetljen efekat bolesti na propadanje, prinos i kvalitet plodova (**Sutton and Williamson**, 2017). Masovnijoj pojavi bolesti pogoduju niske temperature koje oštećuju biljke (**Arsenijević et al.**, 1999). Izgled tvorevina polnog razmnožavanja, peritecija, askusa i askospora, kao i tvorevina bespolnog razmnožavanja, acervula, konidiofora i konidija opisali su **Sutton and Williamson** (2017).

➤ *Cercospora rubi* (**G.Wint.**) **Plakidas**, prouzrokovač rozetavosti (veštičijih metli), značajan je patogen kupine u SAD. Dugo se smatralo da je rasprostranjena jedino u tom delu sveta, međutim, identifikovana je kao prouzrokovač propadanja bojesenberija (Boysenberry, hibrid maline, kupine i longberija) na Novom Zelandu još početkom osamdesetih godina XX veka i od tada se javila i u Meksiku i Čileu na kupini sa uspravnim stablom (**Langford et al.**, 2003; **Smith**, 2017). Krug domaćina *C. rubi* ograničen je na rod *Rubus*. Prema raspoloživim literaturnim podacima nije detektovana na teritoriji Srbije i Evrope. Štete nastaju usled smanjenja količine i kvaliteta roda, a može

doći i do izumiranja izdanaka (**Smith, 2017**). Razlikuju se dva osnovna tipa simptoma, rozetavost i simptomi na cvetu. Rozetavost nastaje kao rezultat proliferacije zaraženih vegetativnih pupoljaka iz kojih se razvija veći broj izbojaka obraslih lišćem, koji su slabije razvijeni, blede zelene boje su i liče na veštičije metle sa sterilnim cvetovima. Drugi tip simptoma javlja se na cvetu. Zaraženi, neotvoreni cvetovi su izduženi, uvećani, i crvenkasti, a čašični listići mogu da se transformišu u lišće. Zaraženi krunični listići su ružičasti i naborani, a tučak je uvećan i kao i prašnici može dobiti braon boju. Zaraženi organi prekriveni su micelijom sa beličastom masom spora. Na zaraženim izdancima plodovi se uglavnom ne formiraju. Ciklus bolesti prati dvogodišnje razviće kupine. Patogen sporuliše na cvetovima rodnih izdanaka, a konidije uz pomoć vetra, dospevaju na mlade izdanke i zaražavaju pazušne pupoljke. Pupoljci uglavnom ne ispoljavaju simptome, a patogen se razvija i okružuje embrionalno tkivo gde prezimljava (**Smith and Killebrew, 2002; Liman et al., 2004; Smith, 2017**). Simptomi postaju vidljivi tek naredne godine. Morfologija konidiofora i konidija detaljno je opisana u rezultatima **Smith (2017)**.

➤ *Sphaerulina westendorpii* **Verkley, Quaedvlieg & Crous**, prouzrokovatelj septorijske pegavosti lista kupine. Ima veoma uzak krug domaćina i nije pronađena ni na jednom drugom domaćinu osim kupine (**Brannen and Ellis, 2017**). Ova vrsta ranije je identifikovana pod imenom *Septoria rubi* koja prouzrokuje pegavost lista maline (**Ellis, 1991**). Međutim **Verkley et al. (2013)** su na osnovu filogenije zasnovane na ITS regionu rDNA, LSU nrDNA, RPB2, ACT, CAL, β -tubulin, i EF1- α razdvojili ove dve vrste. *S. westendorpii* danas je posebna vrsta koja se od *S. rubi* razlikuje i po morfologiji konidija (**Brannen and Ellis, 2017**). Ove dve vrste imaju i različit krug domaćina, odnosno utvrđeno je da *S. westendorpii* ne zaražava malinu, a *S. rubi* ne zaražava kupinu (**Brannen and Ellis, 2017**). Prema dostupnoj literaturi nije prisutna na prostorima Srbije. Pri jakom intenzitetu bolesti može doći do prevremene defolijacije krajem leta ili u ranu jesen pa su biljke slabije i znatno osetljivije na niske zimske temperature. Na lišću se javljaju karakteristične pege sa beličastim centrom i braon ili purpurnim obodom, slične antraknoznom pegama ali krupnije, 3 - 4 mm u prečniku. U centralnom delu pege formiraju se piknidi crne boje. Na stablu i lisnim peteljkaama javljaju se izdužene pege dok su one na lišću više kružnog oblika. Patogen se održava u vidu micelije ili nedozrelih

piknida u zaraženim organima biljaka. Zaraza se širi sporama tokom kišnog vremena kada se kapima vode nošenim vetrom spore raznose na manja ili veća rastojanja. Peritecije, askusi, askospore, piknidi i konidije detaljno su opisali **Brannen and Ellis** (2017).

➤ ***Sydowiella depressula* (P. Karst.) Barr**, prouzrokovač nekroze stabla kako bestrnih sorti na kojima je štetnija, tako i sorti kupine sa trnjem (**Nordskog et al.**, 2003). Osim na kupini i malini *S. depressula* nađena je i na *Rubus parviflorus* u Britanskoj Kolumbiji i na mrtvim izdancima vrsta roda *Rubus* u Evropi i Severnoj Americi, a u Srbiji nije prisutna. Ova gljiva prvobitno je opisana u Škotskoj na crvenoj malini u zasadima koji su bili plavljeni tokom zime ili su na nižim terenima na kojima se češće javljaju mrazevi (**Williamson**, 1980; **Williamson**, 2017c). Slično malini, na kupini pojava bolesti vezuje se za oštećenja od niskih temperatura (**Williamson**, 1980; **Nordskog et al.**, 2003; **Williamson**, 2017c). Simptomi se javljaju na prizemnom delu stabla rodnih izdanaka u vidu nekroze. Nekrotične pege tokom zimskog perioda postaju srebrnkaste, blago ulegnute, a u okviru njih formiraju se crne peritecije čiji vrhovi izdižu koru u vidu plikova. Nekroza može prstenasto da zahvati stablo usled čega dolazi do sušenja izdanka iznad tog mesta. U proleće dolazi do pucanja kore što liči na oštećenja od mraza. *S. depressula* formira peritecije, askuse i askospore čiji su izgled opisali **Nordskog et al.** (2003) i **Williamson** (2017c).

➤ ***Gnomonia rubi* (Rehm) Winter in Rabenh** je prouzrokovač nekroze stabla kupine koji parazitira još malinu, ruže i longberi (**Williamson**, 1980; **Moročko and Fatehi**, 2007). Ne postoje dostupni literaturni podaci o štetnosti i rasprostranjenosti ali zna se da je prisutna na području Evrope i Amerike (**Williamson**, 1980; **Nordskog et al.**, 2003). *G. rubi* nije prisutna u Srbiji kao prouzrokovač bolesti na kupini ili drugim domaćinima. Simptomi na kupini slični su onima koje izaziva *S. depressula*. Nekroza se javlja u prizemnom delu stabla i širi od osnove. Nekrotično tkivo je mrke boje, ulegnuto, tokom zime dobija srebrnkastu boju i dolazi do pucanja kore, nalik oštećenjima od mraza. U okviru zahvaćenog tkiva formiraju se crne peritecije u vidu plikova. *G. rubi* je agresivnija na rodnim nego na vegetativnim izdancima bestrne kupine. Pretpostavlja se da niske zimske temperature i mrazovi koji oštećuju biljke favorizuju nastanak i širenje bolesti jer je pojava bolesti u takvim uslovima intenzivnija. Iako se na osnovu simptoma ne mogu

razlikovati, *G. rubi* i *S. depressula* se morfološki razlikuju po tome što *S. depressula* formira peritecije sa dužim vratom u odnosu na *G. rubi*. Međutim, ovakva dijagnostika nije dovoljno pouzdana, tako da treba uključiti i druge morfološke kriterijume kao i molekularnu identifikaciju (Nordskog et al., 2003; Williamson, 2017c). Detaljniji opis polnih tvorevina, peritecija, askusa i askospora *S. depressula* pružio je Williamson (2017c).

➤ ***Gnomonia rostellata* (FR.) Wehm.**, prouzrokovatelj nekrotične pegavosti i izumiranja stabla kupine, poznat je patogen kupine na teritoriji Srbije (Veselić, 1994, Arsenijević and Veselić, 1995, Arsenijević, 2006a). Pored kupine detektovana je i na malini u Švajcarskoj (Moročko and Fatehi, 2007), a prema navodima Veselić and Arsenijević (1998) kao domaćini u prirodi navode se još i jagoda, ruža i tajberi (tayberry). Zbog velike sličnosti u pogledu morfologije, domaćina i simptoma koje prouzrokuje *G. rostellata* dugo je smatrana sinonimom vrste *G. rubi* (Arsenijević and Veselić, 1995). *G. rubi* formira četiri normalno razvijene askospore u askusima dok *G. rostellata* formira četiri normalne i dve do četiri degenerisane askospore. Međutim, novija istraživanja bazirana na primeni molekularnih metoda sugerišu da se radi o dve različite vrste slične morfologije i prouzrokovatelji su bolesti na istom domaćinu. Analizom ITS regiona rDNA i dela gena velike subjedinice rRNA ustanovljeno je da se *G. rubi* i *G. rostellata* genetički razlikuju i pripadaju odvojenim filogenetski klasterima. Osim što pripadaju genetski različitim grupama ustanovljene su i određene odgajivačke razlike između izolata ove dve vrste što je podržalo stanovište da se radi o različitim vrstama (Moročko and Fatehi, 2007).

Simptomi koje *G. rostellata* izaziva na gajenoj kupini postaju uočljivi u proleće na rodnim izdancima. Pege su u početku elipsoidne, tamnoljubičaste boje, različite veličine, najčešće oko 2 - 3 cm dužine. Vremenom se uvećavaju i spajaju formirajući šire nekrotične zone dužine i preko 30 cm koje mogu da obuhvate i čitave internodije. Patogen inficira periderm i ksilem, sprečava normalan tok nutrijenata i izaziva tipične simptome uvenuća i izumiranja. Bolest može da zahvati i cvetne grane i pupoljke izazivajući sušenje čak i pre formiranja plodova. Nije uočeno da patogen zaražava plodove kupine. Tokom vegetacije tamnoljubičaste nekrotične zone dobijaju beličasto-sivkast izgled sa tamnoljubičastom marginom, a u njima se formira mnoštvo crnih peritecija (Arsenijević

and Veselić, 1995). Detaljan opis morfoloških osobina teleomorfa, peritecija, askusa i askospora kao i hlamidospora na PDA podlozi dali su **Arsenijević and Veselić** (1995). Identifikacija vrste *G. rostellata* osim primenom tradicionalnih metoda moguća je i primenom molekularnih metoda koji jasno razdvajaju ovu vrstu od drugih vrsta roda *Gnomonia*. ITS region rDNA i LSU nrDNA sa uspehom se koriste u identifikaciji i karakterizaciji ovog patogena (**Moročko and Fatehi**, 2007).

➤ *Colletotrichum spp.*, prouzrokovajući antraknoze, značajni su patogeni kupine u svetu. U Južnoj Americi, pre svega u Kolumbiji, prouzrokovajući antraknoze kupine iz roda *Colletotrichum* predstavljaju limitirajući faktor u proizvodnji sposobni da unište čitave zasade. Mogu da dovedu do gubitaka od 50 – 76 % pa čak i 100% (**Tamayo**, 2001; **Forero de La-Rotta et al.**, 2002; **Rueda-Hernandez et al.**, 2013). *Colletotrichum gloeosporioides* i *C. acutatum* najznačajniji su i najrasprostranjeniji prouzrokovajući antraknoze na kupini. Bolest može da zahvati stablo, trnove, cvetove i plodove. Simptomi bolesti su u vidu purpurnih eliptičnih pravilnih pega na stablu praćenih pojavom narandžaste mase spora, dok se na trnovima (na sortama koje imaju trnje) javljaju beličaste pege sa sitnim crnim tačkama. Na pupoljcima i cvastima javlja se trulež (**Tamayo**, 2001; **Forero de La-Rotta et al.**, 2002). Ukoliko patogen napadne plodove dolazi do truleži i mumifikacije (**Afanador-Kafuri et al.**, 2014). *C. gloeosporioides* prvi put je identifikovan na području bivše Jugoslavije kao prouzrokovatelj antraknoze agruma u Crnoj Gori (**Mijušković**, 1953). Od tada je opisana na višnji, jabuci, kruški, jagodi, šljivi, tikvici, bršljenu, kantarionu i beloju imeli (**Arsenijević**, 1984; **Stojanović**, 1989; **Stojanović i sar.**, 2002; **Trkulja**, 2004; **Ivanović**, 2006; **Ivanović i sar.**, 2007; **Živković**, 2009). Vrsta *C. acutatum* na teritoriji Srbije prvi put je identifikovana kao prouzrokovatelj gorke truleži plodova jabuke (**Trkulja**, 2004), a nakon toga identifikovana je kao prouzrokovatelj bolesti jagode, kruške, paradajza i nektarine (**Ivanović i sar.**, 2007; **Živković i sar.**, 2008a; **Živković i sar.**, 2008b; **Živković i sar.**, 2012).

Primenom molekularnih metoda ustanovljeno je da su *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* veoma kompleksne i da se osim njih na kupini može naći i vrsta *C. boninense*. Sve vrste roda *Colletotrichum* koje parazitiraju kupinu s obzirom na rasprostranjenost prisutne su često i u mešanim infekcijama, čak i u okviru iste pege (**Rueda-Hernandez et al.**, 2013; **Afanador-Kafuri et al.**, 2014). Kompleks *C. gloeosporioides* obuhvata 22

vrste i jednu podvrstu koje su kosmopolitski rasprostranjene sa veoma širokim krugom domaćina. Sve vrste morfološki odgovaraju navedenom kompleksu, a potvrđene su multigenomskom filogenetskom analizom (ACT, CAL, CHS-1 (hitin sintaza), GAPDH, ITS region rDNA, GS (glutamin sintetaza), SOD2 (mangan-superoksid dismutaza), β -tubulin) (Weir et al., 2012). Kompleks *C. acutatum*, na osnovu multilokusne filogenetske analize (ITS region rDNA, ACT, β -tubulin, CHS-1, GAPDH, HIS), obuhvata 31 kosmopolitski rasprostranjenu vrstu sa veoma širokim krugom domaćina (Damm et al., 2012a). Osim ova dva kompleksa vrsta na kupini se veoma retko može javiti i *C. boninense* kompleks koji obuhvata 17 vrsta potvrđenih na osnovu multilokusne filogenetske analize (ITS region rDNA, ACT, β -tubulin, CHS-1, GAPDH, HIS i CAL) (Damm et al., 2012b; Afanador-Kafuri et al., 2014). Navedeni kompleksi vrsta roda *Colletotrichum* izraženo su varijabilni kako u pogledu morfoloških i bioloških tako i u pogledu genetičkih osobina (Weir et al., 2012; Damm et al., 2012a; Damm et al., 2012b). Sa istih biljnih organa izolovani su predstavnici različitih kompleksa, mada postoji i izvesna preferencija u pogledu biljnih organa. Utvrđeno je da je *C. gloeosporioides* prisutnija na trnovima, a *C. acutatum* na stablu i cvetovima kupine (Rueda-Hernandez et al., 2013). U pogledu virulentnosti postoje izražene razlike kako između različitih kompleksa vrsta tako i između različitih vrsta u samom kompleksu kao i nižih taksonomskih kategorija. Najagresivniji na kupini bili su izolati kompleksa *C. gloeosporioides*, umereno virulentni izolati kompleksa *C. acutatum* a najmanje agresivni izolati iz kompleksa *C. boninense* mada se oni i ređe javljaju na kupini (Afanador-Kafuri et al., 2014).

➤ *Gnomoniopsis idaeicola* (P. Karst.) D. M. Walker, comb. nov. (sin. *Calosphaeria idaeicola* P. Karst.; sin. *Diaporthe idaeicola* (P. Karst.) Vestergr.), prouzrokovatelj nekroze stabla kupine. Prvobitno je izolovana iz prezimelih stabala maline u Finskoj (Walker et al., 2010). Opisana je kao patogen biljaka iz roda *Rubus* i to maline (*Rubus idaeus* L.) i srodnih vrsta kao što su *R. nivalis*, *R. pedatus*, *R. procerus*, *R. spectabilis*. Geografska rasprostranjenost prema raspoloživim literaturnim podacima obuhvata Evropu (Finska, Francuska) i SAD (Kalifornija, Oregon, Vašington) (Walker et al., 2010; Walker, 2012). Walker et al. (2010) pružili su detaljniji opis peritecija, askusa i askospora *G. idaeicola*. Održava se na prezimelim izdancima u peritecijama koje se formiraju ispod epidermisa. Mirhosseini et al. (2015) iz listova kupine sa simptomima lisne pegavosti dobili su

izolate koje su morfološki i molekularno identifikovali kao *Gnomoniopsis* sp., pretpostavljajući da se radi o *G. idaeicola*.

➤ *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous poznata je kao značajan patogen velikog broja pre svega drvenastih biljaka, uglavnom u umerenom klimatu (Phillips et al., 2013). Najznačajnija je kao patogen vinove loze (Úrbez-Torres et al., 2006; Kaliternam et al., 2013). Opisana je kao patogen stabla bestrnih sorti kupine u Italiji što je prvi nalaz na ovom domaćinu (Faedda et al., 2018). Osim vinove loze značajni domaćini su i jabuka, kruška, breskva, kajsija, trešnja, orah, maslina, citrusi i borovnica (Pennycook and Samuels, 1985; Gadgil et al., 2005; Thomidis et al., 2011; Wright et al., 2012; Gramaje et al., 2012; Abdollahzadeh et al., 2013; Zhongdong et al., 2015). Za sada nije poznato da je *N. parvum* patogen kupine u Srbiji gde je opisan jedino kao parazit većeg broja drvenastih biljaka (Zlatković, 2016). Na vinovoj lozi patogen zaražava višegodišnji drvenasti deo koji često dobija karakterističnu klinastu nekrozu na poprečnom preseku stabla u obliku slova "V" koja vremenom dovodi do potpunog sušenja biljaka (Kaliternam et al., 2013). Takođe i na drugim domaćinima prouzrokuje nekrozu drveta i sušenje grana pa i čitavih biljaka (Gadgil et al., 2005; Thomidis et al., 2011; Wright et al., 2012; Gramaje et al., 2012; Zhongdong et al., 2015). Poznato je da može da izazove i trulež plodova (Thomidis et al., 2011). Patogen se održava u zaraženim biljkama, a piknidi koji se formiraju u zaraženom tkivu glavni su izvor inokuluma. Smatra se da je glavni put prodiranja *N. parvum* preko povreda nastalih orezivanjem (Úrbez-Torres et al., 2009). Izgled tvorevina polnog razmnožavanja, peritecija, askusa i askospora, kao i tvorevina bespolnog razmnožavanja odnosno piknida i konidija detaljno su obradili Phillips et al. (2013). Teleomorf se retko formira, a za konvencionalnu identifikaciju značajnije su morfološke osobine anamorfa (Jacobs and Rehner, 1998; Denman et al., 2000). Zbog velike sličnosti različitih vrsta, tek primenom molekularnih metoda u kombinaciji sa morfološkom karakterizacijom moguća je identifikacija do nivoa vrste. Nedavnom revizijom roda *Botryosphaeria*, vrste čiji je anamorf u tipu *Fusicoccum* svrstane su u novoformirani rod *Neofusicoccum* (Crous et al., 2006; Phillips et al., 2013). Nakon prvog opisa pod imenom *Botryosphaeria parva* (anamorf pod imenom *Fusicoccum parvum*) (Pennycook and Samuels 1985), danas je reklasifikovana u novoformirani rod *Neofusicoccum*, tako da je ova vrsta dobila ime *N.*

parvum. Identifikacija *N. parvum* i razdvajanje od drugih srodnih vrsta roda *Botryosphaeria* pogotovo od *N. ribis* sa kojom deli mnoge zajedničke osobine, veoma je teška. Razlikovanje ove dve vrste moguće je primenom molekularnih metoda sekvenciranjem ITS regiona rDNA, kodirajućih gena za β -tubulin i EF1- α , kao i gena za RPB2, koji su osnova u identifikaciji vrsta porodice Botriosphaeriaceae (**Smith and Stanosz**, 2001; **Slippers et al.**, 2004; **Taylor et al.**, 2005; **Alves et al.**, 2005; **Úrbez-Torres et al.**, 2006; **Slippers et al.**, 2007; **Qiu et al.**, 2008; **Pavlic et al.**, 2009; **Pitt et al.**, 2010; **Sakalidis et al.**, 2011). Nema puno dostupnih informacija vezanih za genetičku varijabilnost vrste *N. parvum*. **Baskarathevan et al.** (2012) ispitivali su varijabilnost 60 izolata poreklom iz vinograda iz Novog Zelanda, Južne Afrike i Australije. Primenom metode UP-PCR (Universally primed polymerase chain reaction) izolati su grupisani prema geografskom poreklu (**Travadon et al.**, 2012). Iako se kod predstavnika Botriosphaeriaceae polni proces retko dešava u prirodi, izražena varijabilnost kao i mali broj klonalnih izolata ukazuje na postojanje paraseksualnih procesa što je i potvrđeno metodom vegetativne kompatibilnosti. Nije utvrđena uzajamna zavisnost između virulentnosti i pripadnosti izolata određenim genetičkim grupama. Neki izolati koji pripadaju istim genetičkim grupama ispoljili su različitu virulentnost, a neki izolati koji pripadaju različitim genetičkim grupama ispoljili su sličnu virulentnost (**Baskarathevan et al.**, 2012).

2.6. Istraživanja bolesti stabla kupine u Srbiji

Prouzrokovani bolesti stabla kupine u Srbiji nisu dovoljno proučena grupa patogena. Većina istraživanja koja obrađuju ovu tematsku celinu bave se rasvetljavanjem etiologije uočenih simptoma tako da je do danas, uglavnom na osnovu konvencionalnih metoda, zabeleženo prisustvo *Paraconiothyrium fuckelii* (**Arsenijević**, 2006b), *Botryosphaeria dothidea* (**Arsenijević**, 2006b), *Diplodia seriata* (**Arsenijević**, 2006b), *Phomopsis* spp. (**Arsenijević**, 2006a), *Botrytis cinerea* (**Arsenijević**, 2006b), *Xenodidymella applanata* (**Arsenijević**, 2006a), *Elsinoë necator* (**Arsenijević**, 2006b), *Septocytia ruborum* (**Arsenijević**, 1989; **Arsenijević i sar.**, 1989; **Babović i Delibašić**, 1994; **Garić i Ranković**, 1996; **Arsenijević**, 2006a; **Aleksić et al.**, 2012), *Seimatosporium lichenicola* (**Arsenijević et al.**, 1999; **Arsenijević**, 2006b) i *Gnomonia*

rostellata (Veselić, 1994; Arsenijević and Veselić, 1995; Arsenijević and Veselić, 1997; Veselić and Arsenijević, 1998; Arsenijević, 2006a) kao patogena kupine u Srbiji.

U navedenim izvorima opisane su osnovne karakteristike vrsta koje su potvrđene mikroskopiranjem obolelih uzoraka, izolacijom i utvrđivanjem osnovnih morfoloških osobina. Detaljnije ispitivanje morfoloških, odgajivačkih i patogenih osobina obavljeno je za vrste *S. lichenicola* (Arsenijević et al., 1999) i *G. rostellata* (Veselić, 1994). Skoro da ne postoje istraživanja koja uključuju ispitivanje strukture populacije ove grupe patogena, osim proučavanja *B. cinerea* poreklom sa ploda kupine (Tanović et al., 2009), kao i molekularne identifikacije *S. ruborum* na osnovu sekvenciranja ITS regiona rDNA (Aleksić et al., 2012). Struktura populacije manjeg broja vrsta proučena je na izolatima sa drugih biljaka domaćina, kao što su: *B. cinerea* na malini, jagodi i vinovoj lozi (Tanović et al., 2009), i *B. dothidea* na uskladištenim plodovima jabuke (Vasić et al., 2013).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Poslednjih godina došlo je do značajnih promena u tehnologiji gajenja kupine, naročito širenja proizvodnje i podizanja novih zasada sa promenjenom strukturom sorti. Ovakve promene pratila je intenzivna pojava različitih bolesti, a naročito bolesti stabla kupine, čija je etiologija u Srbiji uglavnom nepoznata. Osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je rasvetljavanje etiologije, utvrđivanje prisustva, rasprostranjenosti i značaja pojedinih vrsta gljiva prouzrokovaca bolesti stabla kupine u Srbiji.

Na osnovu višegodišnjih istraživanja koja su obuhvatila najznačajnije rejone gajenja kao i najzastupljenije sorte kupine osnovni cilj bio je da se prouči kompleks gljiva koje prouzrokuju bolesti stabla kupine u Srbiji kroz konvencionalnu, biološku i molekularnu identifikaciju i karakterizaciju. Dobijeni rezultati daće detaljnu sliku o tome koje su vrste fitopatogenih gljiva uključene u pojavu bolesti, ispitaće se rasprostranjenost ranije detektovanih vrsta, ali i prisustvo novih vrsta za Srbiju. Na ovaj način dobiće se uvid u prevalenciju vrsta kao i relativnu agresivnost, a poređenjem morfoloških, bioloških i molekularnih karakteristika dobijenih izolata odrediće se najpogodnije osobine koje pružaju odgovarajuću dijagnostičku rezoluciju i mogu da se koriste kao pouzdani taksonomski kriterijumi. Analiza sekvenci više genetičkih markera pružiće uvid u varijabilnost izolata iz Srbije i doprineće poznavanju strukture populacije pojedinih vrsta kroz ispitivanje filogenetskih međudnosa poređenjem sa drugim izolatima u svetu. Takođe molekularna analiza omogućiće uspostavljanje protokola za pouzdanu detekciju i identifikaciju. To je preduslov za uspostavljanje mera suzbijanja patogena stabla kupine u našoj zemlji, a ujedno i osnova za obezbeđivanje sadnog materijala kupine odgovarajućeg zdravstvenog stanja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka

Obilazak terena i sakupljanje uzoraka obavljeno je tokom četvorogodišnjeg perioda, od 2013. do 2016. godine, a zasadi kupine pregledani su na prisustvo bolesti stabla. Sakupljeni uzorci biljaka sa simptomima poslužili su kao početni materijal za dalja istraživanja. Ukupno je pregledano 24 zasada kupine, na 20 lokaliteta raspoređenih u 13 administrativnih okruga (Slika 1). Zasadi kupine bili su različite starosti od 2 do 15 godina i površine od 0,03 do 1,6 ha. Pregledom je obuhvaćeno pet široko rasprostranjenih komercijalnih sorti kupine u Srbiji i to Čačanska bestrna (16 zasada), Loch Ness (4 zasada), Thornfree (2 zasada), Chester Thornless (1 zasad) i Triple Crown (1 zasad) (Tabela 1). Tokom uzorkovanja procenjena je incidenca bolesti stabla kupine nasumičnim odabirom 100 biljaka kretanjem kroz zasad u cik-cak potezima kako bi se dobio reprezentativni uzorak. Iz svakog zasada uziman je različit broj uzoraka (5-30) u zavisnosti od raznovrsnosti simptoma i veličine zasada. Svaki uzorak sastojao se od dva simptomatična stabla po biljci koja su kraćena na 2 reznice 30-40 cm dužine. Uzorci su obeležavani, pakovani u plastične kese, transportovani u ručnom frižideru do Laboratorije za fitopatologiju, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu gde su smešteni u frižider na 5°C i obrađeni u roku od 24 h od momenta dopremanja u laboratoriju.



- Okruzi obuhvaćeni pregledom
- Okruzi koji nisu obuhvaćeni pregledom

Slika 1. Geografski raspored lokaliteta obuhvaćenih istraživanjima na teritoriji Republike Srbije

Tabela 1. Podaci o zasadima kupine obuhvaćenim istraživanjima na teritoriji Republike Srbije

God.	Okrug	Lokalitet	Sorta	Starost zasada (godina)	Površina (ha)	
2013	Jablanički	Leskovac	Čačanska bestrna	5	0,1	
	Mačvanski	Dragojevac	Čačanska bestrna	7	0,2	
2014	Podunavski	Vrbovac	Čačanska bestrna	8	0,1	
	Mačvanski	Mišar	Thornfree	6	0,15	
2015	Mačvanski	Miokus	Chester Thornless	15	0,05	
			Čačanska bestrna	15	0,05	
2016	Mačvanski	Dobrić	Čačanska bestrna	9	0,2	
	Sremski	Ruma	Čačanska bestrna	6	0,2	
	Borski	Negotin	Čačanska bestrna	10	0,15	
	Zaječarski	Zaječar	Čačanska bestrna	8	0,2	
	Zaječarski	Boljevac	Čačanska bestrna	3	0,15	
	Zaječarski	Knjaževac	Čačanska bestrna	3	0,05	
	Rasinski	Medveđa	Čačanska bestrna	5	0,15	
	Kolubarski	Donja Kamenica	Thornfree	7	0,1	
			Triple Crown	2	0,3	
				Loch Ness	7	0,15
				Čačanska bestrna	8	0,1
	Moravički	Ivanjica		Loch Ness	8	0,05
				Čačanska bestrna	4	0,03
	Moravički	Čačak	Loch Ness	6	0,25	
Šumadijski	Kragujevac	Čačanska bestrna	12	0,12		
Toplički	Prokuplje	Čačanska bestrna	10	0,18		
Rasinski	Brus	Čačanska bestrna	5	0,1		
Pomoravski	Svilajnac	Loch Ness	2	1,6		

4.2. Izolacija i dobijanje monosporijalnih izolata

Izolacija patogena obavljena je primenom standardnih fitopatoloških metoda. Sa svakog od dva simptomatična stabla u uzorku sečeno je po dva fragmenta dužine 5 cm koji su zatim ispirani česmenskom vodom u trajanju od 2 h. Fragmenti su površinski sterilisani potapanjem u rastvor komercijalne varikine i destilovane vode u odnosu 1:8 (0,5% Na hipohlorit) u trajanju od dva minuta nakon čega su isprani u sterilnoj destilovanoj vodi, a višak vode upijen je sterilnim filter papirom. Nakon uklanjanja kore, sa uzdužnog preseka na prelazu između zdravog i zaraženog tkiva isecano je 4 isečka po fragmentu (ukupno 16 isečaka po uzorku = 2 stabla u uzorku x 2 fragmenta po stablu x 4 isečaka po fragmentu). Isecci su uzimani sa pažljivo biranih pozicija kako bi se što bolje

pokrila raznolikost simptoma. Isečci su sušeni na vazduhu u laminarnoj komori u trajanju od 30 minuta i postavljeni u Petri kutije sa sterilnom podlogom od krompir dekstroznog agara (potato dextrose agar, PDA) (**Kirlay**, 1970). Podloga je pripremana od 200 g krompira, 20 g dekstroze (Decstroze, Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd), 17 g agara (Agar–agar, Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd) i 1 l destilovane vode. Pre sterilizacije, pH vrednost podloge podešena je na 5.5 – 6.0 (**Muntanola–Cvetković**, 1987).

Zasejani fragmenti inkubirani su u termostatu na temperaturi od 24°C, u trajanju od 5 dana, u uslovima mraka. Kolonije koje su se razvile oko fragmenta biljnog tkiva presejane su na svežu PDA radi dobijanja čistih kultura, koje su za svaki uzorak grupisane na osnovu izgleda i poslužile za dobijanje monosporijalnih izolata koji su dalje korišćeni. Monosporijalni izolati dobijeni su od čistih kultura gljiva svih izdvojenih izolata, tako što je u aseptičnim uslovima dodato 10 ml sterilne destilovane vode u razvijene kulture i blagim struganjem pomoću staklenog štapića oslobođena micelija i konidije. Po 1 ml suspenzije svakog izolata zasejavan je na vodeni agar (water agar, WA) (**Dhingra and Sinclair**, 1986). Ova podloga pripremana je od 17 g agara (Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd) i 1 l destilovane vode. Tako zasejane WA podloge inkubirane su na temperaturi od 24°C u trajanju od 12 h, a pojedinačne klijale konidije izdvajane su na svežu PDA. U cilju čuvanja izolata i formiranja kolekcije fragmenti kolonija monosporijalnih izolata prebacivani su u sterilne epruvete sa zakošenom PDA podlogom i čuvani u frižideru na 4°C. Na ovaj način formirana je kolekcija izolata koja je korišćena za dalji rad i presejavana na svakih 6 meseci radi održavanja. Izolati su na osnovu sličnosti u morfološkim osobinama grupisani u odgovarajuće morfološke grupe. Na osnovu preliminarne identifikacije odabran je najmanje po jedan izolat iz svake morfološke grupe iz svakog zasada.

4.3. Provera patogenosti

U cilju provere patogenosti monosporijalnih izolata urađene su veštačke inokulacije povređivanjem tkiva reznica vegetativnih izdanaka kupine u kontrolisanim uslovima klima komore prema metodi koju su opisali **Arsenijević et al.** (1999), a koja je modifikovana za potrebe istraživanja. Prikupljeni su zdravi i dobro razvijeni vegetativni

izdanci kupine (stablo prečnika oko 15 mm), u zasadu sorte Čačanska bestrna, u kojem do tada nije zabeležena pojava bolesti stabla, dopremljeni u laboratoriju i inokulisani istog dana. Pre inokulacije izdanci su skraćivani na dužinu 40 cm, i uklonjeni su listovi i bočne grane da bi se sprečio gubitak vode. Ovako dobijene reznice potom su donjim delom uronjene u sterilan vlažan kvarcni pesak u aluminijumskim posudama prečnika 15 cm. Posude i kvarcni pesak zajedno su sterilisani postupkom suve sterilizacije u trajanju od 4 h na 140°C (**Dhingra and Sinclair**, 1995).

Vršni deo reznica obmotavan je navlaženom sterilnom vatom i parafilmom kako bi se sprečilo isušivanje. Izolati starosti 15 dana, odgajeni na PDA na temperaturi od 25°C u uslovima mraka, korišćeni su za veštačke inokulacije reznica. Po jedan reprezentativni izolat iz svake morfološke grupe iz svakog zasada, ukupno 52 izolata, odabrano je i korišćeno za proveru patogenosti. Na središnjem delu reznice, u osnovi pupoljka, sterilnim skalpelom načinjen je zasek pod koru dužine oko 10 mm, bez povrede kambijalnog tkiva ispod kore. Fragmenti micelije prečnika 5 mm, sa ivice aktivno rastućih kolonija, postavljeni su u zasek tako da je kolonija sa micelijom bila u direktnom kontaktu sa reznicom. Inokulisani delovi pokriveni su sterilnom vatom natopljenom sterilnom destilovanom vodom i obmotani parafilmom kako bi se sprečilo isušivanje. Kao negativna kontrola korišćene su reznice kod kojih su na isti način u zaseke umetnuti fragmenti sterilne PDA. Inokulisano je po 5 reznica, za svaki odabrani izolat. Inokulisane kao i kontrolne reznice inkubirane su na temperaturi od 25°C u uslovima 12 h svetlo/12 h mrak na visokoj relativnoj vlažnosti vazduha.

Patogenost ispitivanih izolata ocenjena je 14 dana posle inokulacije, a patogenim su se smatrali oni izolati koji su doveli do razvoja vidljivih simptoma. Sa dela reznica na kojima su se razvili simptomi izvršena je reizolacija korišćenjem istih metoda kao i pri izolaciji. Na osnovu pregleda inokulisanih reznica kao i rezultata reizolacije doneta je ocena o stepenu ostvarene infekcije, odnosno o patogenosti ispitivanih izolata i ispunjenosti Kohovih postulata.

4.4. Morfološke osobine

Ispitivanje morfologije obuhvatalo je ispitivanja makroskopskih i mikroskopskih osobina. Sve morfološke osobine ispitivane su na PDA podlozi. Ukupno 468 izolata,

poreklom iz 24 zasada kupine, sa 20 lokaliteta, svrstano je u odgovarajuće morfološke grupe. Iz svake morfološke grupe iz svakog zasada odabran je po jedan reprezentativni izolat (ukupno 52 izolata). Svi izolati identifikovani su do nivoa roda, a odabrani reprezentativni izolati, po jedan sa svakog lokaliteta iz svake morfološke grupe detaljno su okarakterisani na osnovu makroskopskih i mikroskopskih osobina, kao i brzine porasta na PDA.

Ispitivanje makroskopskih osobina obuhvatilo je proučavanje izgleda i boje kolonija, formiranje, raspored i brojnost plodonosnih tvorevina 10, 20 i 40 dana posle zasejavanja i inkubacije na 24°C u uslovima smenjivanja svetlosti i tame u intervalima od 12 h. Pored toga, za sve izolate, određena je brzina porasta tako što je meren prečnik razvijene kolonije 3, 5 i 7 dana posle zasejavanja i inkubacije na 24°C u uslovima mraka. Brzina dnevnog porasta izračunata je kao prosek unakrsnog merenja prečnika kolonija u pet ponavljanja za svaki izolat, a ogled je ponovljen dva puta. Ispitivanje mikroskopskih osobina obuhvatilo je proučavanje izgleda i veličine piknida i konidija 10, 20 i 40 dana posle zasejavanja i inkubacije na 24°C u uslovima smenjivanja svetlosti i tame u intervalima od 12 h. Formiranje peritecija, askusa i askospora praćeno je i *in vivo* direktnim posmatranjem prezimelih rodničkih izdanaka kupine u polju. Nativni preparati za ispitivanje mikroskopskih osobina pripremani su od kultura odabranih izolata starih 14 dana, odgajenih na temperaturi od 24°C, u uslovima 12 h svetlo/12 h tama nanošenjem fragmenata micelije ili plodonosnih tvorevina sterilnom iglom u kap sterilne vode na predmetnom staklu i potom prekrivanjem pokrovnim staklom. Preparati su direktno posmatrani uz pomoć stereo mikroskopa (EU instruments SM-2TXX/10), kao i optičkog mikroskopa Olympus CX41, pod uvećanjima od 40x do 100x. Slike su napravljene uz pomoć mikroskopske kamere (10 MP Aptina Color CMOS, MU1000).

Sva merenja urađena su uz pomoć okularnog mikrometra. Veličina konidija, askusa i askospora određena je merenjem u 100 ponavljanja i izračunavanjem proseka, dok je veličina plodonosnih tvorevina odnosno piknida i peritecija određivana merenjem u 50 ponavljanja i izračunavanjem proseka. Nakon provere homogenosti dobijenih podataka, vrednosti brzine porasta analizirane su primenom Kruskal Wallis testa na nivou značajnosti 5%. Sva morfološka merenja analizirana su primenom ANOVA na nivou značajnosti 5%, nakon testiranja normalnosti (Shapiro-Wilk test) i ispunjavanja pretpostavke homogenosti podataka, dok je poređenje srednjih vrednosti rađeno

primenom Tukey's testa (**Sokal and Rohlf**, 1995). Statistička analiza urađena je primenom XLSTAT softvera.

4.5. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija

Za molekularnu identifikaciju korišćeni su nuklearni i mitohondrijalni konstitutivni ("housekeeping") i proteinski geni. Kao najpogodniji odabrani su ITS region rDNA (Nuclear ribosomal internal transcribed spacer region), TEF-1 α (translation elongation factor 1 α), TUB (β -tubulin), i FG1093 (60 S ribosomal protein L37). Dobijene sekvence korišćene su za analize i poređenje sa podacima dostupnim u bazama podataka NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), BOLD (Barcode of Life Data System, <http://www.boldsystems.org/>), и Q-bank (Comprehensive Databases On Quarantine Plant Pests And Diseases, <http://www.q-bank.eu/>), kao i filogenetske analize u cilju detaljnije identifikacije i karakterizacije izolata različitih patogena kupine u Srbiji.

Molekularnim ispitivanjima ITS regiona rDNA ukupno je obuhvaćeno 73 izolata različitog porekla i godina sakupljanja, svrstanih u različite morfološke grupe. Odabran je najmanje po jedan reprezentativni izolat iz svake morfološke grupe, iz svakog lokaliteta. ITS region rDNA korišćen je kao potvrda morfološke identifikacije. Za amplifikaciju TEF-1 α , TUB, i FG1093 gena odabrano je 11 izolata iz morfološke grupe *Gnomoniopsis* spp., poreklom iz 11 zasada sa 11 lokaliteta: KMI5-15, KRU9-15, KZAI1-15, KPK10-16, KNEI7-15, KAR2-16, KMS4-14, KVR2-14, KDK28-16, KKR7-16, KSV1-16. Sekvence ovih gena poslužile su za detaljnu molekularnu identifikaciju i karakterizaciju odabranih izolata i ispitivanje njihovih filogenetskih karakteristika.

4.5.1. Ekstrakcija DNA

Ekstrakcija DNA izvršena je pomoću komercijalnog kompleta DNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), u skladu sa uputstvima proizvođača. Ukupne DNA ekstrahovane su iz vazdušne micelije odabranih monosporijalnih izolata sakupljene direktno iz 10 dana starih kolonija odgajenih na PDA, na 25°C, u uslovima mraka. Količina od 100 mg sakupljene vazdušne micelije svakog izolata direktno je prebacivana

u mikrotubice zapremine 1,5 ml, gde je, uz dodavanje tečnog azota, vršena homogenizacija pomoću sterilnih mikrotučkova. Nakon homogenizacije u svaku mikrotubicu dodato je po 400 µl AP1 pufera i 4 µl enzima RNase A kako bi se lizirao ćelijski sadržaj ali i eliminisale ukupne ribonukleinske kiseline (RNA). Sadržaj tubice potom je kratko promešan na Vortexu, a suspenzija je inkubirana u vodenom kupatilu na 65°C u trajanju od 20 min. Tokom inkubiranja na svakih 2-3 min tubice su snažno promešane. U sledećem koraku u svaku mikrotubicu dodavano je po 130 µl P3 pufera koji je omogućio taloženje proteina i polisaharida. Sadržaj je vorteksovan i inkubiran 5 min na ledu. Po završenom postupku, sadržaj je pipetiran iz mikrotubica u QIAshredder Mini Spin Column koja se nalazi u kolektorskoj tubi i centrifugiran 2 min na 14.000 rpm. Nakon centrifugiranja lizat koji je propušten kroz filter prebačen je u tubice zapremine 1,5 ml vodeći pri tome računa da se ne poremeti talog na dnu kolektorske tubice. U svaku tubicu dodato je po 675 µl pufera AW1 uz lagano mešanje pipetom. Prvi deo od 650 µl ove suspenzije prebačen je u DNeasy Mini spin kolone sa filterom koja se nalazi u kolektorskoj tubi i centrifugiran 1 min na 8.000 rpm. Nakon centrifugiranja odstranjena je tečna faza koja je prošla kroz filter, dodata je preostala količina suspenzije iz tubice i ponovljen je isti proces centrifugiranja i odbacivanja tečne faze. Na ovaj način za filter su se vezale ukupne DNA. Nakon ovog procesa u DNeasy Mini Spin kolone dodato je 500 µl AW2 pufera i centrifugirane su 1 min na 8.000 rpm, potom je postupak ponovljen, a tubice su centrifugirane 2 min na 14.000 rpm. Ovaj korak obavljen je u cilju ispiranja i uklanjanja nečistoća koje su se, pored DNA, vezale za filter. Nakon centrifugiranja, Dneasy Mini spin kolona sa filterom prebačena je u mikrotubicu sa poklopcem (1,5 ml) i na filter je sipano 100 µl AE pufera. Uzorci su zatim inkubirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min da bi se omogućilo oslobađanje i rastvaranje DNA sa filtera, a potom su tubice centrifugirane 1 min na 8.000 rpm. Dobijena tečnost na dnu tubice predstavljala je ukupnu ekstrahovanu DNA i tako dobijeni uzorci čuvani su na – 80°C do dalje upotrebe.

4.5.2. Lančana reakcija polimeraze (Polimerase Chain Reaction - PCR)

Kao potvrda konvencionalne identifikacije izvršena je molekularna identifikacija i karakterizacija 73 odabrana izolata patogena kupine u Srbiji primenom metode lančane

reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR). Odabrani ciljani segmenti DNA i to ITS region rDNA, TEF-1 α , TUB i FG1093 amplifikovani su korišćenjem pet različitih parova prajmera prikazanih u Tabeli 3. PCR reakcije urađene su u radnoj zapremini od 25 μ l korišćenjem 12,5 μ l 2 X PCR Master mixa (K071, Fermentas, Lithuania), 9 μ l RNase-free water, po 1,25 μ l svakog prajmera (forward and reverse) (100 pmol/ μ l, Metabion International, Deutschland) i 1 μ l ekstrahovane ukupne DNA uzorka. U svim reakcijama negativnu kontrolu predstavljao je uzorak u koji su dodati svi navedeni reagensi, a umesto DNA uzoraka dodavana je molekularna RNase-free voda (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). PCR reakcija izvedena je u termosajkleru 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California) pri različitim uslovima u zavisnosti od korišćenih prajmera.

PCR korišćenjem parova prajmera ITS1F/ITS4. Univerzalni prajmeri ITS1F/ITS4 koriste se za umnožavanje ITS regiona rDNA (**White et al.**, 1990; **Gardes and Bruns**, 1993). Ovaj par prajmera amplifikuje deo sekvence 18S rRNA gena, kompletnu sekvencu ITS 1, 5.8S rRNA gena, i ITS 2, kao i deo sekvence 28S rRNA gena. PCR reakcija obavljena je u termosajkleru pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 10 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 30 s na 55°C i elongacije prajmera 1 min na 72°C, finalna elongacija 10 min na 72°C (**Walker et al.**, 2010). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine 600–800 bp.

PCR korišćenjem parova prajmera EF1-728F/EF1-1199R i EF1-983F/EF1-1567R. Parovi prajmera EF1-728F/EF1-1199R i EF1-983F/EF1-1567R (**Carbone and Kohn**, 1999; **Rehner and Buckley**, 2005; **Walker et al.**, 2010) omogućavaju amplifikaciju gena za TEF-1 α koji ima ulogu u složenom mehanizmu translacije proteina tokom rasta i izduživanja ćelija hifa gljiva. PCR reakcija obavljena je posebno za svaki od dva para prajmera, a nakon dobijanja sekvenci vršeno je njihovo spajanje u jedinstvenu sekvencu budući da ova dva para prajmera pokrivaju različite segmente ovog regiona. PCR reakcija obavljena je na isti način za oba para prajmera u termosajkleru pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 10 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije 30 s na 55°C, i elongacije prajmera 1 min na 72°C, finalna elongacija 10 min na 72°C (**Walker et al.**, 2010).

Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine 600–700 bp za EF1-728F/EF1-1199R par prajmera, odnosno 500 bp za EF1-983F/EF1-1567R.

PCR korišćenjem parova prajmera T1/T2. Par prajmera T1/T2 (O'Donnell and Cigelnik, 1997) omogućava amplifikaciju dela sekvence gena koji kodira za sintezu proteina β -tubulin bitnog u procesima ćelijske deobe i formiranja deobnog vretena. PCR reakcija obavljena je u termosajkleru pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 10 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije 30 s na 55°C, i elongacije prajmera 1 min na 72°C, finalna elongacija 10 min na 72°C (Walker et al., 2010). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 750 bp.

PCR korišćenjem parova prajmera E1F1/E3R1. Par prajmera E1F1/E3R1 (Walker et al., 2012) umnožava deo sekvence gena FG1093 koji nosi informaciju za sintezu ribozomalnog proteina L37 koji ulazi u sastav strukture ribozoma. PCR reakcija obavljena je u termosajkleru pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min na 95°C, zatim 10 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 60 s na 95°C, hibridizacije 30 s na 65-55°C (uz smanjivanje temperature za 1°C u svakom ciklusu), i elongacije prajmera 1 min na 72°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 60 s na 95°C, hibridizacije 30 s na 59°C, i elongacije prajmera 1 min na 72°C, finalna elongacija 10 min na 72°C (Walker et al., 2012). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 500 bp.

Tabela 2. Pregled prajmera korišćenih u okviru istraživanja

Ciljna sekvenca	Prajmeri	Sekvenca 5'-3'	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
ITS	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	600-800 bp	Gardes and Bruns (1993)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		White et al. (1990)
TEF-1 α	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	~1000 bp	Carbone and Kohn (1999)
	EF1-983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT		Rehner and Buckley (2005)
	EF1-1567R	ACHGTRCCRATACCACCRATCTT		Rehner and Buckley (2005)

	EF1-1199R	GGGAAGTACCMGTGATCATGT		Walker et al. (2010)
β-tubulin	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	~750 bp	O'Donnell and Cigelnik (1997)
	T2	TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG		
FG1093	E1F1	GCGCCACAMCAAGWCSCACRC	~500 bp	Walker et al. (2012)
	E3R1	TTCTBCGCTTGGCCTTCTCRS		

4.5.3. Vizuelizacija i analiza produkata

Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1 x TBE puferu, bojenjem Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics) i posmatranjem pod UV–transiluminatorom. Agarozni gel pripremljen je rastvaranjem 1,0 g agaroze u 100 ml 1 x TBE pufera i zagrevanjem do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici kako bi se gel potpuno rastvorio u puferu. Nakon rastvaranja agaroze i hlađenja do temperature od približno 50°C dodavano je 2,2 µl Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics) nakon čega je gel razliven u kalup za horizontalnu elektroforezu u koji su prethodno postavljeni separatori i češljevi. Gel je zatim inkubiran 30 min na sobnoj temperaturi da se ohladi i polimerizuje. Nakon polimerizacije gela uklonjeni su češljevi, a kalup je uronjen u kadicu za horizontalnu elektroforezu sa 1 x TBE puferom (90 mM Tris; 90 mM borna kiselina i 1 mM Na₂EDTA). Svaki produkt unet je u bunarčice u količini od 5 µl po odgovarajućem rasporedu. Za određivanje veličine umnoženog amplikona korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) sa veličinom DNA fragmenata od 100 do 3000 bp. Elektroforeza je izvedena pri konstantnoj struji od 100 V u trajanju od 30 min u aparatu za horizontalnu elektroforezu (MUPID ONE electrophoresis unit, Nippon Genetics, Europe). Amplifikovani produkti posmatrani su u mračnoj komori pomoću UV svetla na transiluminatoru (TFP-M/WL 312, Vilber Lourmat). Prisustvo DNA produkta očekivane dužine označeno je kao pozitivna reakcija.

4.5.4. Prečišćavanje PCR produkata i sekvenciranje

Prečišćavanje dobijenih produkata PCR reakcije vršeno je pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), prateći upustvo proizvođača. Jedna zapremina reakcione smeše i produkta nakon PCR reakcije pomešana je sa pet zapremina PBI pufera, a zatim prebačena u QIAquick kolonu u kolekcionalnoj tubici i centrifugirana 1 min na 13.000 rpm u cilju vezivanja DNA za filter. Nakon centrifugiranja odbačena je tečna faza, a na QIAquick kolonu pipetirano je 750 µl PE pufera u cilju ispiranja nečistoća, posle čega je tubica sa uzorkom centrifugirana 1 min na 13.000 rpm. Nakon centrifugiranja, tečna faza je odbačena, a QIAquick kolona vraćena u istu kolekcionalnu tubicu i centrifugirana 1 min na 13.000 rpm da bi se uklonili ostaci pufera. U cilju rastvaranja DNA u QIAquick kolonu prebačenu u novu tubicu zapremine 1,5 ml pipetirano je 50 µl EB pufera i centrifugirano 1 min na 13.000 rpm. Tako prečišćena DNA čuvana je na 4°C do kvantifikacije i pripreme za slanje na uslužno sekvenciranje. Nakon prečišćavanja uzorci su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu da bi se proverila čistoća amplikona, procenila molekularna težina i količina sintetisane DNA. Tako pripremljeni 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), korišćenjem istih parova prajmera sa kojima su i amplifikovani. Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., posle čega su određene konsenzus sekvence i podnete u GenBank bazu podataka u okviru National Center for Biotechnology Information (NCBI), gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession Number).

4.5.5. Molekularna identifikacija

Za molekularnu identifikaciju zasnovanu na sekvencama ITS regiona rDNA odabrano je ukupno 73 izolata koji pripadaju različitim morfološkim grupama M1 do M10 poreklom iz 24 zasada, sa 20 lokaliteta (odabran je najmanje po jedan izolat iz svake morfološke grupe iz svakog zasada). BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizom i višestrukim poređenjem homologije dobijenih sekvenci ITS regiona rDNA sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka pomoću CLUSTAL W programa

(Thompson et al., 1994), obavljena molekularna identifikacija koja je poslužila kao potvrda konvencionalne identifikacije odabranih izolata.

Molekularna identifikacija zasnovana na analizi sekvenci β -tubulin, TEF-1 α i FG1093 obuhvatila je ukupno 11 izolata iz morfološke grupe koja odgovara opisu *Gnomoniopsis* spp., poreklom iz 11 zasada sa 11 lokaliteta. BLAST analizom i višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci genskih regiona β -tubulin, TEF-1 α i FG1093 sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al., 1994), obavljena je dodatna molekularna identifikacija *Gnomoniopsis* spp. po ova tri molekularna markera.

4.5.6. Molekularna karakterizacija

Dalja molekularna karakterizacija obavljena je rekonstrukcijom odgovarajućih filogenetskih stabala što je pružilo uvid u taksonomsku poziciju i međusobni odnos odabranih izolata kako iz Srbije tako i sa drugim izolatima iste i srodnih vrsta dostupnih u GenBank bazi podataka, poreklom iz drugih delova sveta. Ukupno 5 filogenetskih stabala rekonstruisano je na osnovu sekvenci ITS regiona rDNA kao i jedno stablo zasnovano na katenuliranim sekvencama sva četiri genska regiona (multilokus) uključujući ITS region rDNA, β -tubulin, TEF-1 α i FG1093. Za proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen nukleotidne sličnosti, nakon skraćivanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 6.0. (Tamura et al., 2013). Sva filogenetska stabla rekonstruisana su korišćenjem Maximum Likelihood (ML) metode, integrisane unutar programa MEGA verzija 6.0. i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja (Tamura et al., 2013). Prikazane su bootstrap vrednosti >70%. Gamma Distributed Tamura-Nei model (G+I) određen Modeltest-om integrisanim u MEGA verzija 6.0. korišćen je kao najbolji model zamene nukleotida.

Sekvence 18 odabranih izolata iz morfološke grupe koja odgovara *Gnomoniopsis* spp., poreklom iz 11 zasada sa 11 lokaliteta korišćeno je za rekonstrukciju filogenetskog stabla zasnovanog na sekvencama ITS regiona rDNA. Ove sekvence analizirane su zajedno sa svim sekvencama *G. idaeicola* dostupnim u GenBank bazi podataka kao i sekvencama drugih srodnih vrsta roda *Gnomoniopsis* (Walker et al., 2010) (Tabela 3). Kao autgrupe za rutovanje stabla korišćene su sekvence vrsta *Apiognomonium veneta* i *Plagiostoma euphorbiae* (Tabela 3).

Sekvence 11 odabranih izolata iz morfološke grupe koja odgovara *Gnomoniopsis* spp., poreklom iz 11 zasada sa 11 lokaliteta korišćeno je za rekonstrukciju multilokus filogenetskog stabla zasnovanog na kombinovanim sekvencama ITS regiona rDNA, gena za β -tubulin, TEF-1 α i FG1093. Ove sekvence analizirane su zajedno sa svim sekvencama *G. idaeicola* dostupnim u GenBank bazi podataka, kao i sekvencama drugih srodnih vrsta roda *Gnomoniopsis* i dve sekvence vrsti roda *Sirococcus*. Kao autgrupe za rutovanje stabla korišćene su sekvence *Plagiostoma* sp. i *Ophiognomonia setacea* (Walker et al., 2012) (Tabela 3).

Izolati iz tri morfološke grupe su na osnovu morfoloških osobina i sekvenciranjem ITS regiona rDNA određeni kao pripadnici familije Botryosphaeriaceae. Tako je 5 izolata sa različitih lokaliteta iz morfološke grupe *Botryosphaeria*, 4 izolata sa različitih lokaliteta iz morfološke grupe *Diplodia*, i jedan izolat iz morfološke grupe *Neofusicoccum* odabrano za rekonstrukciju filogenetskog stabla. Zajedno sa ovim sekvencama analizirana je i 51 sekvenca drugih srodnih vrsta iz familije Botryosphaeriaceae (Slippers et al., 2007) (Tabela 4). Kao autgrupe za rutovanje stabla korišćene su sekvence vrsta *Guignardia bidwellii* i *Mycosphaerella africana* (Tabela 4).

Sekvence 5 izolata koji su morfološki i molekularno svrstani u morfološku grupu *Diaporthe* spp. korišćene su za rekonstrukciju filogenetskog stabla zasnovanog na sekvencama ITS regiona rDNA. Ove sekvence analizirane su zajedno sa 93 sekvence drugih srodnih vrsta iz roda *Diaporthe*. Kao autgrupa za rutovanje stabla korišćena je sekvenca vrste *Diaporthella corylina* (Dissanayake et al., 2017a) (Tabela 5).

Sekvence 5 izolata koji su morfološki i molekularno svrstani u morfološku grupu *Colletotrichum* sp. korišćene su za rekonstrukciju filogenetskog stabla zasnovanog na sekvencama ITS regiona rDNA. Ove sekvence analizirane su zajedno sa 53 sekvence drugih vrsta iz roda *Colletotrichum*. Kao autgrupa za rutovanje stabla korišćena je sekvenca vrste *Fusarium oxysporum* (Rueda-Hernandez et al., 2013; Hyde et al., 2014) (Tabela 6).

Tabela 3. Izolati korišćeni za filogenetske analize *Gnomoniopsis* spp.

Vrsta	Izolat	Domaćin	Poreklo	GenBank pristupni broj			
				ITS	β -tubulin	<i>tef-1a</i>	FG1093
<i>Apiognomonium veneta</i>	CBS 342.86	<i>Platanus acerifolia</i>	Francuska	DQ313531	/	/	/
<i>Gnomoniopsis alderdunense</i>	CBS 125679	<i>Rubus pedatus</i>	SAD: OR	GU320826	/	/	/
<i>Gnomoniopsis alderdunense</i>	CBS 125680	<i>Rubus parviflorus</i>	SAD: OR	GU320825	GU320787	GU320801	JF274653
<i>Gnomoniopsis alderdunense</i>	CBS 125681	<i>Rubus parviflorus</i>	SAD: OR	GU320827	/	/	/
<i>Gnomoniopsis chamaemori</i>	CBS 804.79	<i>Rubus chamaemorus</i>	Finska	GU320817	GU320777	GU320809	JF274646
<i>Gnomoniopsis clavulata</i>	AR 4313	<i>Quercus falcata</i>	SAD: MD	EU254818	EU219211	GU320807	JF274644
<i>Gnomoniopsis comari</i>	CBS 806.79	<i>Comarum palustre</i>	Finska	EU254821	EU219156	GU320810	JF274647
<i>Gnomoniopsis comari</i>	CBS 807.79	<i>Comarum palustre</i>	Finska	EU254822	/	/	/
<i>Gnomoniopsis comari</i>	CBS 809.79	<i>Comarum palustre</i>	Švajcarska	EU254823	/	/	/
<i>Gnomoniopsis fructicola</i>	AR 4275	<i>Fragaria vesca</i>	SAD: MD	EU254824	/	/	/
<i>Gnomoniopsis fructicola</i>	CBS 208.34	<i>Fragaria</i> sp.	Francuska	EU254826	EU219149	GU320808	JF274645
<i>Gnomoniopsis fructicola</i>	CBS 125671	<i>Fragaria</i> sp.	SAD: NJ	GU320816	/	/	/
<i>Gnomoniopsis guttulata</i>	BPI 877452A	<i>Agrimonia eupatoria</i>	Bugarska	EU254812	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KMS4-14	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537338	MG860499	MG755816	MG860489
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KVR2-14	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537339	MG860500	MG773585	MG860490
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KRU9-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537340	MG860501	MG773586	MG860491
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KNEI7-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537341	MG860502	MG773587	MG860492
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KZAI1-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537342	MG860503	MG773588	MG860493
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KMI5-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537337	MG860504	MG773589	MG860494
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KDK28-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537333	MG860505	MG773590	MG860495
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KPK10-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537334	MG860506	MG773591	MG860496
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KAR2-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537335	MG860507	MG773592	MG860497
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KKR7-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MF537336	MG860508	MG773593	MG860498
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KSV1-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MG878401	MG878402	MG878403	MG878404
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KMS2-14	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MG893859	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KMS6-14	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MG893860	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KMS12-14	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MG893861	/	/	/

<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KVR1-14	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MG893862	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KMI8-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MG893863	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KRU7-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MG893864	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	KZAI3-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MG893865	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	CBS 125672	<i>Rubus</i> sp.	SAD: CA	GU320823	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	CBS 125673	<i>Rubus pedatus</i>	SAD: OR	GU320824	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	CBS 125674	<i>Rubus</i> sp.	Francuska	GU320820	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	CBS 125675	<i>Rubus armeniacus</i>	SAD: OR	GU320822	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	CBS 125676	<i>Rubus armeniacus</i>	SAD: WA	GU320821	GU320784	GU320811	JF274654
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	V1EG6	pšenica	Francuska	KT692597	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	155e	<i>Myrtus communis</i>	Španija	KC959208	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	ICMP:11546	<i>Actinidia deliciosa</i>	Novi Zeland	KC145891	/	/	/
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	ICMP:10075	<i>Rubus fruticosus</i>	Novi Zeland	KC145872	/	/	/
<i>Gnomoniopsis macounii</i>	AR 3866	<i>Spiraea</i> sp.	SAD: NY	EU254762	EU219126	GU320804	JF274641
<i>Gnomoniopsis occulta</i>	CBS 125677	<i>Potentilla</i> sp.	SAD: OR	GU320828	/	/	/
<i>Gnomoniopsis occulta</i>	CBS 125678	<i>Potentilla</i> sp.	SAD: OR	GU320829	GU320786	GU320800	JF274650
<i>Gnomoniopsis occulta</i>	BPI 877455	<i>Potentilla anserina</i>	Rusija	EU254811	/	/	/
<i>Gnomoniopsis paraclavulata</i>	CBS 123202	<i>Quercus alba</i>	SAD: MD	GU320830	GU320775	GU320815	JF274642
<i>Gnomoniopsis racemula</i>	AR 3892	<i>E. angustifolium</i>	SAD: MN	EU254841	/	/	/
<i>Gnomoniopsis sanguisorbae</i>	CBS 858.79	<i>Sanguisorba minor</i>	Švajcarska	GU320818	GU320790	GU320805	JF274648
<i>Gnomoniopsis sanguisorbae</i>	CBS 125299	<i>Rubus parviflorus</i>	SAD: OR	GU320819	/	/	/
<i>Gnomoniopsis tormentillae</i>	CBS 904.79	<i>Potentilla erecta</i>	Švajcarska	EU254856	EU219165	GU320795	JF274649
<i>Ophiognomonium setacea</i>	CBS 128354	<i>Quercus</i> sp.	SAD: NJ	JF514847	JF514839	JF514823	JF274652
<i>Plagiostoma euphorbiae</i>	CBS 340.78	<i>Euphorbia palustris</i>	Holandija	EU199198	/	/	/
<i>Plagiostoma</i> sp.	CBS 128351	<i>Acer</i> sp.	SAD: NY	JF514852	JF514836	JF514833	JF274651
<i>Sirococcus conigenus</i>	CBS 113.75	<i>Picea pungens</i>	Nemačka	EF512482	EU219129	EF512544	JF274643
<i>Sirococcus piceicola</i>	CBS 119620	<i>Picea sitchensis</i>	Kanada	EF512480	/	/	/
<i>Sirococcus tsugae</i>	CBS 119627	<i>Cedrus deodara</i>	SAD: Oregon	EF512478	/	/	/
<i>Sirococcus tsugae</i>	CBS 128356	<i>Tsuga canadensis</i>	SAD: ME	JF514853	JF514844	JF514834	JF274655
<i>Gnomoniopsis</i> sp.	GiM	<i>Rubus fruticosus</i>	Iran	KJ563296	/	/	/

Tabela 4. Izolati korišćeni za filogenetske analize vrsta familije Botryosphaeriaceae

Vrsta	Izolat	Domaćin	Zemlja porekla	GenBank pristupni broj ITS
<i>Neofusicoccum ribis</i>	CMW 7772	<i>Ribes</i> sp.	SAD	AY236935
<i>Neofusicoccum ribis</i>	CMW 7054	<i>Ribes rubrum</i>	SAD	AF241177
<i>Neofusicoccum ribis</i>	KJ 93-42	<i>Malus</i> sp.	SAD	AF027741
<i>Neofusicoccum parvum</i>	KZAI3-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MH988433
<i>Neofusicoccum parvum</i>	ATCC 58189	<i>M. sylvestris</i>	Novi Zeland	AF243395
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMW 9078	<i>Actinidia deliciosa</i>	Novi Zeland	AY236940
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BOT 25	<i>Eucalyptus grandis</i>	Svaziland	AF283679
<i>Neofusicoccum parvum</i>	TO 67	<i>Vitis</i> sp.	Japan	AB034815
<i>Neofusicoccum parvum</i>	TO 74	<i>Pyrus communis</i>	Japan	AB034818
<i>Neofusicoccum parvum</i>	TO 76	<i>P. communis</i>	Japan	AB034819
<i>Neofusicoccum parvum</i>	TO 77	<i>A. deliciosa</i>	Japan	AB034820
<i>Neofusicoccum parvum</i>	TO 78	<i>Diospyrus kaki</i>	Japan	AB034821
<i>Neofusicoccum luteum</i>	CMW 992/3	<i>A. deliciosa</i>	Novi Zeland	AF027745
<i>Neofusicoccum luteum</i>	CMW 10309	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	AY339258
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW 9072	<i>Acacia</i> sp.	Australija	AY339260
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW 6837	<i>Acacia</i> sp.	Australija	AY339262
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW 586	<i>M. domestica</i>	Južna Afrika	DQ836719
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW 980	<i>P. communis</i>	Južna Afrika	DQ836717
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW 1133	<i>Prunus salicina</i>	Južna Afrika	DQ836716
<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW 1187	<i>Prunus dulcis</i>	Južna Afrika	DQ836718
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KDR12-13	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MH992666
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KMI3-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MH992668
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KRU15-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MH992669
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KDK29-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MH992665
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KKR1-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MH992667
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	TO 1	<i>Malus</i> sp.	Japan	AB034808
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	TO 12	<i>Prunus persica</i>	Japan	AB034809
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	TO 29	<i>P. communis</i>	Japan	AB034810
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	TO 41	<i>P. communis</i>	Japan	AB034813
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	TO 66	<i>Vitis</i> sp.	Japan	AB034814
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	TO 72	<i>P. persica</i>	Japan	AB034816
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	TO 73	<i>P. communis</i>	Japan	AB034817
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	TO 81	<i>Malus</i> sp.	SAD	AB034823
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	TO 82	<i>Malus</i> sp.	SAD	AB034811
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KJ94-23	<i>M. sylvestris</i>	SAD	AF027747
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KJ94-26	<i>Prunus persica</i>	Japan	AF027749
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KJ94-27	<i>P. persica</i>	SAD	AF027761
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	ZS 97-5	<i>Malus</i> sp.	SAD	AF241173
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW 8000	<i>Prunus</i> sp.	Švajcarska	AY236949
<i>Diplodia corticola</i>	KJ 93-09	<i>Cercis canadensis</i>	SAD	AF027752
<i>Diplodia corticola</i>	KJ 93-35	<i>Quercus suber</i>	Španija	AF027754
<i>Diplodia corticola</i>	KJ 93-29	<i>Quercus</i> sp.	SAD	AF027753
<i>Diplodia mutila</i>	ZS 94-6	<i>M. pumila</i>	Novi Zeland	AF243407
<i>Diplodia mutila</i>	CMW 7060	<i>Fraxinus excelsior</i>	Holandija	AY236955

<i>Diplodia mutila</i>	ATCC 60259	<i>M. pumila</i>	Nepoznato	AF243406
<i>Diplodia seriata</i>	KMI4-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK012552
<i>Diplodia seriata</i>	KDO7-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK012551
<i>Diplodia seriata</i>	KNEIII1-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK012553
<i>Diplodia seriata</i>	KBOII1-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK012550
<i>Diplodia seriata</i>	TO 79	<i>Malus</i> sp.	SAD	AB034822
<i>Diplodia seriata</i>	TO 80	<i>Malus</i> sp.	SAD	AB034812
<i>Diplodia seriata</i>	CMW 568	<i>Malus</i> sp.	Južna Afrika	DQ836726
<i>Diplodia seriata</i>	CMW 918	<i>P. communis</i>	Južna Afrika	DQ836721
<i>Diplodia seriata</i>	CMW 986	<i>P. communis</i>	Južna Afrika	DQ836722
<i>Diplodia seriata</i>	CMW 1050	<i>P. communis</i>	Južna Afrika	DQ836723
<i>Diplodia seriata</i>	CMW 1069	<i>P. persica</i>	Južna Afrika	DQ836724
<i>Diplodia seriata</i>	CMW 1159	<i>P. salicina</i>	Južna Afrika	DQ836720
<i>Diplodia seriata</i>	CMW 1179	<i>Populus</i> sp.	Južna Afrika	DQ836725
<i>Diplodia seriata</i>	CMW 7774	<i>Ribes</i> sp.	SAD	AY236953
<i>Diplodia seriata</i>	ATCC 60851	<i>P. persica</i>	SAD	AF243408
<i>Diplodia seriata</i>	KJ93-56	drvenasto šiblje	SAD	AF027759
<i>Guignardia bidwellii</i>	97-105	<i>Vitis</i> sp.	SAD	AF216533
<i>Mycosphaerella africana</i>	CMW 4945	<i>E. viminalis</i>	Južna Afrika	AF 283690

Tabela 5. Izolati korišćeni za filogenetske analize vrsta roda *Diaporthe*

Vrsta	Izolat	Domaćin	Zemlja porekla	GenBank pristupni broj
				ITS
<i>Diaporthe acaciigena</i>	CBS 129521	<i>Acacia retinodes</i>	Australija	KC343005
<i>Diaporthe alleghaniensis</i>	CBS 495.72	<i>Betula alleghaniensis</i>	Kanada	KC343007
<i>Diaporthe alnea</i>	CBS 146.46	<i>Alnus</i> sp.	nepoznato	KC343008
<i>Diaporthe alnea</i>	CBS 159.47	<i>Alnus</i> sp.	nepoznato	KC343009
<i>Diaporthe ampelina</i>	CBS 114016	<i>Vitis vinifera</i>	Južna Afrika	AF230751
<i>Diaporthe ampelina</i>	CBS 267.80	<i>Vitis vinifera</i>	Italija	KC343018
<i>Diaporthe amygdali</i>	CBS 126679	<i>Prunus dulcis</i>	Portugalija	KC343022
<i>Diaporthe amygdali</i>	CBS 111811	<i>Vitis vinifera</i>	Južna Afrika	KC343019
<i>Diaporthe arctii</i>	DP0482	<i>Arctium lappa</i>	Austrija	KJ590736
<i>Diaporthe asheicola</i>	CBS 136967	<i>Vaccinium ashei</i>	Evropa	KJ160562
<i>Diaporthe asheicola</i>	CBS 136968	<i>Vaccinium ashei</i>	Evropa	KJ160563
<i>Diaporthe australafricana</i>	CBS 111886	<i>Vitis vinifera</i>	Australija	KC343038
<i>Diaporthe australafricana</i>	CBS 113487	<i>Vitis vinifera</i>	Južna Afrika	KC343039
<i>Diaporthe baccae</i>	CBS 136972	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Evropa	KJ160565
<i>Diaporthe baccae</i>	CPC 20585	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Evropa	KJ160564

<i>Diaporthe betulae</i>	KMS7-14	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK012548
<i>Diaporthe betulae</i>	KNEIII3-15	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK012549
<i>Diaporthe betulae</i>	CFCC 50469	<i>Betula platyphylla</i>	Kina	KT732950
<i>Diaporthe betulae</i>	CFCC 50470	<i>Betula platyphylla</i>	Kina	KT732951
<i>Diaporthe bicincta</i>	CBS 121004	<i>Juglans</i> sp.	SAD	KC343134
<i>Diaporthe biguttusis</i>	CGMCC 3.17081	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KF576282
<i>Diaporthe biguttusis</i>	CGMCC 3.17082	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KF576283
<i>Diaporthe canthii</i>	CBS 132533	<i>Canthium inerme</i>	Južna Afrika	JX069864
<i>Diaporthe cassines</i>	CPC 21916	<i>Cassine peragua</i>	Južna Afrika	KF777155
<i>Diaporthe celastrina</i>	CBS 139.27	<i>Celastrus scandens</i>	nepoznato	KC343047
<i>Diaporthe chamaeropsis</i>	CBS 454.81	<i>Chamaerops humilis</i>	Grčka	KC343048
<i>Diaporthe chamaeropsis</i>	CBS 753.70	<i>Spartium junceum</i>	Hrvatska	KC343049
<i>Diaporthe cucurbitae</i>	DAOM42078	<i>Cucumis sativus</i>	Kanada	KM453210
<i>Diaporthe cucurbitae</i>	CBS 136.25	<i>Arctium</i> sp.	nepoznato	KC343031
<i>Diaporthe cynaroidis</i>	CBS 122676	<i>Protea cynaroides</i>	Južna Afrika	KC343058
<i>Diaporthe cytospora</i>	FAU461	<i>Citrus limon</i>	Španija	KC843307
<i>Diaporthe cytospora</i>	AR5149	<i>Citrus sinensis</i>	SAD	KC843309
<i>Diaporthe diospyricola</i>	CPC 21169	<i>Diospyros whyteana</i>	Južna Afrika	KF777156
<i>Diaporthe ellipticola</i>	CGMCC 3.17084	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KF576270
<i>Diaporthe ellipticola</i>	CGMCC 3.17085	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KF576271
<i>Diaporthe eres</i>	KDR3-13	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK012545
<i>Diaporthe eres</i>	KDR21-13	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK012546
<i>Diaporthe eres</i>	KDR22-13	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK012547
<i>Diaporthe eres</i>	AR519	<i>Ulmus</i> sp.	Nemačka	KJ210529
<i>Diaporthe eres</i>	CBS 138598	<i>Ulmus</i> sp.	SAD	KJ210521
<i>Diaporthe eres</i>	CBS 439.82	<i>Cotoneaster</i> sp.	Velika Britanija	FJ889450
<i>Diaporthe eres</i>	DLR12A	<i>Vitis vinifera</i>	Francuska	KJ210518
<i>Diaporthe foeniculina</i>	CBS 111553	<i>Foeniculum vulgare</i>	Španija	KC343101
<i>Diaporthe foeniculina</i>	FAU460	<i>Citrus limon</i>	Španija	KC843304
<i>Diaporthe foeniculina</i>	ICMP 12285	<i>Juglans regia</i>	Novi Zeland	KC145853
<i>Diaporthe foeniculina</i>	AR5151	<i>Citrus latifolia</i>	SAD	KC843303
<i>Diaporthe foeniculina</i>	CBS 187.27	<i>Camellia sinesis</i>	SAD	DQ286287
<i>Diaporthe foeniculina</i>	CBS 123208	<i>Foeniculum vulgare</i>	Portugalija	EU814480
<i>Diaporthe fusicola</i>	CGMCC 3.17087	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KF576281

<i>Diaporthe fusicola</i>	CGMCC 3.17088	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KF576263
<i>Diaporthe garethjonesii</i>	MFLUCC 12-0542a	mrtvo lišće	Tajland	KT459423
<i>Diaporthe gulyae</i>	BRIP 54025	<i>Helianthus annuus</i>	Australija	JF431299
<i>Diaporthe gulyae</i>	BRIP 53158	<i>Helianthus annuus</i>	Australija	JF431284
<i>Diaporthe heliciis</i>	AR5211	<i>Hedera helix</i>	Nemačka	KJ210538
<i>Diaporthe hickoriae</i>	CBS 145.26	<i>Carya glabra</i>	SAD	KC343118
<i>Diaporthe longicicola</i>	CGMCC 3.17089	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KF576267
<i>Diaporthe longicicola</i>	CGMCC 3.17090	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KF576268
<i>Diaporthe mahothocarpus</i>	CGMCC 3.15181	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KC153096
<i>Diaporthe mahothocarpus</i>	CGMCC 3.15182	<i>Lithocarpus glabra</i>	Kina	KC153097
<i>Diaporthe neilliae</i>	CBS 144. 27	<i>Spiraea</i> sp.	nepoznato	KC343144
<i>Diaporthe neoarctii</i>	CBS 109490	<i>Ambrosia trifida</i>	SAD	KC343145
<i>Diaporthe nothofagi</i>	BRIP 54801	<i>Nothofagus cunninghamii</i>	Australija	JX862530
<i>Diaporthe novem</i>	CBS 127270	<i>Glycine max</i>	Hrvatska	KC343155
<i>Diaporthe novem</i>	CBS 127271	<i>Glycine max</i>	Hrvatska	KC343157
<i>Diaporthe ovoicicola</i>	CGMCC 3.17093	<i>Citrus</i> sp.	Kina	KF576265
<i>Diaporthe ovoicicola</i>	CGMCC 3.17092	<i>Citrus</i> sp.	Kina	KF576264
<i>Diaporthe penetriteum</i>	CGMCC 3.17532	<i>Camellia sinensis</i>	Kina	KP267879
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	AR4203	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SAD	KJ590738
<i>Diaporthe phragmitis</i>	CBS 138897	<i>Phragmites australis</i>	Kina	KP004445
<i>Diaporthe pulla</i>	CBS 338.89	<i>Hedera helix</i>	Hrvatska	KC343152
<i>Diaporthe ravennica</i>	MFLUCC 15–0479	<i>Tamarix</i> sp.	Italija	KU900335
<i>Diaporthe ravennica</i>	MFLUCC 15–0480	<i>Tamarix</i> sp.	Italija	KU900336
<i>Diaporthe rudis</i>	AR3422	<i>Laburnum anagyroides</i>	Austrija	KC843331
<i>Diaporthe rudis</i>	AR3654	<i>Rosa canina</i>	Austrija	KC843338
<i>Diaporthe rudis</i>	ICMP 16419	<i>Castanea sativa</i>	Novi Zeland	KC145904
<i>Diaporthe rudis</i>	DA244	<i>Brugmansia</i> sp.	Nemačka	KC843334
<i>Diaporthe rudis</i>	CBS 113201	<i>Vitis vinifera</i>	Portugalija	AY485750
<i>Diaporthe saccharata</i>	CBS 116311	<i>Protea repens</i>	Južna Afrika	KC343190
<i>Diaporthe salicicola</i>	BRIP 54825	<i>Salix purpurea</i>	Australija	JX862531
<i>Diaporthe sojae</i>	FAU635	<i>Glycine max</i>	SAD	KJ590719
<i>Diaporthe sojae</i>	CBS 116019	<i>Caperonia palustris</i>	SAD	KC343175
<i>Diaporthe sojae</i>	FAU455	<i>Stokesia laevis</i>	SAD	KJ590712
<i>Diaporthe sojae</i>	DP0601	<i>Glycine max</i>	SAD	KJ590706
<i>Diaporthe sojae</i>	MAFF 410444	<i>Cucumis melo</i>	Japan	KJ590714

<i>Diaporthe sojae</i>	BRIP 54033	<i>Helianthus annuus</i>	Australija	JF431295
<i>Diaporthe spartinicola</i>	CBS 140003	<i>Spartium junceum</i>	Španija	KR611879
<i>Diaporthe sterilis</i>	CBS 136969	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Evropa	KJ160579
<i>Diaporthe sterilis</i>	CPC 20580	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Evropa	KJ160582
<i>Diaporthe subclavata</i>	ZJUD95	<i>Citrus</i> sp.	Kina	KJ490630
<i>Diaporthe subclavata</i>	CGMCC 3.17253	<i>Citrus grandis</i>	Kina	KJ490618
<i>Diaporthe ternstroemia</i>	CGMCC 3.15183	<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	Kina	KC153098
<i>Diaporthe ternstroemia</i>	CGMCC 3.15184	<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	Kina	KC153099
<i>Diaporthe toxica</i>	CBS 534.93	<i>Lupinus angustifolius</i>	Australija	KC343220
<i>Diaporthe toxica</i>	CBS 546.93	<i>Lupinus</i> sp.	Australija	KC343222
<i>Diaporthe vaccinii</i>	CBS 160.32	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	SAD	AF317578
<i>Diaporthe vaccinii</i>	CBS 122116	<i>Vaccinium corymbosum</i>	SAD	KC343227
<i>Diaporthe vaccinii</i>	CBS 135436	<i>Vaccinium corymbosum</i>	SAD	AF317570
<i>Diaporthe virgiliae</i>	CMW40748	<i>Virgilia oroboides</i>	Južna Afrika	KP247566
<i>Diaporthella corylina</i>	CBS 121124	<i>Corylus</i> sp.	Kina	KC343004

Tabela 6. Izolati korišćeni za filogenetske analize vrsta roda *Colletotrichum*

Vrsta	Izolat	Domaćin	Zemlja porekla	GenBank pristupni broj ITS
<i>Colletotrichum asianum</i>	BMLI3	<i>Coffea arabica</i>	Tajland	FJ972605
<i>Colletotrichum asianum</i>	BPDI4	<i>Coffea arabica</i>	Tajland	FJ972612
<i>Colletotrichum acutatum</i>	IMI 345581	jagoda	Novi Zeland	AJ536212
<i>Colletotrichum acutatum</i>	PT250	<i>Olea europaea</i>	Portugalija	AJ749700
<i>Colletotrichum acutatum</i>	ICMP:1783	<i>Carica papaya</i>	Australija	FJ788417
<i>Colletotrichum acutatum</i>	30	lupine	Portugalija	AJ300561
<i>Colletotrichum acutatum</i>	CA546	lupine	Portugalija	AJ749674
<i>Colletotrichum acutatum</i>	IMI 117619	<i>Carica papaya</i>	Australija	AF411701
<i>Colletotrichum boninense</i>	ICMP:17904	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japan	JX010292
<i>Colletotrichum boninense</i>	MAFF 305972	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japan	AB051400
<i>Colletotrichum boninense</i>	CBS 123755	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japan	JQ005153
<i>Colletotrichum clavatum</i>	CBS193.32	<i>Olea europaea</i>	Italija	AJ749688

<i>Colletotrichum clavatum</i>	PT169	<i>Olea europaea</i>	Portugalija	AJ749685
<i>Colletotrichum clavatum</i>	5	lupine	Francuska	AJ300557
<i>Colletotrichum curcumae</i>	IMI 288937	<i>Curcuma longa</i>	Indija	GU227893
<i>Colletotrichum dematium</i>	CBS 125.25	<i>Eryngium campestre</i>	Francuska	GU227819
<i>Colletotrichum fructicola</i>	BPDI16	<i>Coffea arabica</i>	Tajland	FJ972603
<i>Colletotrichum fructicola</i>	BPDI18	<i>Coffea arabica</i>	Tajland	FJ972602
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	EHS58	<i>Fiorinia externa</i>	SAD	EF464594
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	STE-U 5287	jabuka	SAD	AY376509
<i>Colletotrichum fuscum</i>	CBS 130.57	<i>Digitalis lanata</i>	nepoznato	JQ005762
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CBS 95397	<i>Citrus sinensis</i>	Italija	FJ972609
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	IMI 356878	<i>Citrus sinensis</i>	Italija	EU371022
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CBS 112999	<i>Citrus sinensis</i>	Italija	JQ005152
<i>Colletotrichum guajavae</i>	IMI 350839	<i>Psidium guajava</i>	Indija	JQ948270
<i>Colletotrichum graminicola</i>	M1.001			JQ005767
<i>Colletotrichum horii</i>	C1180.1	<i>Diospyros kaki</i>	Japan	GQ329690
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	IMI 349063	<i>Brassica campestris</i>	Trinidad i Tobago	JQ005760
<i>Colletotrichum kahawae</i>	KDR1-13	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK002874
<i>Colletotrichum kahawae</i>	KDR8-13	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK002875
<i>Colletotrichum kahawae</i>	KDR17-13	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK002876
<i>Colletotrichum kahawae</i>	KCA5-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK002873
<i>Colletotrichum kahawae</i>	KKR14-16	<i>Rubus fruticosus</i>	Srbija	MK002877
<i>Colletotrichum kahawae</i>	IMI 319418	<i>Coffea arabica</i>	Kenija	FJ972608
<i>Colletotrichum kahawae</i>	IMI 363578	<i>Coffea arabica</i>	Kenija	FJ972607
<i>Colletotrichum kahawae</i>	ICMP 17816	<i>Coffea robusta</i>	Kenija	NR_144787
<i>Colletotrichum kahawae</i>	PL12-1A	ram slike iz 19 veka	Kostarika	MF422167
<i>Colletotrichum kahawae</i>	C1275.1	<i>Coffea arabica</i>	Angola	JX010234
<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>kahawae</i>	C1275.14	<i>Coffea</i> sp.	Kenija	JX010235
<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>cigarro</i>	ICMP:18728	<i>Miconia</i> sp.	Brazil	JX010239
<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>cigarro</i>	ICMP:18741	<i>Vaccinium</i> sp.	Novi Zeland	JX010229
<i>Colletotrichum liriopes</i>	CBS 119444	<i>Liriope muscari</i>	Meksiko	GU227804
<i>Colletotrichum lineola</i>	CBS 125337	Apiaceae	Češka Republika	GU227829
<i>Colletotrichum navitas</i>	CBS 125086	<i>Panicum virgatum</i>	SAD	JQ005769
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	CBS 570.97	<i>Cucumis sativus</i>	Velika Britanija	KF178466
<i>Colletotrichum siamense</i>	BMLI6	<i>Coffea arabica</i>	Tajland	FJ972604
<i>Colletotrichum siamense</i>	BMLI15	<i>Coffea arabica</i>	Tajland	FJ972614
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	CBS 29467	<i>Carica papaya</i>	Australija	FJ972610
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	BRIP28519	<i>Carica papaya</i>	Australija	FJ972601
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	PT135	<i>Olea europaea</i>	Portugalija	AJ749683
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	STE-U 4452	<i>Protea magnifica</i>	Južna Afrika	AY376503

<i>Colletotrichum simmondsii</i>	BRIP:28519	<i>Carica papaya</i>	Australija	GU183331
<i>Colletotrichum sidae</i>	CBS 504.97	<i>Sida spinosa</i>	SAD	KF178472
<i>Colletotrichum tofieldiae</i>	CBS 495.85	<i>Tofieldia calyculata</i>	Švajcarska	GU227801
<i>Colletotrichum tropicale</i>	CBS 124949	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	JX010264
<i>Colletotrichum truncatum</i>	CBS 151.35	<i>Phaseolus lunatus</i>	SAD	GU227862
<i>Colletotrichum torulosum</i>	CBS 128544	<i>Solanum melongena</i>	Novi Zeland	JQ005164
<i>Fusarium oxysporum</i>	CASMB-SEF20	morske alge	Indija	JQ946649
<i>Glomerella acutata</i>	TOM-9	tamarilo	Kolumbija	AF521205

4.6. Ispitivanje virulentnosti izolata *Gnomoniopsis idaeicola*

Ukupno 10 izolata iz 10 lokaliteta svrstanih u morfološku grupu M2 identifikovanih kao *Gnomoniopsis idaeicola*, poreklom sa sorti Čačanska bestrna i Thornfree odabrano je za ispitivanje virulentnosti u uslovima veštačkih inokulacija reznica stabla vegetativnih izdanaka kupine sorte Čačanska bestrna. Ispitivanje virulentnosti odabranih izolata izvedeno je u cilju utvrđivanja razlika između izolata različitog geografskog porekla. Postupak je metodološki izveden na isti način kao i provera patogenosti, a ocena virulentnosti izvršena je na osnovu intenziteta simptoma. U tu svrhu kreirana je sledeća skala: 0 = nema vidljivih simptoma, 1 = nekroza na mestu inokulacije (zaseku), 2 = nekroza zahvata do 2 cm oko mesta inokulacije, 3 = nekroza zahvata do 4 cm oko mesta inokulacije, 4 = nekroza zahvata do 6 cm oko mesta inokulacije i 5 = nekroza zahvata više od 6 cm oko mesta inokulacije. Dobijeni podaci analizirani su primenom Kruskal-Wallis testa, na nivou značajnosti od 5%, a Dunn's testom je ispitana značajnost razlika između sredina. Statistička analiza urađena je primenom XLSTAT softvera.

5.0 REZULTATI

5.1. Simptomi bolesti u polju

U periodu od 2013. do 2016. godine izvršen je obilazak terena i sakupljanje uzoraka obolelih biljaka u ukupno 24 zasada kupine raspoređenih na 20 lokaliteta (Tabela 7). Tom prilikom uočeni su raznovrsni simptomi u vidu pegavosti, nekroze, pucanja i izbeljivanja kore stabla kupine. Pege su bile različitog oblika i veličine, najčešće nekrotične, braonkaste, braon-crvene, crvene ili tamnozeleno boje sa marginom crvene do purpurne boje, ali i bez nje. Pojedine pege imale su zoniran izgled. U slučaju jačih zaraza dolazilo je do prstenastog obuhvatanja stabla i sušenja čitavih izdanaka. Simptomi su se najčešće javljali na rodnim izdancima, a postajali su uočljivi nakon prezimljavanja, dok su bili ređi na vegetativnim izdancima. Opisani simptomi bili su uglavnom nespecifični pa ih najčešće nije bilo moguće direktno povezati sa prouzročivačima oboljenja.

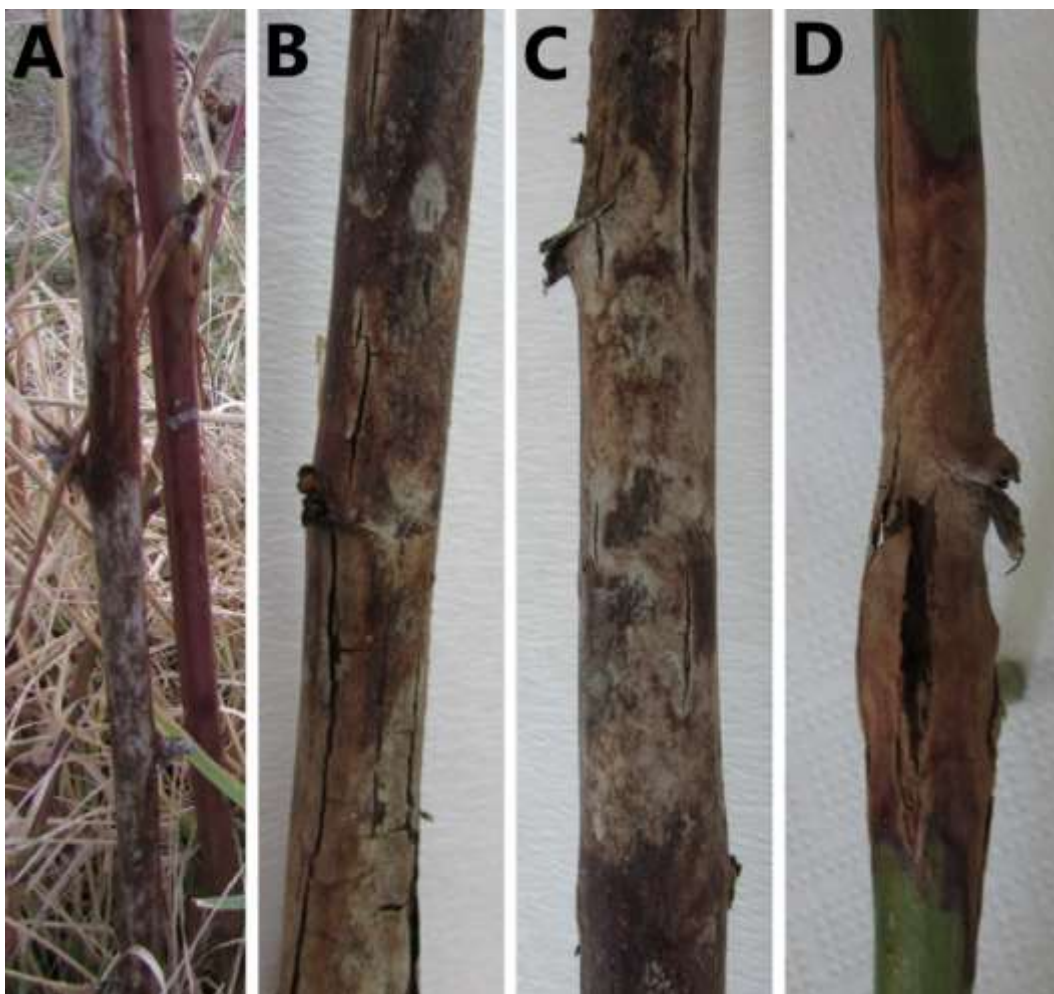
Kako je ustanovljeno prisustvo većeg broja prouzročivača bolesti, a svaki od njih je bio zastupljen sa većim brojem izolata, formirane su morfološke grupe izolata, a rezultati prikazani u skladu sa tim. Svi dobijeni izolati su prema morfološkim osobinama svrstani u 10 morfoloških grupa čija je identifikacija potvrđena sekvenciranjem ITS regiona rDNA. Rezultati su prikazani prema frekvenciji izolacije i rasprostranjenosti morfoloških grupa (vrsta), odnosno broju zasada i lokaliteta u kojima je potvrđeno njihovo prisustvo (Tabela 8).

Tabela 7. Pregled podataka o uzorkovanju i incidenci bolesti u zasadima obuhvaćenim ispitivanjima

God.	Okrug	Lokalitet	Sorta	Broj sakupljenih uzoraka	Incidencija bolesti stabla (%)
2013	Jablanički	Leskovac	Čačanska bestrna	15	55
	Mačvanski	Dragojevac	Čačanska bestrna	28	40
2014	Podunavski	Vrbovac	Čačanska bestrna	10	15
	Mačvanski	Mišar	Thornfree	23	35
2015	Mačvanski	Miokus	Chester Thornless	5	70
			Čačanska bestrna	8	80
	Mačvanski	Dobrić	Čačanska bestrna	18	40
	Sremski	Ruma	Čačanska bestrna	25	25
	Borsku	Negotin	Čačanska bestrna	26	45
	Zaječarski	Zaječar	Čačanska bestrna	26	60

2016	Zaječarski	Boljevac	Čačanska bestrna	17	20
	Zaječarski	Knjaževac	Čačanska bestrna	5	5
	Rasinski	Medveđa	Čačanska bestrna	23	30
	Kolubarski	Donja Kamenica	Thornfree	17	25
			Triple Crown	5	5
			Loch Ness	23	40
	Moravički	Ivanjica	Čačanska bestrna	12	30
			Loch Ness	9	25
	Zlatiborski	Arilje	Čačanska bestrna	5	10
	Moravički	Čačak	Loch Ness	29	20
	Šumadijski	Kragujevac	Čačanska bestrna	25	70
	Toplički	Prokuplje	Čačanska bestrna	26	50
	Rasinski	Brus	Čačanska bestrna	17	40
	Pomoravski	Svilajnac	Loch Ness	30	70
Ukupno				427	Prosek 37,7

➤ *Paraconiothyrium fuckelii*. U 12 od 24 pregledana zasada kupine utvrđeno je prisustvo *P. fuckelii* i to najčešće u mešanim zarazama sa drugim patogenima koji su izolovani iz drugih uzoraka poreklom iz istog zasada (*Gnomoniopsis idaeicola*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe betulae*, *Septoria* spp.). U pojedinačnim zarazama utvrđena je jedino na lokalitetu Leskovac. Incidenca bolesti u zasadima u kojima je detektovana *P. fuckelii* bila je od 10% do 70% (prosečno 42,08%), dok je na lokalitetu Leskovac u kojem je ovo jedini detektovan patogen incidenca bolesti procenjena na 55%. *P. fuckelii* bila je široko rasprostranjena u zasadima sorte Čačanska bestrna (u 9 od 16 pregledanih zasada sa incidencom bolesti od 10% do 70%). Prisustvo ovog patogena utvrđeno je i u dva zasada sorte Thornfree (lokaliteti Mišar i Donja Kamenica, incidenca bolesti 35% odnosno 25%), kao i u jednom zasadu sorte Chester Thornless (lokalitet Miokus, incidenca bolesti 70%). U zasadima sorti Loch Ness (4 zasada obuhvaćeno pregledom) i Triple Crown (jedan zasad obuhvaćen pregledom) nije detektovano prisustvo *P. fuckelii*. Uočeni simptomi teško se mogu razlikovati od onih koje uzrokuje *G. idaeicola*. Simptomi su se javljali najčešće na rodnim izdancima, u vidu manjih ili većih pega uglavnom eliptičnog oblika, u početku nekrotične braonkaste, braonkasto-crvene ili pak mrkocrvene boje sa manje ili više izraženom ljubičastom ivicom. Sa razvojem bolesti pege se uvećavaju, a nekrotične površine zahvatale su često i više internodija i nodusa, pa i čitavo stablo (Slika 2A).



Slika 2. *Paraconiothyrium fuckelii*: A – nekroza i izbeljivanja kore u polju; B-C – nekroza, izbeljivanje i pucanje kore; D – pucanje kore i dezorganizacija srži

Na zaraženim stablima kora vremenom dobija sivkast izgled, a starenjem dolazi i do uzdužnog pucanja kore (Slika 2B). U povoljnim uslovima može doći i do prstenastog obuhvatanja stabla, dezorganizacije srži i slabljenja mehaničke čvrstine stabla (Slika 2C). U okviru zaražene kore formiraju se brojni piknidi. Štetnost se ogleda u tome što patogen remeti normalan tok hranjivih materija pogotovo ako prstenasto obuhvati stablo kada nastaje izumiranje tkiva iznad tog mesta. U zavisnosti od intenziteta bolesti i stepena zahvaćenosti stabla zaraženi izdanci daju slabiji prinos, a plodovi su sitniji i lošijeg kvaliteta, ili čak može da izostane njihovo formiranje. Ukoliko dođe do prstenastog obuhvatanja stabla već formirani plodovi prekidaju sa razvićem i sazrevanjem i suše se zajedno sa ostatkom biljke.

➤ ***Gnomoniopsis idaeicola***. Prisustvo ovog patogena utvrđeno je u ukupno 11 od 24 pregledana zasada kupine kako u pojedinačnoj zarazi (Vrbovac, Miokus i Svilajnac), tako i u mešanim zarazama sa drugim patogenima (*Paraconiothyrium fuckelii*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe betulae*, *Septoria* spp.). Incidenca bolesti stabla na lokalitetima na kojima je utvrđeno prisustvo *G. idaeicola* kretala se od 10% do 80% (prosečno 44,09%), dok je na lokalitetima Svilajnac i Miokus gde je ovaj patogen jedini detektovan incidenca bolesti bila veoma visoka 70% odnosno 80% sa izraženom pojavom nekroze lišća i uvenuća biljaka (Slika 3A). U zasadima sorte Čačanska bestrna *G. idaeicola* bila je široko rasprostranjena i to u 8 od 16 pregledanih zasada, sa incidencom bolesti do 80%. Prisustvo ovog patogena takođe je utvrđeno i u zasadima sorte Loch Ness (lokalitet Svilajnac, incidenca bolesti 70%) i Thornfree (lokaliteti Mišar i Donja Kamenica, incidenca bolesti 35% odnosno 25%). Biljke u zasadima sorti Chester Thornless i Triple Crown (po jedan zasad obuhvaćen pregledom) nisu bile zaražene vrstom *G. idaeicola*. U svim zasadima sa zarazom, prvi vidljivi simptomi na stablu kupine bili su u vidu upadljivih, manjih ili većih, uglavnom eliptičnih nekrotičnih pega. Pege su najčešće uočavane na internodijama i nodusima, braonkasto-crvene, tamnocrvene ili tamnosive boje sa izraženom ljubičastom ivicom. Pege se vremenom uvećavaju i spajaju, formiraju se veće nekrotične površine i rak rane, često prstenasto obuhvatajući stablo. Unutar nekrotičnih pega i zona kora dobija svetliju, sivkastu do srebrnkastu boju (Slika 3B-C). U slučaju jake nekroze i pojave rak rana često je dolazilo do uzdužnog pucanja kore tako da je uočljiva nekrotirana manje ili više dezorganizovana srž stabla. U okviru tkiva zahvaćenog nekrozom dolazi do formiranja sitnih, crnih, subepidermalnih tvorevina, piknida koji se u početku vide kao sitni plikovi na kori. Kasnije ostiole piknida izdizanjem probijaju epidermis i iz njih se u povoljnim uslovima vlage i temperature oslobađa crvolika, želatinozna masa žućkaste boje u kojoj se nalaze brojne konidije. Formiranje piknida i oslobađanje konidija dešavalo se masovno na rodnim izdancima, u drugoj godini razvića. Narednog proleća kod jako zaraženih izdanaka javlja se slabije bočno grananje, a listovi dobijaju žućkastu boju, nekrotiraju i na kraju se javlja uvenuće i izumiranje biljaka (Slika 3A). Na takvim izdancima formirali su se plodovi koji su sitniji, lošijeg kvaliteta, a čak može i da izostane formiranje plodova. Usled uvenuća biljaka plodovi koji su se već formirali prekidaju sa razvićem i sazrevanjem (plodovi se suše zajedno sa lišćem i stablom). Ovo dovodi do

veoma ozbiljnih gubitaka u prinosu. Na lokalitetu Svilajnac gde je *G. idaeicola* jedini izolovani patogen 2016. godine zabeleženo je potpuno izumiranje oko 40% biljaka, a gubitak u prinosu procenjen je na oko 50%.



Slika 3. *Gnomoniopsis idaeicola*: Simptomi u polju. A – nekroza lista i uvenuće biljaka; B-C – nekroza, izbeljivanje kore i prstenasto obuhvatanje stabla

➤ ***Septoria* spp.** Iz uzoraka sakupljenih u 10 od 24 zasada dobijeni su izolati sa morfološkim osobinama koje odgovaraju vrstama roda *Septoria* i koji se na osnovu sekvence ITS regiona rDNA nisu mogli identifikovati do nivoa vrste čak i posle izvršene filogenetske analize. Izolati *Septoria* spp. javili su se kako u pojedinačnoj zarazi (lokaliteti Knjaževac, Ivanjica i Donja Kamenica - zasad sorte Loch Ness) tako i u mešanim zarazama sa drugim patogenima nađenim u drugim uzorcima poreklom iz istog zasada (*Gnomoniopsis idaeicola*, *Paraconiothyrium fuckelii*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe betulae*, *Diplodia seriata* i *Botrytis cinerea*). Incidenca bolesti stabla u zasadima u kojima je utvrđeno prisustvo *Septoria* spp. kretala se od 5% do 50% (prosečno 30,5%). U zasadima sorte Čaćanska bestrna izolati *Septoria* spp. bili su rasprostranjeni u 7 od 16 pregledanih zasada, sa incidencom bolesti do 50%. Prisustvo ovog patogena utvrđeno je takođe i u zasadima sorte Loch Ness (lokaliteti Donja Kamenica, Ivanjica i

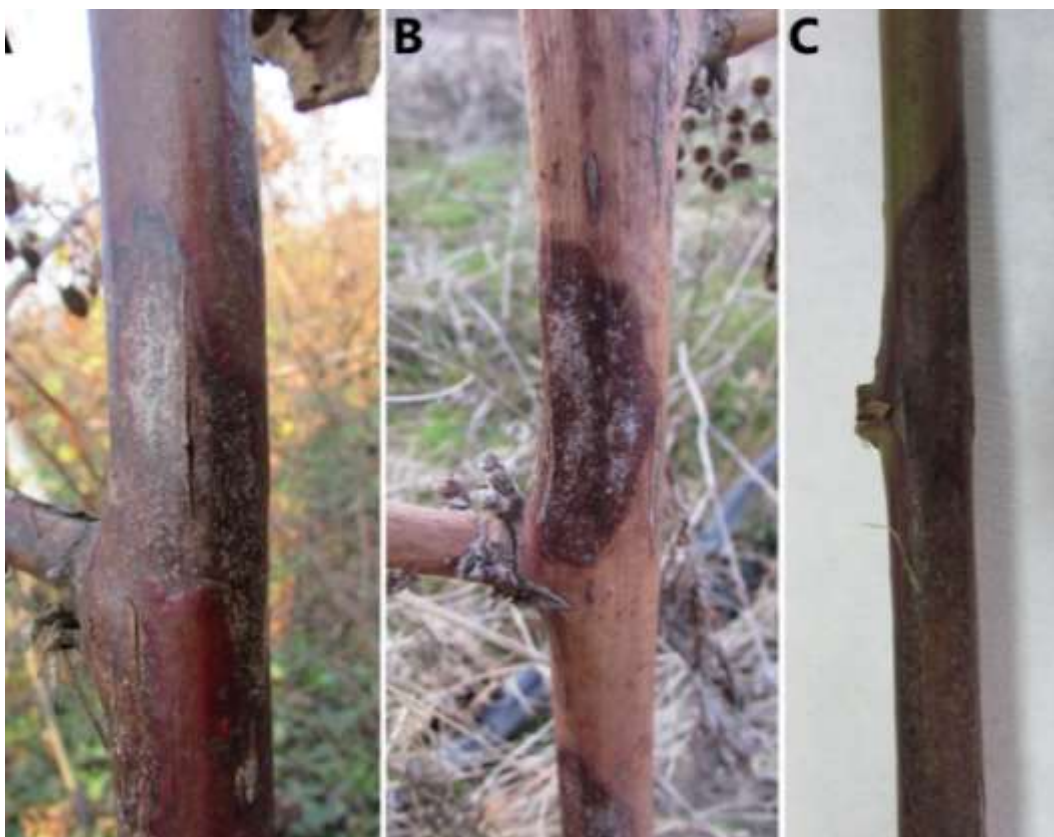
Čačak, incidenca bolesti do 40%). Iz biljaka u zasadima sorti Thornfree, Chester Thornless i Triple Crown (2, 1 i 1 zasad obuhvaćen pregledom) nisu dobijeni izolati *Septoria* spp.



Slika 4. *Septoria* spp.: Simptomi bolesti u polju. A-C – crvenkaste pege sa izraženom potpunom marginom

Početni simptomi na biljkama javljali su se krajem leta u vidu sitnih crvenkastih ili tamnozelenih pega na vegetativnim izdancima bliže površini zemljišta. Kasnije pege dobijaju crvenkastu boju i šire se na gornje internodije uvećavaju i mogu biti dužine i nekoliko centimetara. Pege su najčešće okruglaste ali spajanjem mogu da zahvate šire zone pa i čitave internodije (Slika 4). Starenjem pege menjaju boju u centralnom delu i postaju braonkaste, zadržavajući upadljivu purpurnu marginu. Navedeni simptomi teško mogu da se razlikuju od onih uzrokovanih vrstom *C. kahawae*, ali se uglavnom jasno razlikuju od simptoma koje uzrokuju drugi patogeni. Patogen zahvata koru ali ne kolonizira srž stabla. Pege iz kojih su dobijeni izolati *Septoria* spp. starenjem postaju tamnije, braonkaste boje u centralnom delu dok su starije pege uzrokovane vrstom *C. kahawae* još tamnije do crne boje u centralnom delu što može imati dijagnostički značaj.

➤ ***Botryosphaeria dothidea***. Ova vrsta detektovana je u ukupno 5 od 24 pregledana zasada kupine. Patogen je u svim zasadima bio u mešanim zarazama sa drugim vrstama i to sa *Gnomoniopsis idaeicola*, *Paraconiothyrium fuckelii*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe eres*, *Botrytis cinerea* i *Diplodia seriata*. Incidenca bolesti stabla na lokalitetima u kojima je utvrđeno prisustvo *B. dothidea* kretala se od 25% do 70% (prosečno 46%).

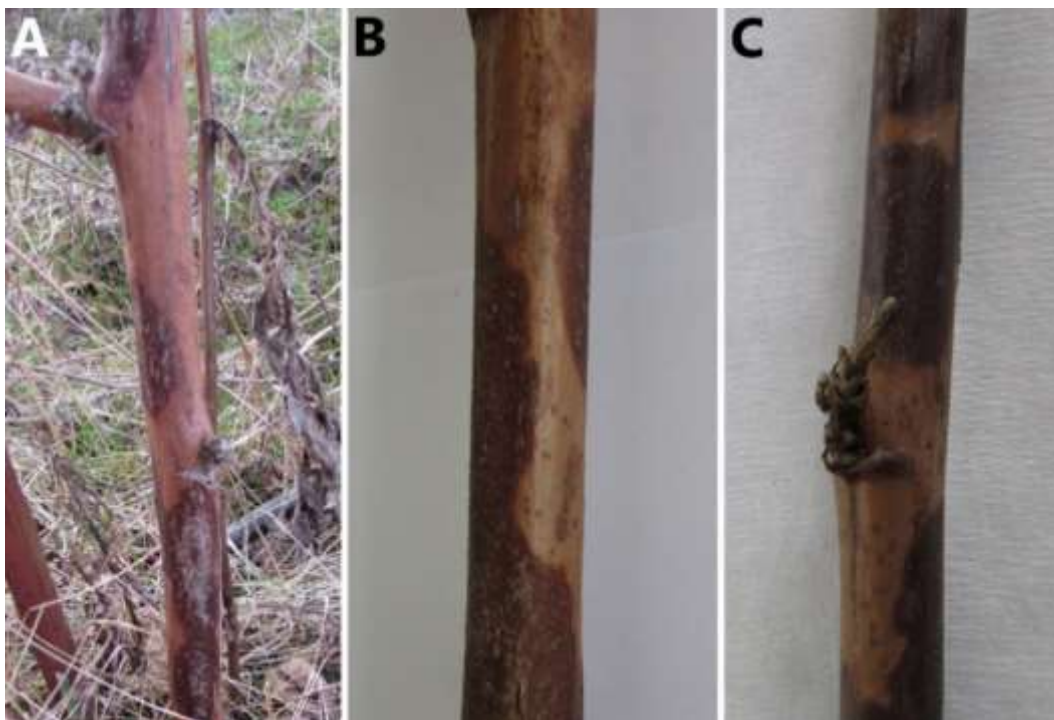


Slika 5. *Botryosphaeria dothidea*: Simptomi bolesti u polju. A – nekrotična pega sa crvenom marginom, izbeljivanje i uzdužno pucanje kore; B – braon nekrotična pega i izbeljivanje kore u centralnom delu; C – nekroza mrke boje bez crvene margine

B. dothidea rasprostranjena je u 3 od 16 pregledana zasada sorte Čačanska bestrna sa incidencom bolesti do 70%. Prisustvo ovog patogena takođe je utvrđeno u jednom zasadu sorte Chester Thornless (lokalitet Miokus, incidenca bolesti 70%) i jednom zasadu sorte Thornfree (lokalitet Donja Kamenica, incidenca bolesti 25%). Biljke u zasadima sorti Loch Ness i Triple Crown (4 odnosno 1 zasad obuhvaćen pregledom) nisu bile zaražene sa *B. dothidea*. Simptomi koje prouzrokuje *B. dothidea* veoma su slični simptomima drugih patogena stabla kupine, a pre svega *G. idaeicola*, *P. fuckelii*, *D. seriata* i *Neofusicoccum parvum*. Simptomi su vidljivi na rodnim lastarima u vidu

nekrotičnih pega tamnobraon ili cvenkaste boje, koje se formiraju najčešće oko nodusa. Pege se šire zahvatajući čak i čitave internodije. Vremenom središnji deo pege dobija svetliju, obično sivu boju (Slika 5A-C). Nekroza može da se proširi prstenasto usled čega dolazi do uvenuća i propadanja izdanaka. Ukoliko je prstenasto zahvaćeno stablo čitav nadzemni deo prekida razviće, a zametnuti plodovi prestaju sa rastom i razvićem, suše se što značajno utiče na visinu i kvalitet prinosa.

➤ ***Diplodia seriata***. Ova vrsta detektovana je u ukupno 4 od 24 pregledana zasada kupine. *D. seriata* bila je prisutna samo u mešanim zarazama i to sa *Gnomoniopsis idaeicola*, *Paraconiothyrium fuckelii*, *Diaporthe betulae*, *Botrytis cinerea*, *Botryosphaeria dothidea* i *Septoria* spp.

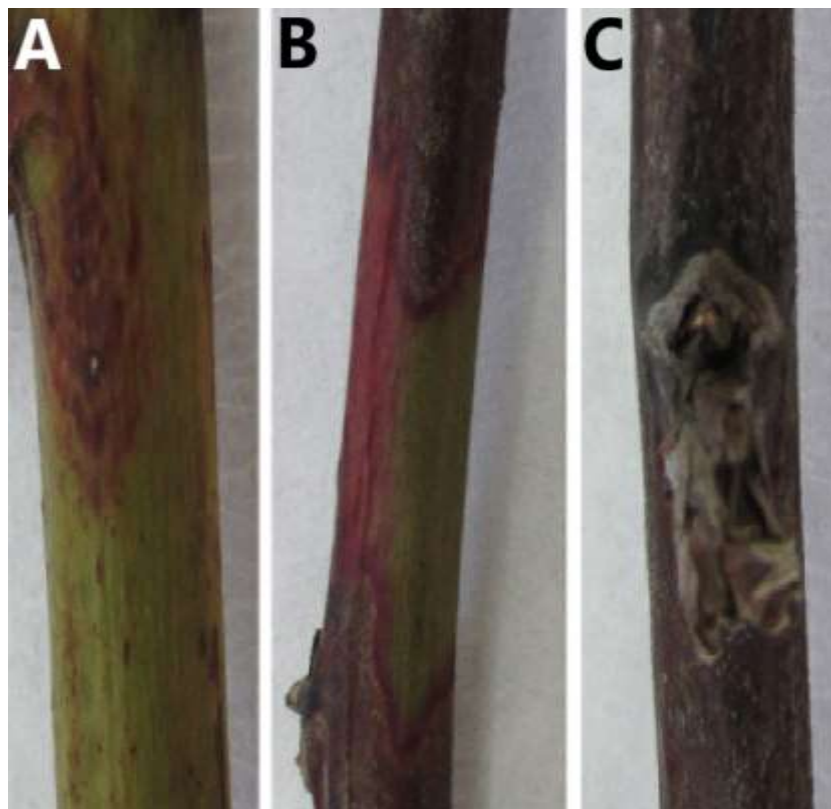


Slika 6. *Diplodia seriata*: Simptomi bolesti u polju. A – izdužene pege braon boje i izbeljivanje kore u središnjem delu; B – mrke braon nekroze sa uskim marginama crvenkaste boje, uzdužno pucanje stabla; C – nekroze mrko braon boje

Incidenca bolesti stabla na lokalitetima na kojima je utvrđeno prisustvo *D. seriata* kretala se od 20% do 70% (prosečno 43,75%). U zasadima sorte Čačanska bestrna *D. seriata* bila je rasprostranjena u 3 od 16 pregledanih zasada, sa incidencom bolesti do 45%. Prisustvo ovog patogena takođe je utvrđeno u jednom zasadu sorte Chester Thornless (lokalitet Miokus, incidenca bolesti 70%). Biljke u zasadima sorti Loch Ness,

Thornfree i Triple Crown (4, 2 i 1 zasad obuhvaćen pregledom) nisu bile zaražene vrstom *D. seriata*. Simptomi u vidu nekrotičnih pega koje prouzrokuje *D. seriata* (Slika 6A-C) bili su vrlo slični simptomima izazvanim vrstama *B. dothidea*, *G. idaeicola*, *P. fuckelii* i *Neofusicoccum parvum*.

➤ ***Botrytis cinerea***. U 3 od 24 pregledana zasada detektovane su zaraze stabla kupine vrstom *B. cinerea*. Patogen nije izolovan u pojedinačnim već uvek u mešanim zarazama i to sa *Gnomoniopsis idaeicola*, *Paraconiothyrium fuckelii*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* i *Septoria* spp. U zasadima u kojima je detektovana *B. cinerea* (lokaliteti Dobrić, Ruma i Brus) incidenca bolesti stabla kretala se od 25% do 40% (prosečno 35%). Patogen je bio prisutan jedino u zasadima sorte Čačanska bestrna (3 od 16 pregledanih zasada). Biljke u zasadima sorti Loch Ness, Thornfree, Chester Thornless i Triple Crown (4, 2, 1 i 1 zasad obuhvaćen pregledom) nisu bile zaražene vrstom *B. cinerea*.

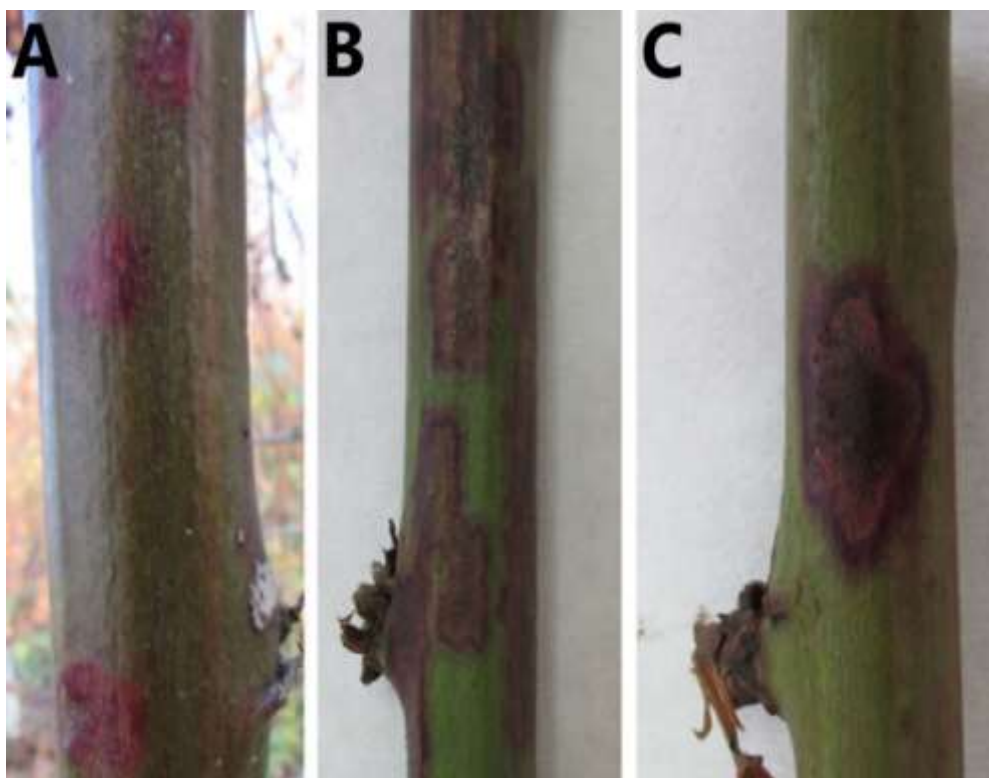


Slika 7. *Botrytis cinerea*: Simptomi na stablu kupine. A – nekrotične površine mrke boje sa jasnom purpurnom marginom, izbeljivanje kore; B – mrka nekroza internodija i nodusa; C – pega sa koncentričnim šarama

Prvi simptomi zaraze vrstom *B. cinerea* mogli su se videti na vegetativnim izdancima u vidu braonkastih pega često sa izraženim koncentričnim šarama (Slika 7A),

po čemu su se simptomi i razlikovali od svih ostalih prouzrokovaca bolesti stabla detektovanih u ovom radu. U povoljnim uslovima dolazi do širenja patogena, propadanja i nekroze čitavih internodija pa i stabala (Slika 7C). Nekrotične zone često su bile oivičene tankom crvenom marginom (Slika 7B). Tokom zime dolazilo je do izbeljivanja kore i kora stabla dobijala je sivu nijansu. U tom periodu simptomi izazvani vrstom *B. cinerea* postajali su slični većini ostalih patogena stabla kupine detektovanih u ovom radu.

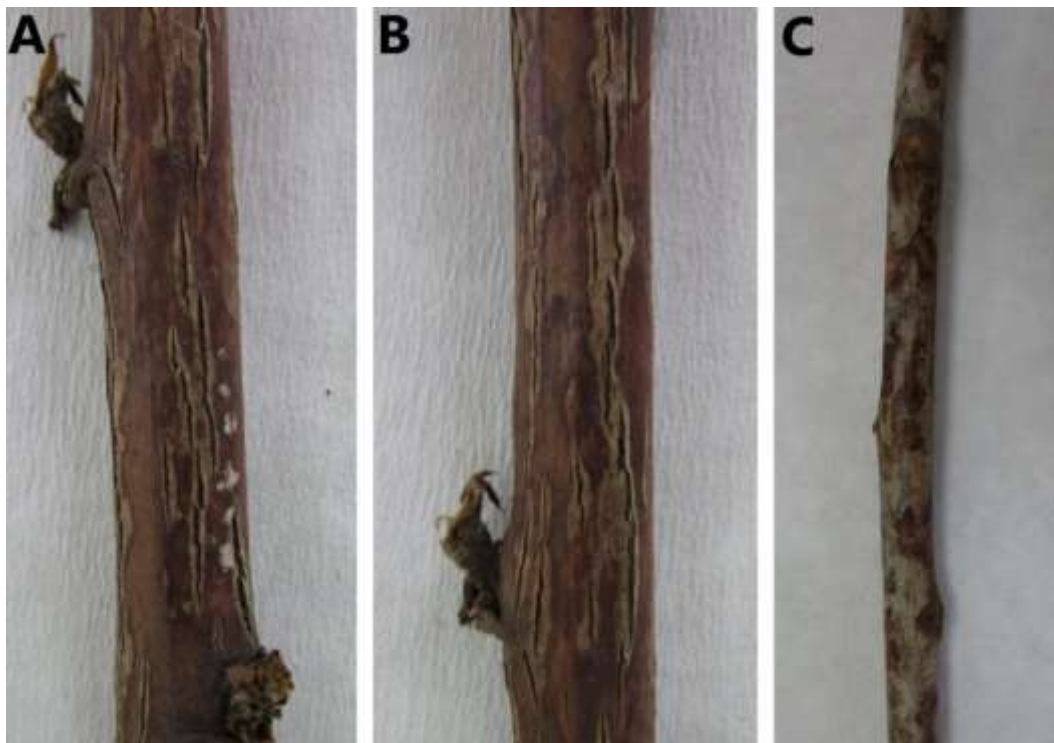
➤ ***Colletotrichum kahawae***. U 3 od 24 pregledana zasada kupine utvrđeno je prisustvo *C. kahawae* u mešanim zarazama sa drugim patogenima detektovanim u istim zasadima, pre svega sa *Gnomoniopsis idaeicola*, *Paraconiothyrium fuckelii*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diaporthe eres* i *Septoria* spp. Incidenca bolesti kretala se u rasponu od 20 do 70% (prosečno 43,33%). U zasadima sorte Čačanska bestrna *C. kahawae* bila je prisutna u 2 od 16 pregledanih zasada (lokaliteti Dragojevac i Kragujevac), sa incidencom bolesti stabla od 40 do 70%. Od četiri zasada sorte Loch Ness obuhvaćenih istraživanjima, patogen je pronađen samo na lokalitetu Čačak (incidenca bolesti 20%).



Slika 8. *Colletotrichum kahawae*: A – početni simptomi, crvena pegavost; B-C – mrke nekrotične pege sa purpurnom marginom

Biljke u zasadima ostale tri sorte, Thornfree, Chester Thornless i Triple Crown nisu bile zaražene sa *C. kahawe*. Prvi simptomi su se uočavali uglavnom krajem leta na vegetativnim izdancima. Patogen je prouzrokovao pojavu crvenkastih, najčešće eliptičnih pega koje su po svom izgledu veoma slične sa pegama izazvanim vrstama roda *Septoria* (Slika 8A-C). Pega se kasnije uvećavaju, dobijaju mrku pa crnu boju u centralnom delu praćenu pojavom centralnog prstena svetlije crvenkaste boje i izraženom ljubičastom marginom.

➤ *Diaporthe betulae*. U 2 od 24 pregledana zasada kupine detektovana je *D. betulae* u mešanim zarazama sa drugim patogenima i to sa *Gnomoniopsis idaeicola*, *Paraconiothyrium fuckelii*, *Septoria* spp. i *Diplodia seriata*. Patogen je izolovan u jednom zasadu sorte Thornfree (lokalitet Mišar) i jednom zasadu sorte Čačanska bestrna (lokalitet Negotin) sa incidencom bolesti 35% odnosno 45% (prosečno 40%). Biljke u zasadima sorti Loch Ness, Chester Thornless i Triple Crown (4, 1 i 1 zasad obuhvaćen pregledom) nisu bile zaražene vrstom *D. betulae*. Simptomi su bili u vidu izraženih, izduženih, eliptičnih, nekrotičnih pega sa purpurnom marginom. U toku zime, u nekrotičnom centralnom delu pege dolazilo je do izbeljivanja i uzdužnog pucanja kore (Slika 9A-C).



Slika 9. *Diaporthe betulae*: Simptomi na stablu kupine: A-B – izduženo eliptične nekrotične pege sa jasnom purpurnom marginom i uzdužno pucanje kore u centralnom delu; C – izbeljivanje kore

➤ ***Diaporthe eres***. U okviru ovih istraživanja, samo na lokalitetu Dragojevac, u zasadu sorte Čačanska bestrna detektovano je prisustvo *D. eres* u mešanim zarazama sa *Paraconiothyrium fuckelii*, *Botryosphaeria dothidea* i *Colletotrichum kahawae* i incidencom bolesti procenjenom na 40%. Simptomi su bili veoma slični, skoro identični onima koje prouzrokuje *D. betulae* (Slika 10A-C).



Slika 10. *Diaporthe eres*: Simptomi na stablu kupine: A-B – izduženo eliptične nekrotične pege sa jasnom purpurnom marginom i uzdužno pucanje kore u centralnom delu; C – izbeljivanje kore

➤ ***Neofusicoccum parvum***. Prisustvo *N. parvum* utvrđeno je u jednom zasadu sorte Čačanska bestrna na lokalitetu Zaječar u mešanoj zarazi sa *Gnomoniopsis idaeicola* i *Paraconiothyrium fuckelii*. Incidenca bolesti stabla procenjena je na 60%. Simptomi koje prouzrokuje *N. parvum* veoma su slični i teško se mogu razlikovati od onih koje uzrokuju *Botryosphaeria dothidea* i *Diplodia seriata*. Nekrotične pege tamnobraon ili crvenkaste boje formiraju se najčešće oko nodusa. Vremenom pege se šire zahvatajući šire zone pa i čitave internodije (Slika 11B-C). Na mlađem zelenom tkivu pege na stablu su eliptične tamnije u centru sa ljubičastom marginom (Slika 11A) koja starenjem tkiva i kore postaje slabije uočljiva. Nekrotične površine mogu da prstenasto obuhvate stablo dovodeći do

izumiranja izdanka iznad tog mesta. Starije pege u središnjem delu postaju svetlije beličasto-sivkaste boje.



Slika 11. *Neofusicoccum parvum*: Simptomi u polju. A – mrke pege sa upadljivom purpurnom marginom; B-C – izbeljivanje i uzdužno pucanje kore

5.2. Izbor izolata za dalji rad

Tokom četvorogodišnjeg istraživanja u periodu od 2013. do 2016. godine sakupljeno je 427 uzoraka iz kojih je dobijeno ukupno 468 izolata. Dobijeni izolati su na osnovu zajedničkih morfoloških karakteristika svrstani u 10 različitih morfoloških grupa (Tabela 8), koje su potvrđene na osnovu sekvenciranja ITS regiona rDNA.

➤ *Paraconiothyrium fuckelii* (označena kao morfološka grupa 1, Tabela 8) bila je prisutna u 78 od 427 analiziranih uzoraka kupine. Potvrđena je na sortama Čačanska bestrna, Thornfree i Chester Thornless (dobijeno 72, 17 odnosno 1 izolat). Ukupan procenat izolacije *P. fuckelii* bio je 18,3%. Samo u 12 od ukupno 78 pozitivnih uzoraka (15,38%) *P. fuckelii* javljala se u mešanim zarazama sa *Gnomoniopsis idaeicola*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diaporthe eres* ili *Colletotrichum kahawae*.

Tabela 8. Rasprostranjenost i učestalost patogena stabla kupine u Srbiji u periodu od 2013. – 2016. god.

Godina izolacije	Lokalitet	Sorta	Broj sakupljenih uzoraka	Broj izolata svrstanih po morfološkim grupama (M1-M10) i procenat izolacije po zasadima										
				M1 – <i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M2 – <i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M3 – <i>Septoria</i> spp.	M4 – <i>Botryosphaeria dothidea</i>	M5 – <i>Diplodia seriata</i>	M6 – <i>Botrytis cinerea</i>	M7 – <i>Colletotrichum kahawae</i>	M8 – <i>Diaporthe betulae</i>	M9 – <i>Diaporthe eres</i>	M10 – <i>Neofusicoccum parvum</i>	
2013	Leskovac	Čačanska bestrna	15 ^a	15 ^b (100) ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dragojevac	Čačanska bestrna	28	6 (17,8)	-	-	1 (3,6)	-	-	18 (64,3)	-	5 (14,3)	-	-
2014	Vrbovac	Čačanska bestrna	10	-	10 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mišar	Thornfree	23	8 (17,4)	19 (65,2)	-	-	-	-	-	4 (17,4)	-	-	-
2015	Miokus	Chester Thornless	5	1 (20)	-	-	3 (40)	3 (40)	-	-	-	-	-	-
		Čačanska bestrna	8	-	8 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dobrić	Čačanska bestrna	18	-	-	-	-	8 (44,4)	10 (55,6)	-	-	-	-	-
	Ruma	Čačanska bestrna	25	-	22 (64)	-	6 (16)	-	9 (20)	-	-	-	-	-
	Negotin	Čačanska bestrna	26	-	14 (50)	5 (19,2)	-	6 (19,2)	-	-	3 (11,6)	-	-	-
	Zaječar	Čačanska bestrna	26	4 (11,5)	23 (73,1)	-	-	-	-	-	-	-	-	7 (15,4)

2016	Boljevac	Čačanska bestrna	17	8 (35,3)	-	4 (23,5)	-	9 (41,2)	-	-	-	-	-
	Knjaževac	Čačanska bestrna	5	-	-	5 (100)	-	-	-	-	-	-	-
	Medveđa	Čačanska bestrna	23	3 (13)	-	20 (87)	-	-	-	-	-	-	-
	Donja	Thornfree	17	9 (41,2)	8 (35,3)	-	4 (23,5)	-	-	-	-	-	-
	Kamenica	Triple Crown	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Loch Ness	23	-	-	23 (100)	-	-	-	-	-	-	-
	Ivanjica	Čačanska bestrna	12	-	-	12 (100)	-	-	-	-	-	-	-
		Loch Ness	9	-	-	9 (100)	-	-	-	-	-	-	-
	Arilje	Čačanska bestrna	5	2 (40)	3 (60)	-	-	-	-	-	-	-	-
	Čačak	Loch Ness	29	-	-	27 (93,1)	-	-	-	2 (6,9)	-	-	-
	Kragujevac	Čačanska bestrna	25	12 (40)	11 (44)	-	3 (8)	-	-	3 (8)	-	-	-
	Prokuplje	Čačanska bestrna	26	9 (34,6)	15 (57,7)	2 (7,7)	-	-	-	-	-	-	-
	Brus	Čačanska bestrna	17	13 (76,5)	-	3 (17,6)	-	-	1 (5,9)	-	-	-	-
	Svilajnac	Loch Ness	30	-	30 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-
			427^d	90^e (18,3)^f	163 (34,2)	110 (25,8)	17 (3,04)	26 (5,15)	20 (3,75)	23 (5,15)	7 (1,64)	5 (0,94)	7 (0,94)

^aBroj sakupljenih uzoraka po zasadu.

^bBroj dobijenih izolata po zasadu.

^cProcenat izolacije po zasadu (odnos broja uzoraka u kojima je detektovana određena vrsta i ukupnog broja uzoraka po zasadu).

^dUkupan broj uzoraka.

^eUkupan broj izolata po morfološkim grupama.

^fProsečan procenat izolacije (odnos ukupnog broja uzoraka u kojima je detektovana određena vrsta i ukupnog broja sakupljenih uzoraka).

➤ ***Gnomoniopsis idaeicola*** (označena kao morfološka grupa 2, Tabela 8) dokazana je u 146 od 427 analiziranih uzoraka kupine. Potvrđena je na sortama Čačanska bestrna, Loch Ness i Thornfree (dobijeno 106, 30 odnosno 27 izolata). Ukupan procenat izolacije *G. idaeicola* bio je 34,2%. *G. idaeicola* je u najvećoj meri pojedinačno izolovana iz uzorkovanih biljaka kupine, mada bila je prisutna i u mešanim infekcijama u 17 od ukupno 146 pozitivnih uzoraka (11,64%) sa drugim patogenima (*Paraconiothyrium fuckelii*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botrytis cinerea*, *Diplodia seriata* ili *Neofusicoccum parvum*).

➤ ***Septoria spp.*** (označena kao morfološka grupa 3, Tabela 8) potvrđena je u 110 od 427 analiziranih uzoraka kupine i to na sortama Čačanska bestrna i Loch Ness (dobijeno 51 odnosno 59 izolata). Ukupan procenat izolacije *Septoria spp.* bio je 25,8% i to samo u pojedinačnim zarazama.

➤ ***Botryosphaeria dothidea*** (označena kao morfološka grupa 4, Tabela 8) potvrđena je u 13 od 427 analiziranih uzoraka kupine, u uzorcima sorti Čačanska bestrna, Thornfree i Chester Thornless (dobijeno 10, 4 odnosno 3 izolata). Ukupan procenat izolacije *B. dothidea* bio je 3,04%. *B. dothidea* najčešće je pojedinačno izolovana, mada je bila prisutna i u mešanim infekcijama u 4 od ukupno 13 pozitivnih uzoraka (30,77%) sa *Diplodia seriata*, *Gnomoniopsis idaeicola* ili *Paraconiothyrium fuckelii*.

➤ ***Diplodia seriata*** (označena kao morfološka grupa 5, Tabela 8) potvrđena je u 22 od 427 analiziranih uzoraka kupine, u sortama Čačanska bestrna i Chester Thornless (dobijeno 23, odnosno 3 izolata). Ukupan procenat izolacije *D. seriata* bio je 5,15%. *D. seriata* najčešće je pojedinačno izolovana, ali i u mešanim infekcijama u 4 od ukupno 22 pozitivna uzorka (18,18%) sa *Botryosphaeria dothidea*, *Gnomoniopsis idaeicola* ili *Paraconiothyrium fuckelii*.

➤ ***Botrytis cinerea*** (označena kao morfološka grupa 6, Tabela 8) potvrđena je u 16 od 427 analiziranih uzoraka kupine, u uzorcima sorte Čačanska bestrna (dobijeno 20 izolata). Ukupan procenat izolacije *B. cinerea* bio je 3,75%. Najčešće je pojedinačno izolovana,

mada i u mešanim infekcijama sa *Gnomoniopsis idaeicola* i to u 4 od ukupno 16 pozitivnih uzoraka (25%).

➤ *Colletotrichum kahawae* (označena kao morfološka grupa 7, Tabela 8) potvrđena je u 22 od 427 analiziranih uzoraka kupine sorti Čačanska bestrna i Loch Ness (dobijeno 21, odnosno 2 izolata). Ukupan procenat izolacije *Colletotrichum kahawae* bio je 5,15%. Najčešće je pojedinačno izolovana ali i u 1 uzorku (4,54%) u mešanoj infekciji sa *Paraconiothyrium fuckelii*.

➤ *Diaporthe betulae* (označena kao morfološka grupa 8, Tabela 8) potvrđena je u 7 od 427 analiziranih uzoraka kupine uvek u pojedinačnim zarazama, u uzorcima sorti Čačanska bestrna i Thornfree (dobijeno 7 izolata). Ukupan procenat izolacije *D. betulae* bio je 1,64%.

➤ *Diaporthe eres* (označena kao morfološka grupa 9, Tabela 8) potvrđena je u 4 od 427 analiziranih uzoraka kupine, u uzorcima sorti Čačanska bestrna (dobijeno 5 izolata). Ukupan procenat izolacije *D. eres* bio je 0,94%, uglavnom u pojedinačnim zarazama, a u 1 od ukupno 4 pozitivnih uzoraka (25%) bila je u mešanoj zarazi sa *Paraconiothyrium fuckelii*.

➤ *Neofusicoccum parvum* (označena kao morfološka grupa 10, Tabela 8) potvrđena je u 4 od 427 analiziranih uzoraka kupine sorte Čačanska bestrna. Ukupan procenat izolacije *N. parvum* bio je 0,94%. Izolovana u jednom zasadu najčešće u mešanoj infekciji sa *G. idaeicola*, u 3 od ukupno 4 pozitivnih uzorka (75%).

Tabela 9. Pregled identifikovanih i okarakterisanih izolata patogeni kupine u periodu od 2013. do 2016. godine

God.	Lokalitet	Sorta kupine	Izolovane vrste	Morfološka grupa	Broj izolata ^a	Mešane zaraze ^b	Broj čistih kultura	PCR ^c
2013	Leskovac	Čačanska bestrna	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	15	-	8	3
		Dragojevac	Čačanska bestrna	<i>Colletotrichum kahawae</i>	M7	18	-	11
			<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	6	1	3	3
			<i>Diaporthe eres</i>	M9	5	1	3	3
			<i>Botryosphaeria dothidea</i>	M4	1	-	1	1
2014	Vrbovac	Čačanska bestrna	<i>Gnomoniopsis. idaeicola</i>	M2	10	-	3	2
		Mišar	Thornfree	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	19	4	6
			<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	8	4	1	1
			<i>Diaporthe betulae</i>	M8	4	-	1	1
2015	Miokus	Chester	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	1	-	1	1
		Thornless	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	M4	3	1	1	1
				<i>Diplodia seriata</i>	M5	3	1	1
	Dobrić	Čačanska bestrna	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	8	-	2	2
		Čačanska bestrna	<i>Botrytis cinerea</i>	M6	10	-	6	3
				<i>Diplodia seriata</i>	M5	8	-	2
	Ruma	Čačanska bestrna	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	22	6	9	2
			<i>Botryosphaeria dothidea</i>	M4	6	2	2	1
			<i>Botrytis cinerea</i>	M6	9	4	2	1
	Negotin	Čačanska bestrna	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	14	1	10	1
			<i>Septoria</i> spp.	M3	5	-	3	1
			<i>Diplodia seriata</i>	M5	6	1	2	1
			<i>Diaporthe betulae</i>	M8	3	-	1	1
Zaječar	Čačanska bestrna	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	23	4	11	2	
		<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	4	1	1	1	
		<i>Neofusicoccum parvum</i>	M10	7	3	1	1	

2016	Boljevac	Čačanska bestrna	<i>Diplodia seriata</i>	M5	9	2	4	1
			<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	8	2	3	2
			<i>Septoria</i> spp.	M3	4	-	3	1
Knjaževac	Čačanska bestrna	<i>Septoria</i> spp.	M3	5	-	1	1	
		Medveđa	Čačanska bestrna	<i>Septoria</i> spp.	M3	20	-	13
<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1			3	-	2	1	
Donja Kamenica	Thornfree			<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	8	2	3
		<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	9	2	4	1	
Ivanjica	Čačanska bestrna	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	M4	4	-	2	1	
		Loch Ness	<i>Septoria</i> spp.	M3	23	-	17	1
		Čačanska bestrna	<i>Septoria</i> spp.	M3	12	-	6	1
Arilje	Čačanska bestrna	Loch Ness	<i>Septoria</i> spp.	M3	9	-	9	1
		<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	3	-	1	1	
Čačak	Loch Ness	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	2	-	1	1	
		<i>Septoria</i> spp.	M3	27	-	22	1	
		<i>Colletotrichum kahawae</i>	M7	2	-	2	1	
Kragujevac	Čačanska bestrna	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	11	-	3	1	
		<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	12	2	6	1	
		<i>Botryosphaeria dothidea</i>	M4	3	1	2	1	
		<i>Colletotrichum kahawae</i>	M7	3	1	1	1	
		Prokuplje	Čačanska bestrna	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	15	-	7
<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1			9	-	3	1	
<i>Septoria</i> spp.	M3			2	-	2	1	
Brus	Čačanska bestrna	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	M1	13	-	9	2	
		<i>Septoria</i> spp.	M3	3	-	2	1	
		<i>Botrytis cinerea</i>	M6	1	-	1	1	
Svilajnac	Loch Ness	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	M2	30	-	10	1	
Ukupno					468	46	231	73

^aUkupan broj izolata (pojedinačne i mešane zaraze); ^bBroj uzoraka u kojima su detektovane mešane zaraze;

^cBroj sekvenciranih izolata

Nakon svrstavanja u morfološke grupe (Tabela 8), od ukupno 468 dobijenih izolata 52 je odabrano za proveru patogenosti i morfološku karakterizaciju (po jedan izolat iz svake morfološke grupe poreklom iz svakog zasada), odnosno 73 izolata odabrano je za molekularne analize (odabran je po najmanje jedan izolat iz svake morfološke grupe poreklom iz svakog zasada) (Tabela 10). Za ispitivanje patogenosti i morfološku karakterizaciju odabrano je 12 izolata vrste *Paraconiothyrium fuckelii*, 11 izolata vrste *Gnomoniopsis idaeicola*, 10 izolata vrsta roda *Septoria*, 5 izolata vrste *Botryosphaeria dothidea*, 4 izolata vrste *Diplodia seriata*, 3 izolata vrste *Botrytis cinerea*, 3 izolata vrste *Colletotrichum kahawae*, 2 izolata vrste *Diaporthe betulae*, 1 izolat vrste *Diaporthe eres* i 1 izolat vrste *Neofusicoccum parvum*. Za molekularnu karakterizaciju odabrano je 18 izolata vrste *Paraconiothyrium fuckelii*, 18 izolata vrste *Gnomoniopsis idaeicola*, 12 izolata *Septoria* spp., 5 izolata vrste *Botryosphaeria dothidea*, 4 izolata vrste *Diplodia seriata*, 5 izolata vrste *Botrytis cinerea*, 5 izolata vrste *Colletotrichum kahawae*, 2 izolata vrste *Diaporthe betulae*, 3 izolata vrste *Diaporthe eres* i 1 izolat vrste *Neofusicoccum parvum*.

Tabela 10. Pregled izolata odabranih za dalji rad

Godina	Okrug	Lokalitet	Sorta	Oznaka izolata	Oznaka morfološke grupe
2013	Jablanički	Leskovac	Čačanska bestrna	KLE3-13	M1
				KLE10-13	M1
				KLE14-13	M1
	Mačvanski	Dragojevac	Čačanska bestrna	KDR1-13	M4
				KDR2-13	M1
				KDR3-13	M9
				KDR8-13	M7
				KDR9-13	M1
				KDR10-13	M1
				KDR12-13	M4
				KDR17-13	M7
				KDR21-13	M9
KDR22-13	M9				
2014	Podunavski	Vrbovac	Čačanska bestrna	KVR1-14	M2
				KVR2-14	M2
	Mačvanski	Mišar	Thornfree	KMS2-14	M2
				KMS4-14	M2
				KMS6-14	M2
				KMS7-14	M8
				KMS8-14	M1

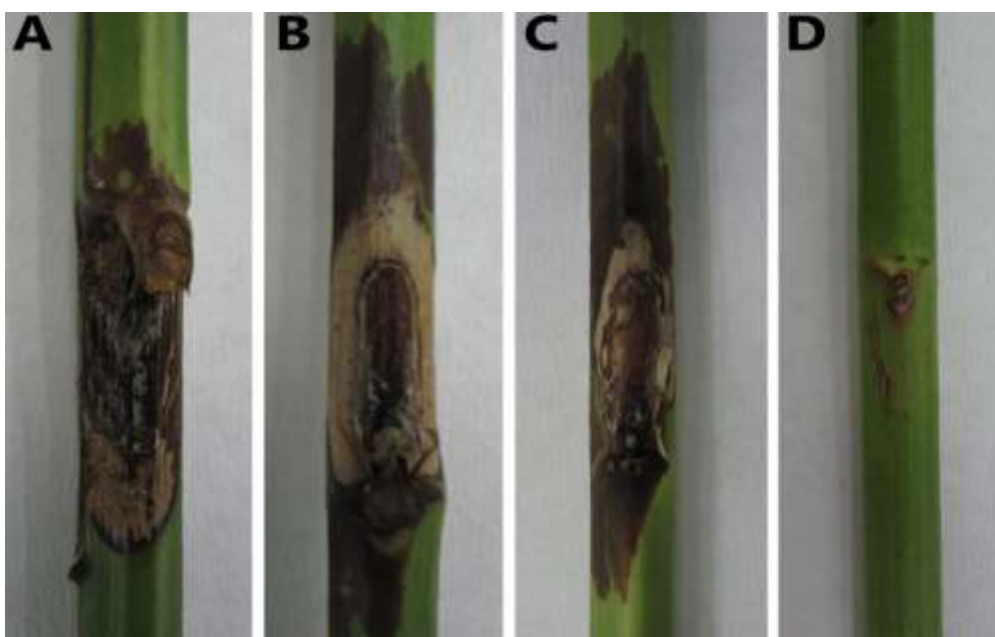
2015	Mačvanski	Miokus	Chester Thornless	KMS12-14	M2	
				KMI3-15	M4	
				KMI4-15	M5	
				KMI7-15	M1	
		Dobrić	Čačanska bestrna	KMI5-15	M2	
				KMI8-15	M2	
				KDO2-15	M6	
				KDO4-15	M6	
	Sremski	Ruma	Čačanska bestrna	KDO7-15	M5	
				KDO9-15	M6	
				KRU7-15	M2	
				KRU9-15	M2	
	Borski	Negotin	Čačanska bestrna	KRU14-15	M6	
				KRU15-15	M4	
				KNEI7-15	M2	
				KNEII1-15	M3	
	Zaječarski	Zaječar	Čačanska bestrna	KNEIII1-15	M5	
				KNEIII3-15	M8	
				KNEIV4-15	M3	
				KZAI1-15	M2	
2016	Zaječarski	Boljevac	Čačanska bestrna	KZAI1-15	M2	
				KZAI1-15	M1	
				KZAI3-15	M10	
				KZAI3-15	M2	
	Rasinski	Knjaževac Medveđa	Čačanska bestrna Čačanska bestrna	KZAI3-15	M2	
				KBOI1-16	M4	
				KBOI3-16	M1	
				KBOI7-16	M1	
	Kolubarski	Donja Kamenica	Thornfree	KBOII1-16	M3	
				KKZ1-16	M3	
				KME3-16	M1	
				KME7-16	M3	
	Moravički	Ivanjica	Loch Ness Čačanska bestrna	KME19-16	M3	
				KDK19-16	M1	
				KDK28-16	M2	
				KDK29-16	M4	
	Zlatiborski	Arilje	Čačanska bestrna	KDK4-16	M3	
				KIV6-16	M3	
				KIV7-16	M3	
				KAR1-16	M1	
Moravički	Čačak	Loch Ness	KAR2-16	M2		
			KCA1-16	M3		
			KCA5-16	M7		
			Šumadijski	Kragujevac	Čačanska bestrna	KKR1-16
Toplički	Prokuplje	Čačanska bestrna	KKR5-16			M1
			KKR7-16			M2
			KKR14-16			M7
Toplički	Prokuplje	Čačanska bestrna	KPK3-16	M1		
			KPK5-16	M3		
			KPK10-16	M2		

Rasinski	Brus	Čačanska bestrna	KBR2-16	M1
			KBR13-16	M6
			KBR14-16	M3
			KBR17-16	M1
Pomoravski	Svilajnac	Loch Ness	KSV1-16	M2

5.3. Provera patogenosti ispitivanih izolata

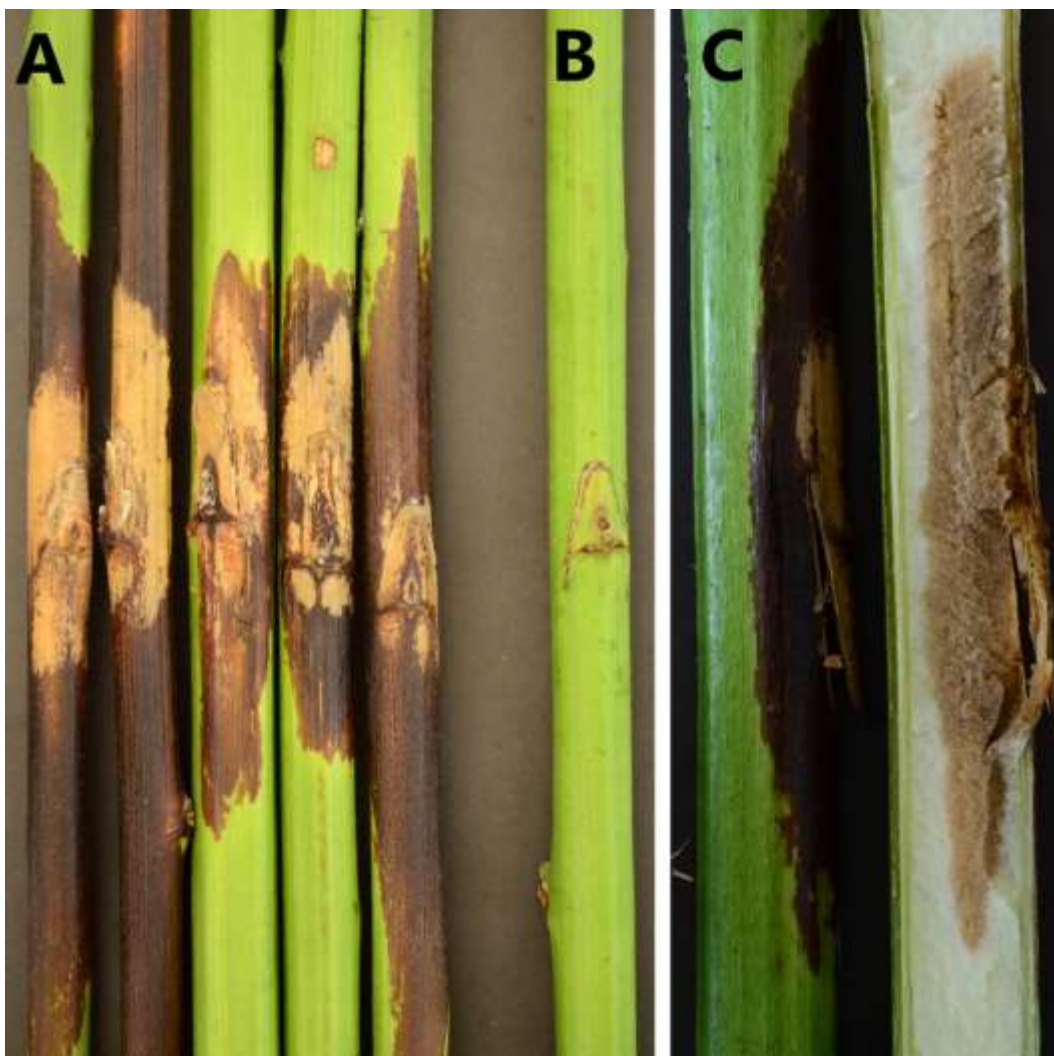
Za proveru patogenosti odabrano je ukupno 52 izolata, po jedan reprezentativni izolat svake morfološke grupe odnosno vrste sa svakog lokaliteta. U uslovima postavljenog eksperimenta, odabrani izolati ostvarili su zarazu inokulisanih reznica kupine i izazvali pojavu simptoma koji su po izgledu odgovarali simptomima prirodne zaraze. Iz svih zaraženih reznica kupine uspešno je izvršena reizolacija čime su zadovoljeni Koh-ovi postulati.

➤ *Paraconiothyrium fuckelii*. Ukupno 12 izolata, poreklom iz 12 zasada sa 12 lokaliteta ispoljili su uniformne osobine u pogledu patogenosti. Simptomi su bili u vidu tamnobraon nekroze kore i unutrašnjeg tkiva stabla, sa brojnim, crnim piknidima koji su se formirali u centralnom delu oko mesta inokulacije, uglavnom praćeno izbeljavanjem kore (Slika 12A-C), 14 dana od inokulacije. Na kontrolnim reznicama nije došlo do razvoja simptoma (Slika 12D).



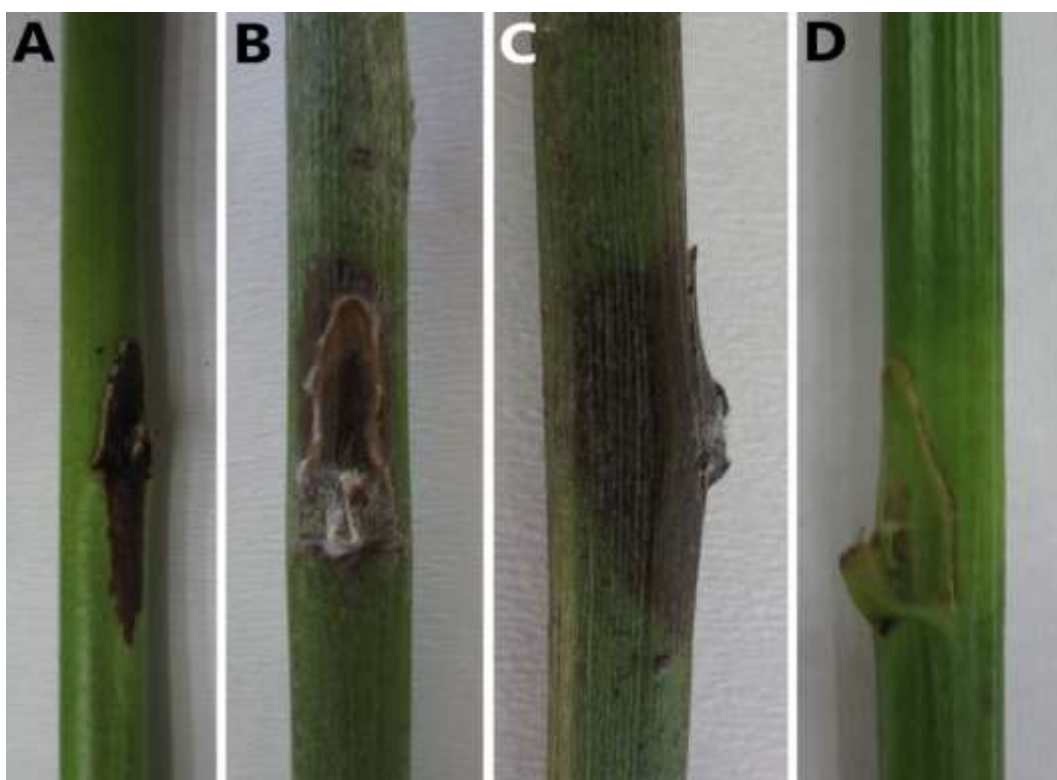
Slika 12. *Paraconiothyrium fuckelii*: Provera patogenosti. A-C – nekroza, izbeljivanje kore i sporulacija; D – negativna kontrola

➤ *Gnomoniopsis idaeicola*. Ukupno 11 izolata, poreklom iz 11 zasada sa 11 lokaliteta prouzrokovali su razvoj izraženih simptoma na inokulisanim reznicama kupine 14 dana posle inokulacije, potvrđujući svoju patogenost. Iz svih inokulisanih reznica izvršena je uspešna reizolacija. Simptomi na inokulisanim reznicama manifestovali su se u vidu tamnobraon do sivkaste nekroze kore, sa brojnim, crnim piknidima koji su se formirali oko inokulisanog mesta (Slika 13A). Izbeljivanje kore zabeleženo je skoro kod svih izolata, nalik na simptome koji se javljaju u prirodnim infekcijama. Patogen kolonizuje unutrašnjost stabla, bez obzira na intenzitet nekroze kore. Unutrašnjost stabla dobija braon boju i često dolazi do delimične dezorganizacije srži (Slika 13C). Na kontrolnim reznicama nije došlo do razvoja simptoma (Slika 13B).



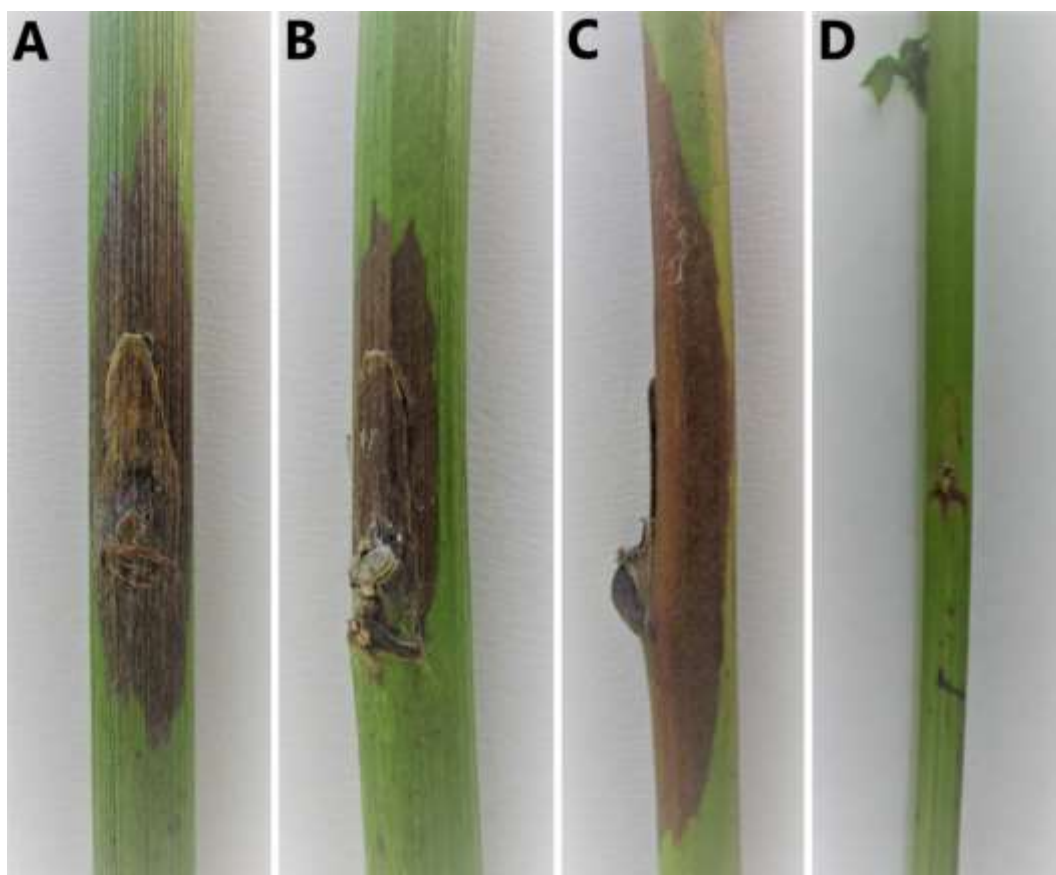
Slika 13. *Gnomoniopsis idaeicola*: Provera patogenosti. A – nekroza, izbeljivanje kore i sporulacija; B – negativna kontrola; C – nekroza srži

➤ ***Septoria* spp.** Ispitivanja patogenosti *Septoria* spp. obuhvatilo je 10 izolata poreklom iz 10 zasada sa 9 lokaliteta koji su ispoljili uniformne osobine u pogledu ispoljavanja patogenosti na inokulisanim reznicama kupine. Simptomi su se manifestovali u vidu umerene nekroze koja se širila lokalno oko mesta inokulacije ne zahvatajući široke zone i ne obuhvatajući stablo prstenasto. Nekroza je bila braon do mrkobraon boje (Slika 14A-C). Nije došlo do izbeljivanja kore kao ni do formiranja plodonosnih tvorevina u okviru zaraženih površina. Na kontrolnim reznicama nije došlo do razvoja simptoma (Slika 14D).



Slika 14. *Septoria* spp.: Provera patogenosti. A-C – umerena nekroza braon boje oko mesta inokulacije; D – negativna kontrola

➤ *Botryosphaeria dothidea*. Ispitivanjima patogenosti *B. dothidea* obuhvaćeno je 5 izolata poreklom iz 5 zasada sa 5 lokaliteta koji su ispoljili uniformne osobine u pogledu patogenosti na inokulisanim reznicama kupine. Simptomi su se manifestovali u vidu nekroze braon boje koja se širila oko mesta inokulacije (Slika 15A-C). U centralnom delu došlo je do formiranja piknida u vidu sitnih plikova, kao i izbeljivanja kore (Slika 15A-C). Nisu zabeležene razlike u intenzitetu sporulacije. Na kontrolnim reznicama nije došlo do razvoja simptoma (Slika 15D).



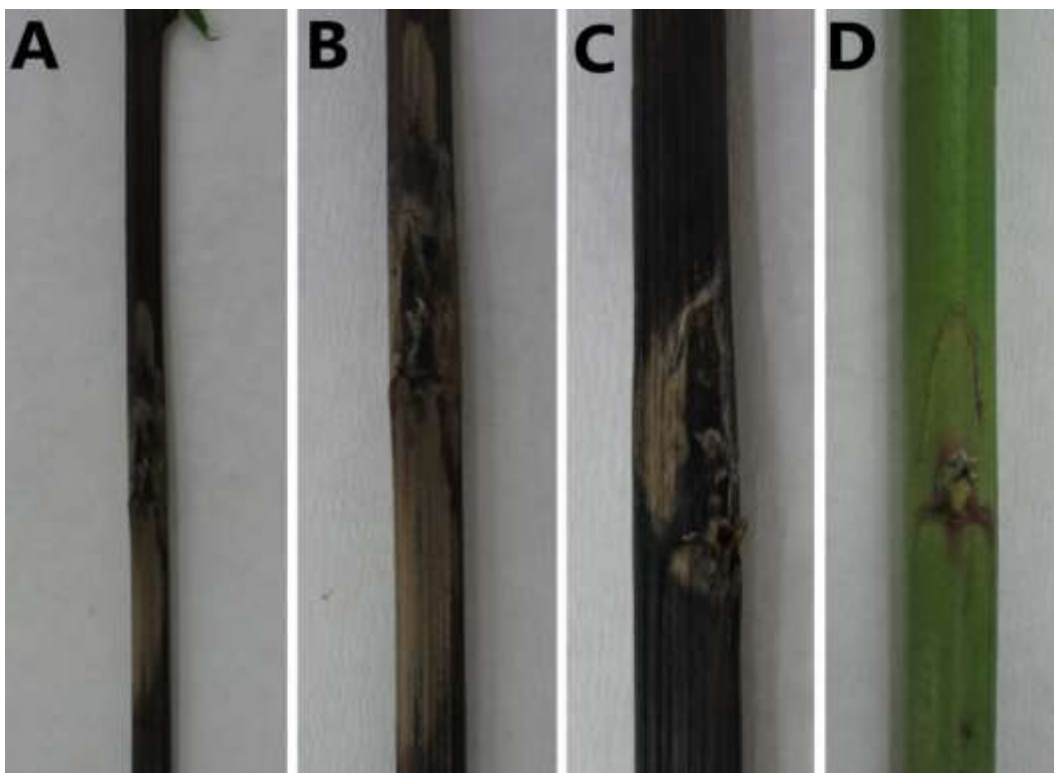
Slika 15. *Botryosphaeria dothidea*: Provera patogenosti. A-C – nekroza braon boje; D – negativna kontrola

➤ *Diplodia seriata*. Ispitivanjima patogenosti *D. seriata* obuhvaćeno je 4 izolata poreklom iz 4 zasada sa 4 lokaliteta koji su ispoljili uniformnu patogenost na inokulisanim reznicama kupine. Simptomi su se manifestovali u vidu nekroze tamnobraon boje koja se širila oko mesta inokulacije (Slika 16A-C). U centralnom delu došlo je do formiranja piknida u vidu sitnih plikova, kao i do izbeljivanja kore (Slika 16A-C). Na kontrolnim reznicama nije došlo do pojave simptoma (Slika 16D).



Slika 16. *Diplodia seriata*: Provera patogenosti. A-C – nekroza i izbeljivanje kore; D – negativna kontrola

➤ *Botrytis cinerea*. Ispitivanja patogenosti vrste *B. cinerea* obuhvatilo je 3 izolata poreklom iz 3 zasada sa 3 lokaliteta koji su ispoljili uniformnu patogenost na inokulisanim reznicama kupine. Nakon 14 dana od inokulacije sva tri ispitivana izolata prouzrokovali su potpuno sušenje reznica sa izraženom nekrozom mrke boje, dok je centralni deo reznice oko inokulisanog mesta bio sivkaste boje (Slika 17A-C). Nije došlo do sporulacije patogena na inokulisanim reznicama. Na kontrolnim reznicama nije došlo do razvoja simptoma (Slika 17D).



Slika 17. *Botrytis cinerea*: Provera patogenosti. A-C – nekroza i sušenje inokuliranih reznica; D – negativna kontrola

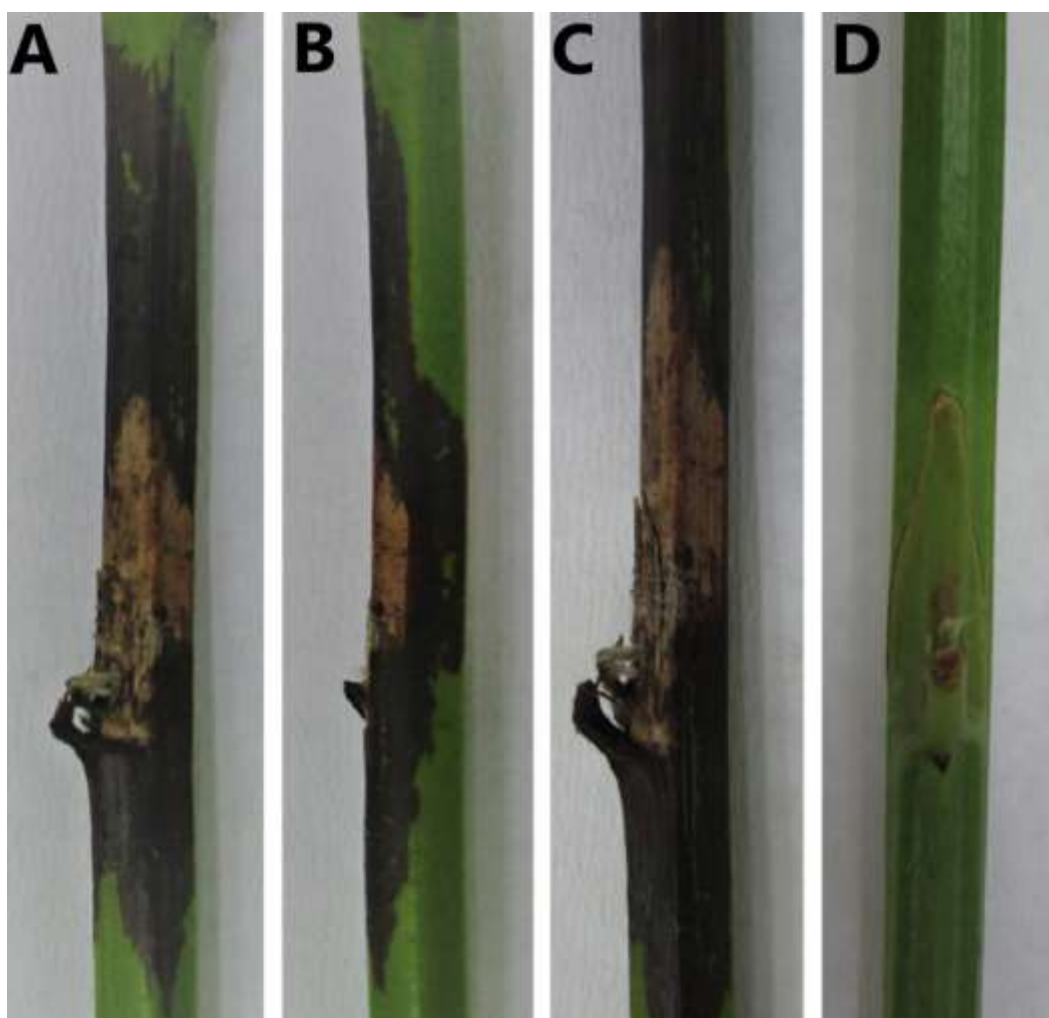
➤ *Colletotrichum kahavae*. Ispitivanje patogenosti *C. kahavae* obuhvatilo je 3 izolata poreklom iz 3 zasada sa 3 lokaliteta koji su ispoljili uniformne osobine u pogledu patogenosti na inokuliranim reznicama kupine.



Slika 18. *Colletotrichum kahavae*. Provera patogenosti. A-B – umerena nekroza braon boje oko mesta inokulacije; C – negativna kontrola

Odabrani izolati prouzrokovali su pojavu nekroze tamnobraon boje (Slika 18A-B). Nije došlo do izbeljivanja kore niti do formiranja plodonosnih tela. Na kontrolnim reznicama nije došlo do razvoja simptoma (Slika 18C).

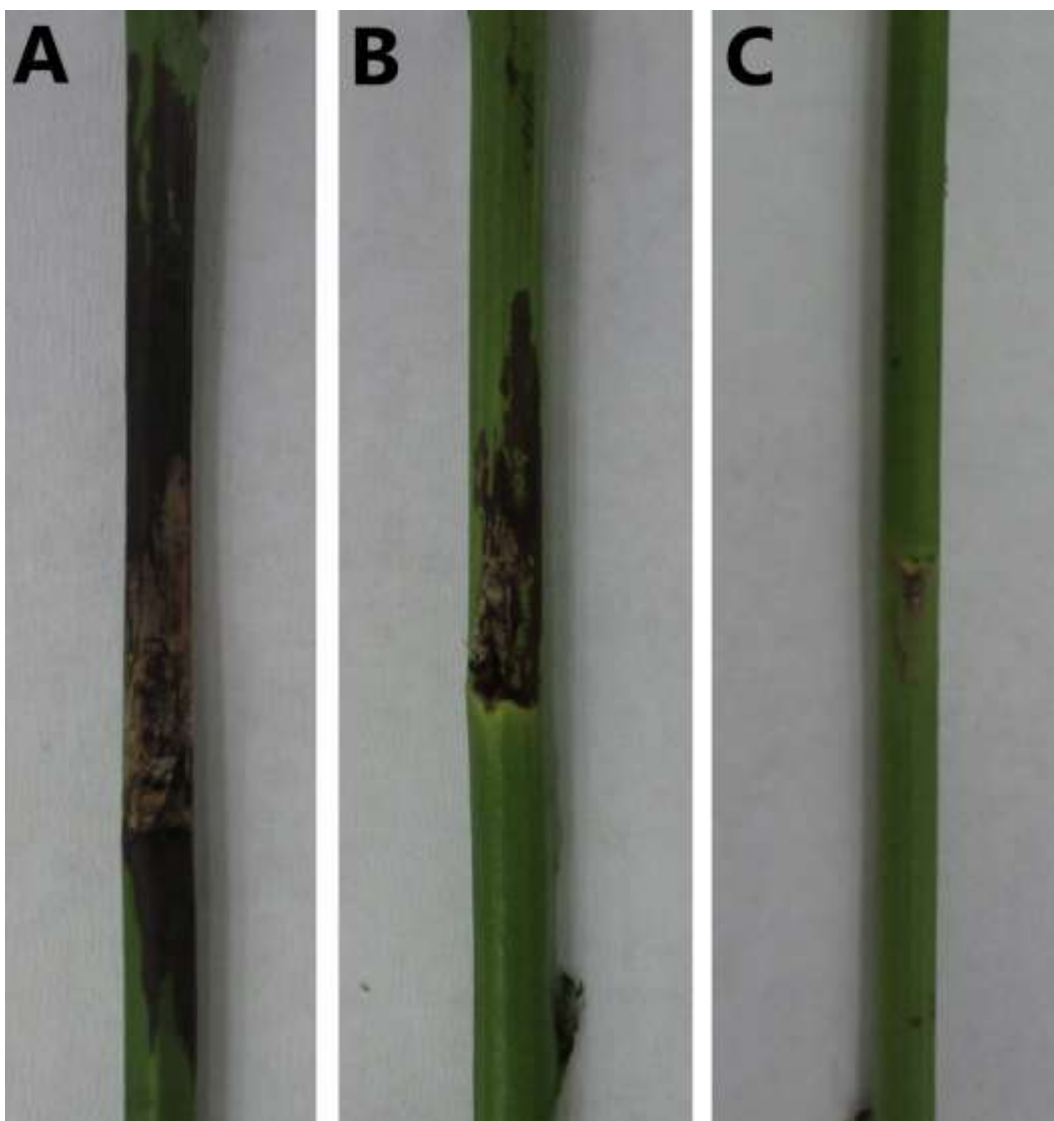
➤ *Diaporthe betulae*. Ispitivanja patogenosti *D. betulae* obuhvatila su 2 izolata poreklom iz 2 zasada sa 2 lokaliteta. Izolati su na inokulisanim reznicama kupine prouzrokovali pojavu tamnomrke nekroze sa svetlijim centralnim delom u okviru kojeg je došlo do izbeljivanja kore i formiranja piknida (Slika 19A-C). Na kontrolnim reznicama nije došlo do razvoja simptoma bolesti (Slika 19D).



Slika 19. *Diaporthe betulae*: Provera patogenosti. A-C – nekroza, izbeljivanje kore i sporulacija; D – negativna kontrola

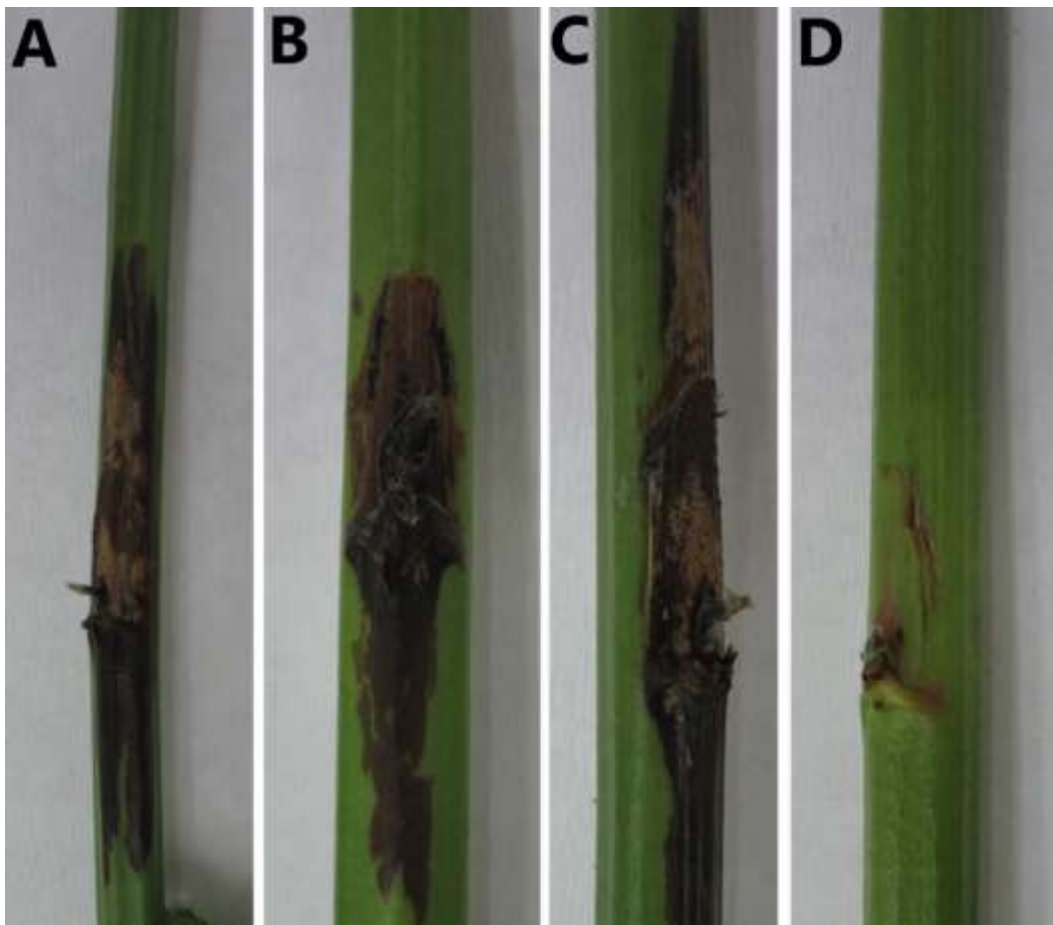
➤ *Diaporthe eres*. Ova vrsta detektovana je u jednom zasadu odakle je odabran jedan izolat koji je izazvao pojavu tamnomrke nekroze praćenu izbeljivanjem kore u

centralnom delu i formiranjem piknida (Slika 20A-B) nakon veštačkih inokulacija. Na kontrolnim reznicama nije došlo do razvoja simptoma bolesti (Slika 20C).



Slika 20. *Diaporthe eres*: Provera patogenosti. A-B – nekroza, izbeljivanje kore i sporulacija; C – negativna kontrola

➤ *Neofusicoccum parvum* je detektovan u jednom zasadu, odakle je izabran jedan izolat koji je prouzrokovao pojavu veoma jasnih simptoma na inokuliranim reznicama kupine potvrđujući tako svoju patogenost. Simptomi su se manifestovali u vidu tamnomrke nekroze koja se širila oko mesta inokulacije (Slika 21A-C). Centralni deo pege bio je prekriven piknidima u vidu sitnih plikova koji izdižu koru. U centralnom delu došlo je do jasnog izbeljivanja kore koja je dobila sivkasto-žutu boju (Slika 21A-C). Na kontrolnim reznicama nije došlo do razvoja simptoma (Slika 21D).

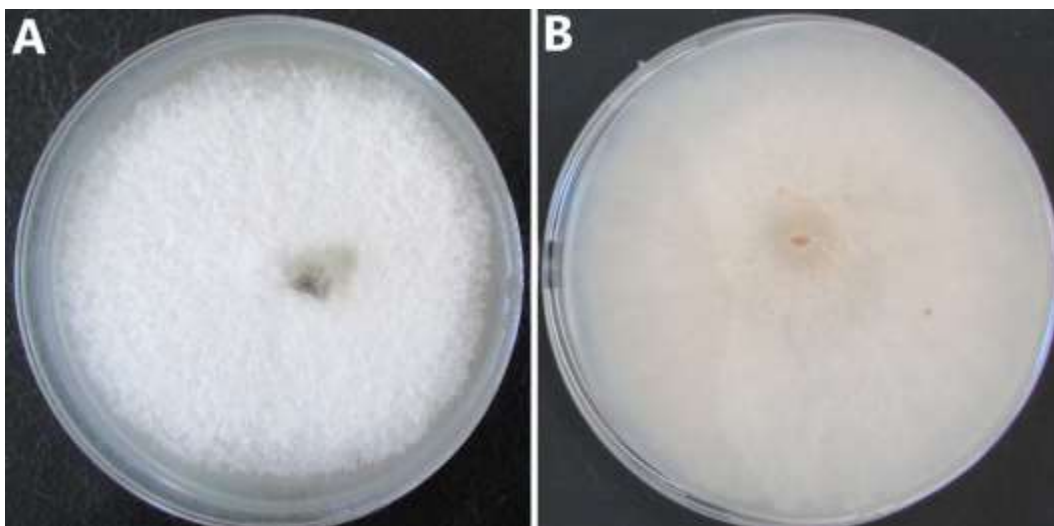


Slika 21. *Neofusicoccum parvum*: Provera patogenosti. A-C – nekroza, izbeljivanje kore i sporulacija patogena; D – negativna kontrola

5.4. Morfološka svojstva

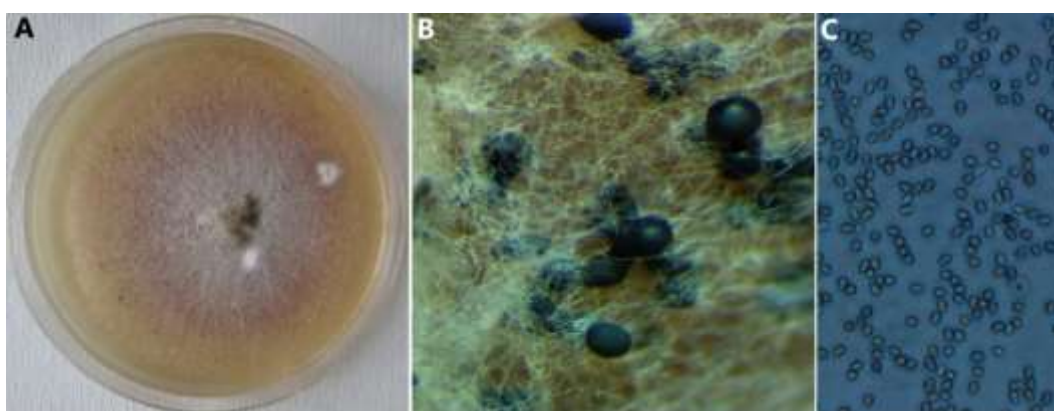
Tokom ovih istraživanja dobijeno je ukupno 468 izolata koji su ispoljili veliku raznovrsnost u makroskopskim i mikroskopskim morfološkim osobinama. Na osnovu ovih karakteristika izolati su grupisani prema zajedničkim osobinama u ukupno 10 morfoloških grupa (Tabela 8) koje su se međusobno jasno razlikovale i odgovarale su identifikovanim vrstama.

➤ *Paraconiothyrium fuckelii*. Odabranih 12 reprezentativnih izolata *P. fuckelii*, poreklom sa 12 lokaliteta (Tabela 8), formirali su na PDA pamučasto bele, brzorastuće kolonije. Vazdušasta micelija je umereno gusta do gusta, a obod kolonije ravan (Slika 22A-B). Prosečan dnevni porast 12 reprezentativnih izolata bio je 3,68 - 4,14 mm (prosečno 3,84 mm/dan). Razlike u prosečnom dnevnom porastu između izolata *P. fuckelii* nisu bile statistički značajne ($P > 0.05$).



Slika 22. *Paraconiothyrium fuckelii*: Izgled 10 dana stare kolonije na PDA podlozi.
A – lice kolonije; B – naličje kolonije

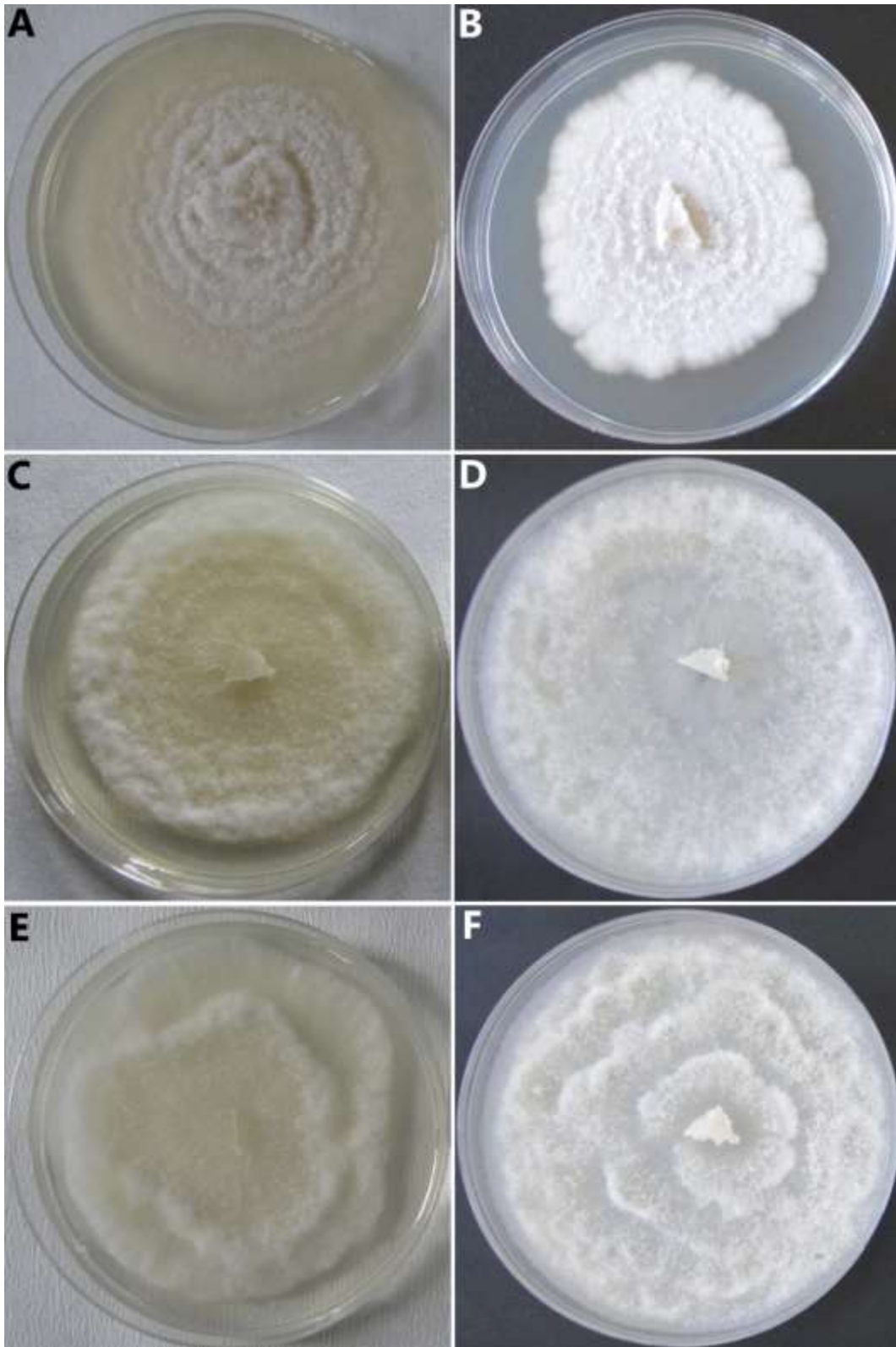
Većina ispitivanih izolata formirala je piknide na PDA 20 dana nakon zasejavanja (Slika 23A-B), a svi su sporulisali 40 dana od zasejavanja. Nakon sporulacije dolazi do pigmentacije podloge u svetlobraon boju (Slika 23A). Intenzitet sporulacije bio je umeren kod većine odabranih izolata. Piknidi su loptasti, crni, nepravilno raspoređeni po celoj površini kolonije, pojedinačno ili grupama (Slika 23B). Veličina piknida kretala se od 280 do 370 μm u prečniku, prosečno 335 μm . Unutar piknida formiraju se jednoćelijske, neseptirane, hijalinske, ovalne do ovoidne konidije, veličine 3 - 4,51 x 2,15 - 3,68 μm (prosečno 3,67 x 2,8 μm) (Slika 23C). Nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini piknida i konidija između ispitivanih izolata *P. fuckelii* ($P > 0.05$). Nijedan od ispitivanih izolata *P. fuckelii* nije formirao teleomorfnu stadijum na PDA podlozi čak ni posle 5 meseci gajenja.



Slika 23. *Paraconiothyrium fuckelii*: A – 20 dana stara kolonija na PDA podlozi;
B – piknidi; C – konidije

➤ ***Gnomoniopsis idaeicola***. Ispitivanih 11 izolata *G. idaeicola* poreklom sa 11 lokaliteta (Tabela 8) formirali su pamučaste, bele, brzorastuće kolonije na PDA podlozi. Obod kolonije bio je blago talasast, a vazдушna micelija bila je umereno obilna do obilna (Slika 24A-F). Prosečan porast 11 reprezentativnih izolata bio je 2,1 - 3,0 mm/dan (prosečno 2,66 mm/dan) (Tabela 11). Razlika u prosečnom dnevnom porastu između svih ispitivanih izolata nije bila statistički značajna ($P = 0.313$).

Deset dana posle zasejavanja ispitivani izolati mogli su se svrstati u tri grupe na osnovu tipa porasta. Prva grupa izolata (KKR7-16, KMI5-15, KVR2-14, i KZAI1-15) formirala je zonirane kolonije sa ujednačenom brzinom porasta od 2,6 - 2,8 mm/dan (Slika 24A-B). Druga grupa izolata (KDK28-16, KMS4-14, KRU9-15, i KSV1-16) formirala je kolonije sa ujednačenom kolonijom i dnevnom porastom od 2,1 - 3 mm/dan (Slika 24C-D), a treća grupa (KAR2-16, KNEI7-15, i KPK10-16) kolonije sa zoniranim porastom nalik na ružu sa prosečnim dnevnom porastom od 2,5 - 2,8 mm/dan (Slika 24E-F) (Tabela 11).



Slika 24. *Gnomoniopsis idaeicola*: 10 dana stare kolonije na PDA podlozi.
 A-B – zoniran tip porasta kolonija; C-D – ujednačen tip porasta kolonija;
 E-F – porast kolonija nalik na ružu

Intenzitet sporulacije na PDA je takođe karakteristika koja je bila varijabilna između različitih izolata vrste *G. idaeicola*. Nijedan od ispitivanih izolata nije sporulisao 10 dana posle zasejavanja, a većina ispitivanih izolata formirala je plodonosne tvorevine odnosno piknide 20 dana posle zasejavanja. Nakon sporulacije kolonije su menjale boju u bež do svetlobraon. Piknidi su se formirali u kulturama svih izolata 40 dana posle zasejavanja sa različitim intenzitetom. Na vrhovima većine piknida, 40 dana posle zasejavanja, došlo je do oslobađanja konidijske mase u vidu žućkaste sluzaste kapi.

Tabela 11. Porast, izgled kolonija i sporulacija izolata *Gnomoniopsis idaeicola* na PDA podlozi

Izolat	Lokalitet	Prosečan porast ^a	Izgled kolonija	Sporulacija <i>in vitro</i> ^b
KMI5-15	Miokus	2.8 A ^c	talasast	slaba
KRU9-15	Ruma	2.1 A	ravan	intenzivna
KZAI1-15	Zaječar	2.8 A	talasast	intenzivna
KPK10-16	Prokuplje	2.5 A	nalik na ružu	umerena
KNEI7-15	Negotin	2.6 A	nalik na ružu	intenzivna
KAR2-16	Arilje	2.8 A	nalik na ružu	slaba
KMS4-14	Mišar	2.7 A	ravan	slaba
KVR2-14	Vrbovac	2.6 A	talasast	umerena
KDK28-16	Donja Kamenica	3.0 A	ravan	slaba
KKR7-16	Kragujevac	2.6 A	talasast	intenzivna
KSV1-16	Svilajnac	2.8 A	ravan	umerena

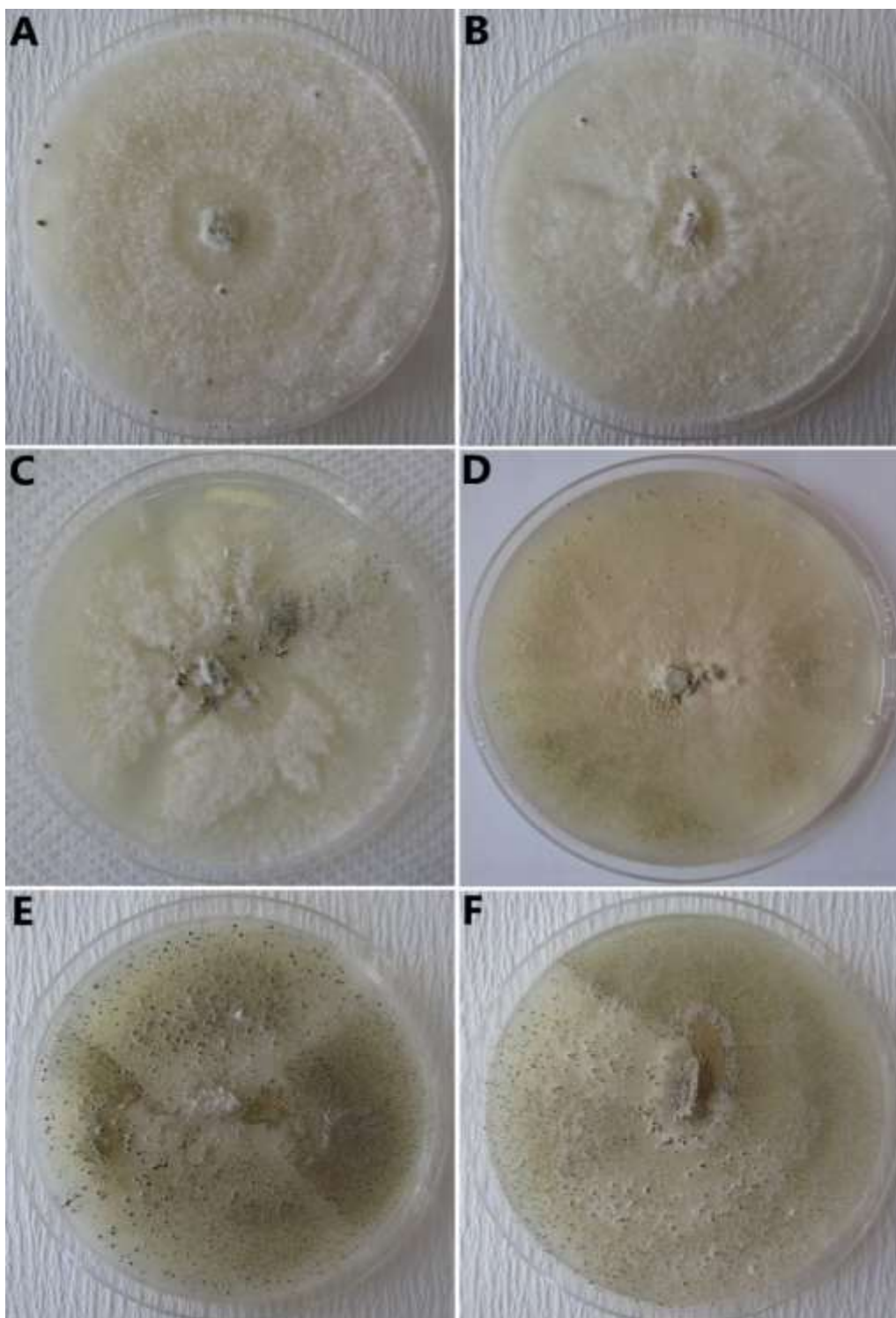
^aProsečan porast kolonija u mm na dan;

^bIntenzitet sporulacije procenjen na osnovu broja plodonosnih tvorevina formiranih na PDA podlozi 40 dana posle zasejavanja: intenzivna sporulacija – preko 100 plodonosnih tvorevina raspoređenih po celoj površini podloge; umerena sporulacija – do 100 plodonosnih tvorevina po koloniji; slaba sporulacija – nekoliko individualnih plodonosnih tvorevina po koloniji;

^cVrednosti obeležene istim slovom ne razlikuju se statistički značajno – $P > 0,05$.

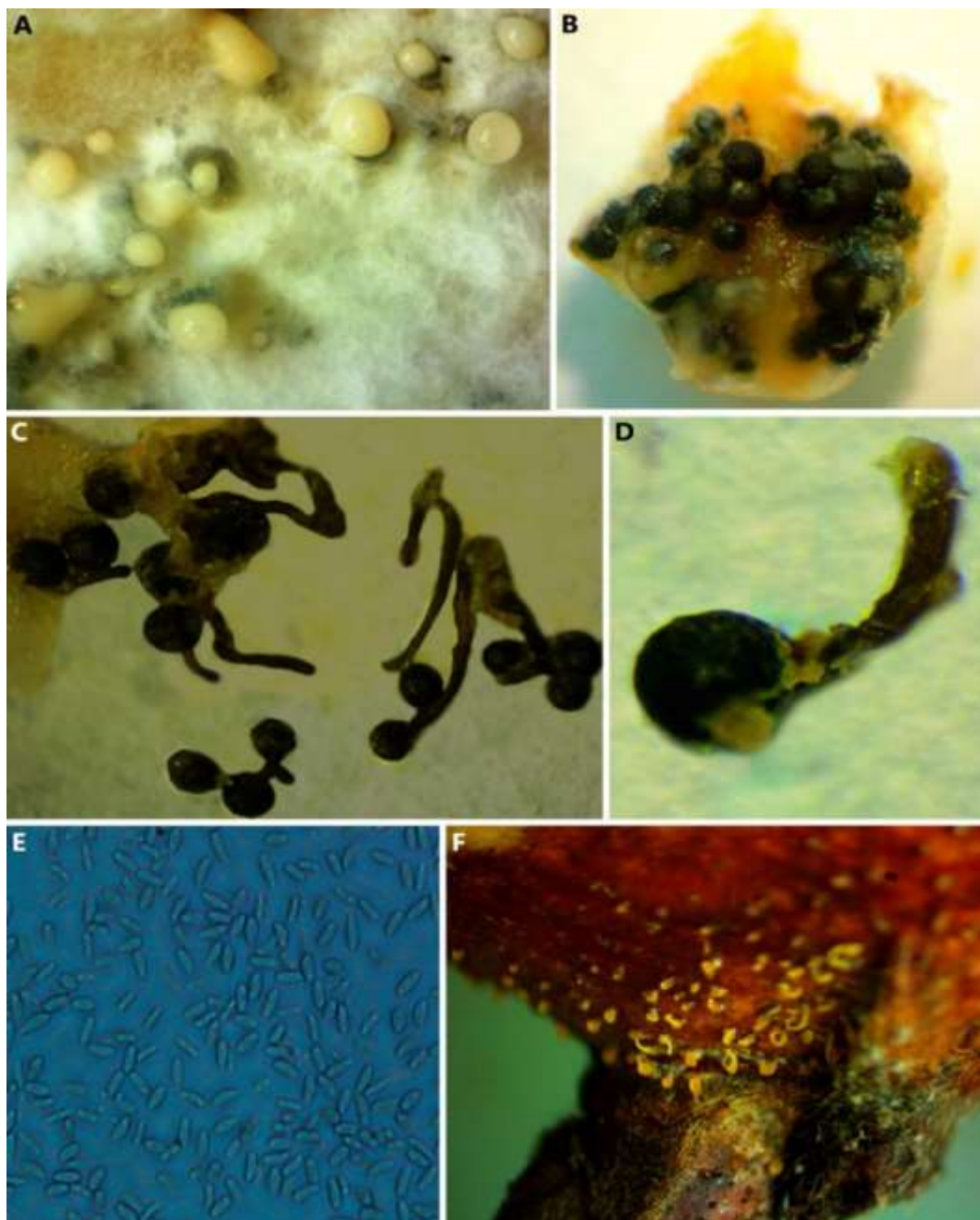
U odnosu na intenzitet sporulacije svi ispitivani izolati *G. idaeicola* svrstani su u tri grupe (Tabela 11). Prvu grupu čine izolati sa slabim intenzitetom sporulacije koji su formirali po nekoliko pojedinačnih plodonosnih tvorevina po koloniji. Druga grupa su izolati sa umerenim intenzitetom sporulacije koji su formirali do 100 plodonosnih tvorevina po koloniji, i treća grupa su izolati sa intenzivnom sporulacijom koji su formirali veliki broj (>100) plodonosnih tvorevina gusto raspoređenih po čitavoj površini kolonije. Slab intenzitet sporulacije zabeležen je kod izolata KMI5-15, KMS4-14, KDK28-16 i KAR2-16. Ovi izolati nisu sporulisali 20 dana posle zasejavanja već tek 40

dana posle zasejavanja došlo je do formiranja svega po nekoliko pojedinačnih plodonosnih tvorevina po koloniji (Slika 25A-B).



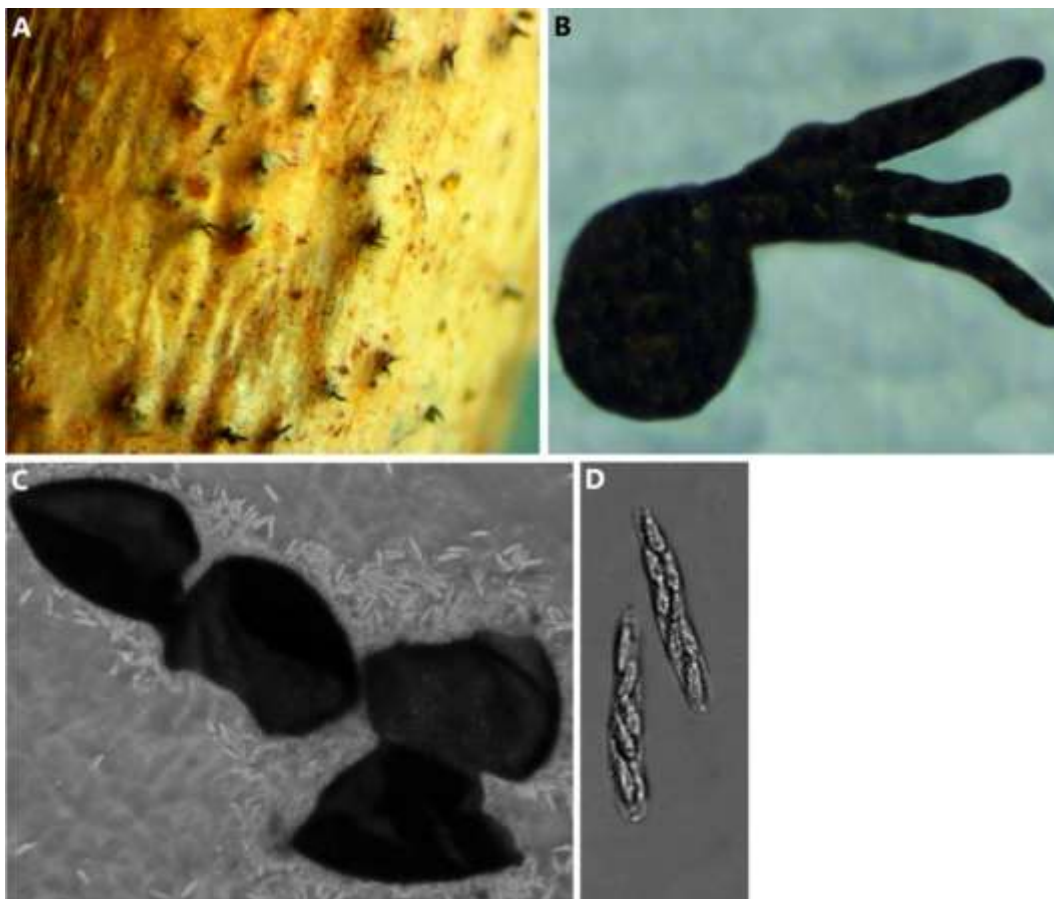
Slika 25. *Gnomoniopsis idaeicola*: Sporulacija *in vitro* na PDA podlozi 40 dana posle zasejavanja. A-B – slab intenzitet sporulacije (nekoliko individualnih plodonosnih tvorevina po koloniji); C-D – umeren intenzitet sporulacije (do 100 plodonosnih tvorevina po koloniji); E-F – jak intenzitet sporulacije (preko 100 plodonosnih tvorevina raspoređenih po celoj površini podloge)

Umeren intenzitet sporulacije ispoljili su izolati KVR2-14, KPK10-16 i KSV1-16, koji su formirali najviše 100 plodonosnih tvorevina nejednako raspoređenih po površini kolonije (Slika 25C-D). Izolati KRU9-15, KNEI7-15, KZAI1-15 i KKR7-16 obilno su sporulisali i formirali veliki broj (preko 100) plodonosnih tvorevina gusto raspoređenih po čitavoj površini kolonije. Plodonosne tvorevine su se formirale pojedinačno ili u grupama (Slika 25E-F).



Slika 26. *Gnomoniopsis idaeicola*: A – kapljice konidijske mase; B – piknidi u želatinoznoj masi; C – piknidi izdvojeni iz strome; D – pojedinačni piknid sa dugačkim vratom; E – konidije; F – piknidi u prirodno zaraženom stablu kupine

Ispitivani izolati *G. idaeicola* formirali su žućkastobraon stromatične tvorevine u kojima se nalazilo više uronjenih piknida iz kojih se oslobađa sluzasti matriks bež boje sa konidijama (Slika 26A). Stromatične tvorevine formirale su se pojedinačno ili u grupama (Slika 26A). U unutrašnjosti stromatičnih tvorevina formira se 3 - 50 piknida, okruglastog oblika (Slika 26B-D). Piknidi su prečnika od 125 do 250 μm , u proseku 193,82 μm , sa dugačkim vratom, 371 - 480 μm , prosečno 421,09 μm (Slika 26D). Konidijska masa oslobađa se iz vratova piknida u 20 - 40 dana starim kolonijama (Slika 26A). Konidije su jednoćelijske, hijalinske, elipsoidnog do vretenastog oblika, ponekad blago zakrivljene, veličine 4,5 - 7,25 x 2,15 - 3,02 μm (prosečno 5,84 x 2,55 μm) (Slika 26E). Nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini piknida ili piknospora 11 ispitivanih izolata *G. idaeicola* ($P > 0.05$). U prirodnim uslovima *G. idaeicola* formira piknide subepidermalno, a vrat piknida podiže i probija epidermis, dok se u vlažnim uslovima masa konidija oslobađa u vidu želatinozne crvolike mase (Slika 26F).

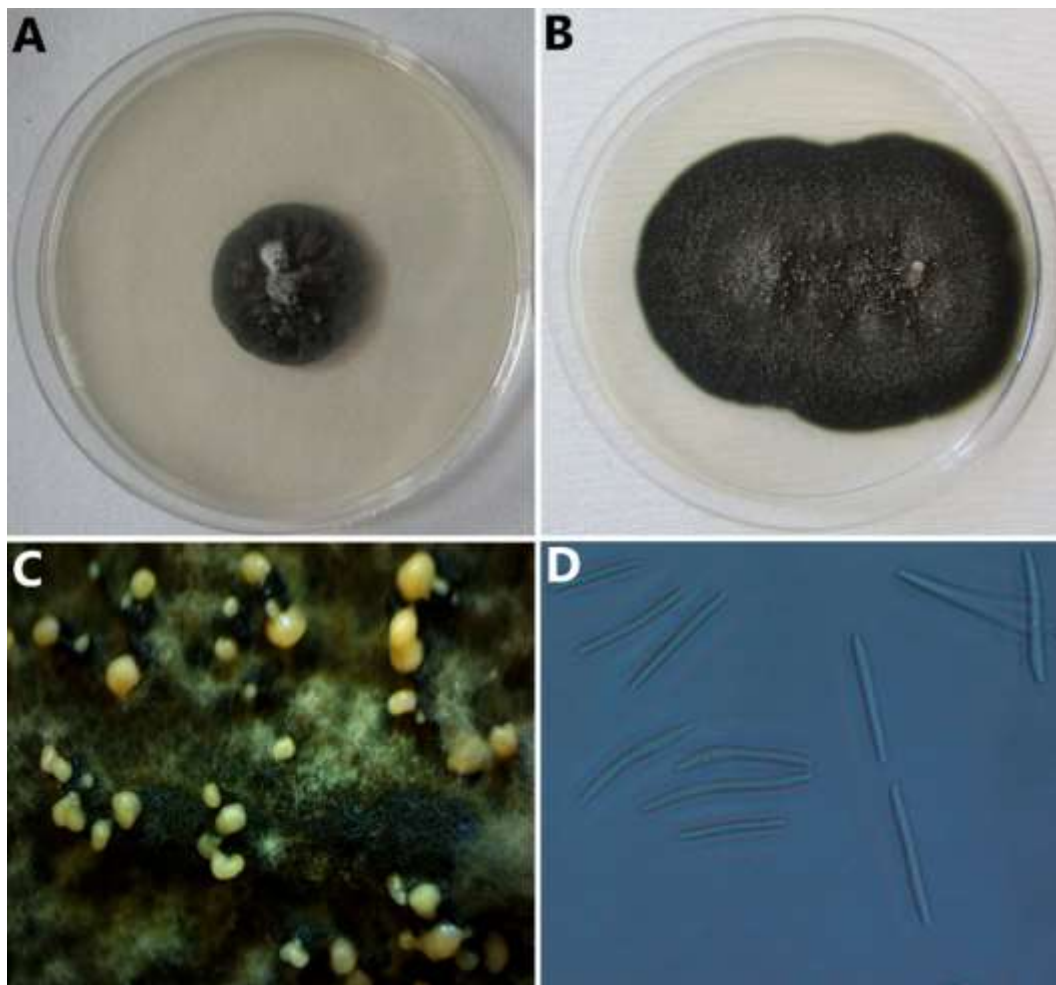


Slika 27. *Gnomoniopsis idaeicola*: A – peritecije u kori stabla; B – oslobodena peritecija sa razgranatim vratom; C – raspuknute peritecije sa oslobođenim askusima; D – askusi sa askosporama

Nijedan od ispitivanih izolata *G. idaeicola* nije formirao polne tvorevine na PDA podlozi, čak i posle više od 5 meseci gajenja. Morfologija teleomorfnog stadijuma ove vrste proučavana je direktno na biljkama kupine u zasadima u prirodnim uslovima. Tom prilikom polna faza gljive *G. idaeicola* pronađena je jedino na lokalitetu Miokus u zasadu sorte Čačanska bestrna, u stablima rodni izdanaka kupine (Slika 27A). Identitet patogena potvrđen je molekularno, sekvenciranjem ITS regiona rDNA. Peritecije se formiraju subepidermalno, brojne su, pojedinačne, crne boje, okruglastog tela (195 - 300 μm u prečniku, prosečno 275 μm), sa veoma razvijenim centralnim vratom koji se sekundarno grana (341 - 461 μm , prosečno 421 μm) (Slika 27B). Vrat peritecije izdiže i probija epidermis (Slika 27A). U peritecijama formiraju se brojni askusi (Slika 27C), koji su hijalinski, vretenasti (33 - 44,9 x 6,61 - 9,56 μm , prosečno 40,54 x 8,24 μm), i sadrže 6-8 hijalinskih, dvoćelijskih, ovalnih askospora (6,77 - 11,4 x 2,62 - 3,55 μm , prosečno 8,65 x 3,08 μm) (Slika 27D).

➤ ***Septoria* spp.** Ispitivani izolati *Septoria* spp. poreklom sa 11 lokaliteta (Tabela 8) formirali su uniformne spororastuće kolonije tamnozeleno, zeleno-maslinaste do zeleno-crne boje sa sivom nijansom u centralnom delu. Kolonije su bile ograničenog rasta, manje ili više ispupčene posebno u centralnom delu, sa naboranom površinom (Slika 28A-B). Tekstura površine je najčešće glatka kod mlađih kolonija dok je sam centralni deo kolonija pokriven vazdušnom micelijom sive boje čije se hife grupišu u loptaste strukture (Slika 28B-C). Takođe nije došlo do pigmentacije PDA podloge čak ni posle 5 meseci gajenja. Brzina porasta na PDA kretala se od 0,43 - 1,21 mm/dan (prosečno 0,66 mm/dan). Razlika u prosečnom dnevnom porastu između ispitivanih izolata nije bila statistički značajna ($P > 0.05$). Nijedan ispitivani izolat nije sporulisao 10 dana posle zasejavanja, ali su 20 dana posle zasejavanja svi izolati *Septoria* spp. sporulisali formirajući manje ili više brojne piknidijske plodonosne tvorevine, pre svega u centralnoj zoni kolonije. Iz piknida se oslobađa žućkasti eksudat u vidu kapljica u kojima se nalaze mnogobrojne konidije patogena (Slika 28C). Konidije su jednoćelijske, izdužene, cilindrične, hijalinske, prave ili blago povijene, zaobljene na krajevima, dimenzija 17,05 - 30,72 x 1,92 - 2,45 μm (prosečno 24,07 x 2,18 μm) (Slika 28D). Nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini piknida ili piknospora ispitivanih izolata *Septoria* spp. ($P >$

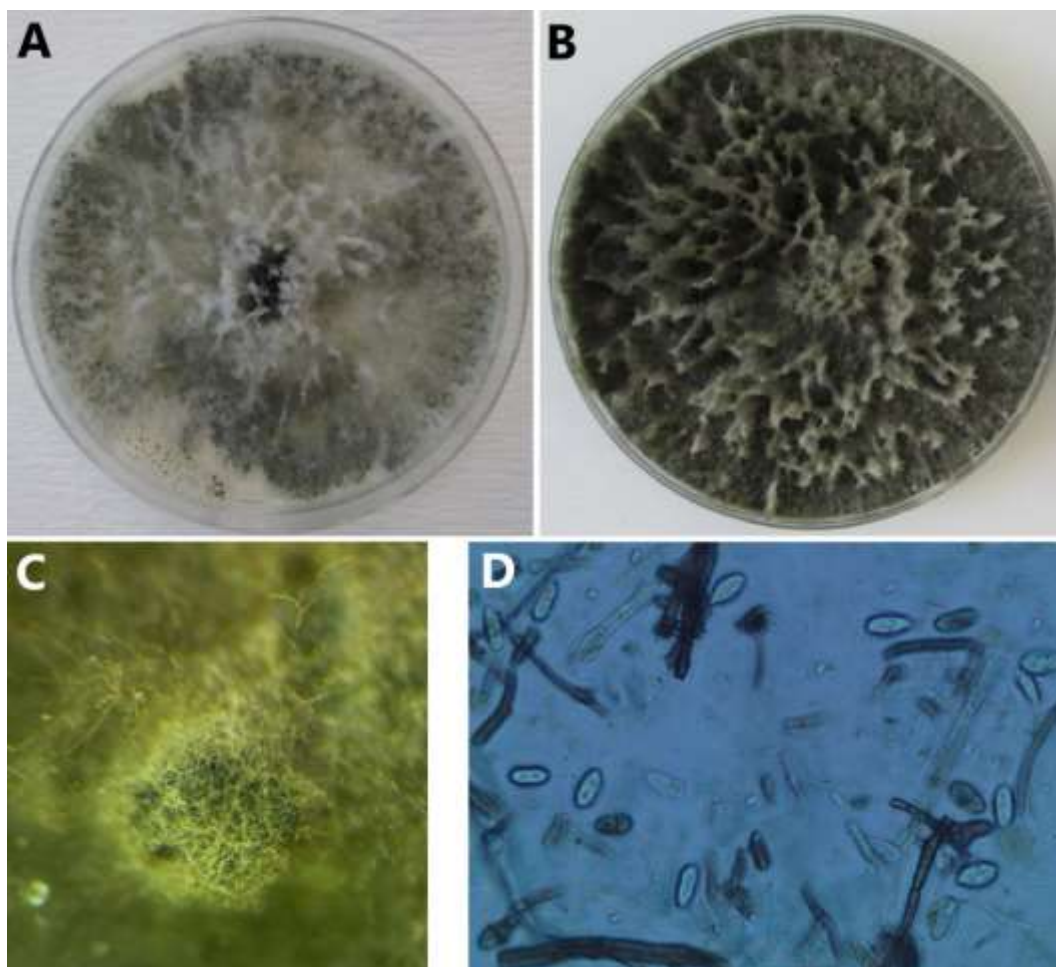
0.05). Nijedan od ispitivanih izolata *Septoria* spp. nije formirao teleomorfni stadijum na PDA podlozi ni posle 5 meseci gajenja.



Slika 28. *Septoria* spp.: A – 10 dana stara kolonija na PDA podlozi; B – 20 dana stara kolonija na PDA podlozi; C – piknidi; D – konidije

➤ ***Botryosphaeria dothidea*.** Svih 5 reprezentativnih izolata poreklom sa 5 lokaliteta (Tabela 8) obrazuju veoma gustu, vazдушnu, brzorastuću miceliju. U prvih nekoliko dana micelija je beličaste boje potom nakon 10 dana poprima svetlosivu, a 20 dana nakon zasejavanja tamnosivu boju (Slika 29A-B). Karakteristično je da micelija ispitivanih izolata formira grupisane hife vazdušne micelije koji se jasno izdižu od podloge pod pravim uglom (Slika 29A-B). Nakon 3 - 4 dana dolazi do pigmentacije podloge (počev od centralnog dela ka periferiji), koja 10 dana posle zasejavanja dobija zelenkastu do zelenkasto maslinastu, a 20 dana nakon zasejavanja dobija skoro crnu boju (Slika 29A-B). Prosečan porast svih reprezentativnih izolata bio je 7,42 - 8,42 mm/dan (prosečno 7,97 mm/dan). Razlika u prosečnom dnevnom porastu između svih ispitivanih izolata nije

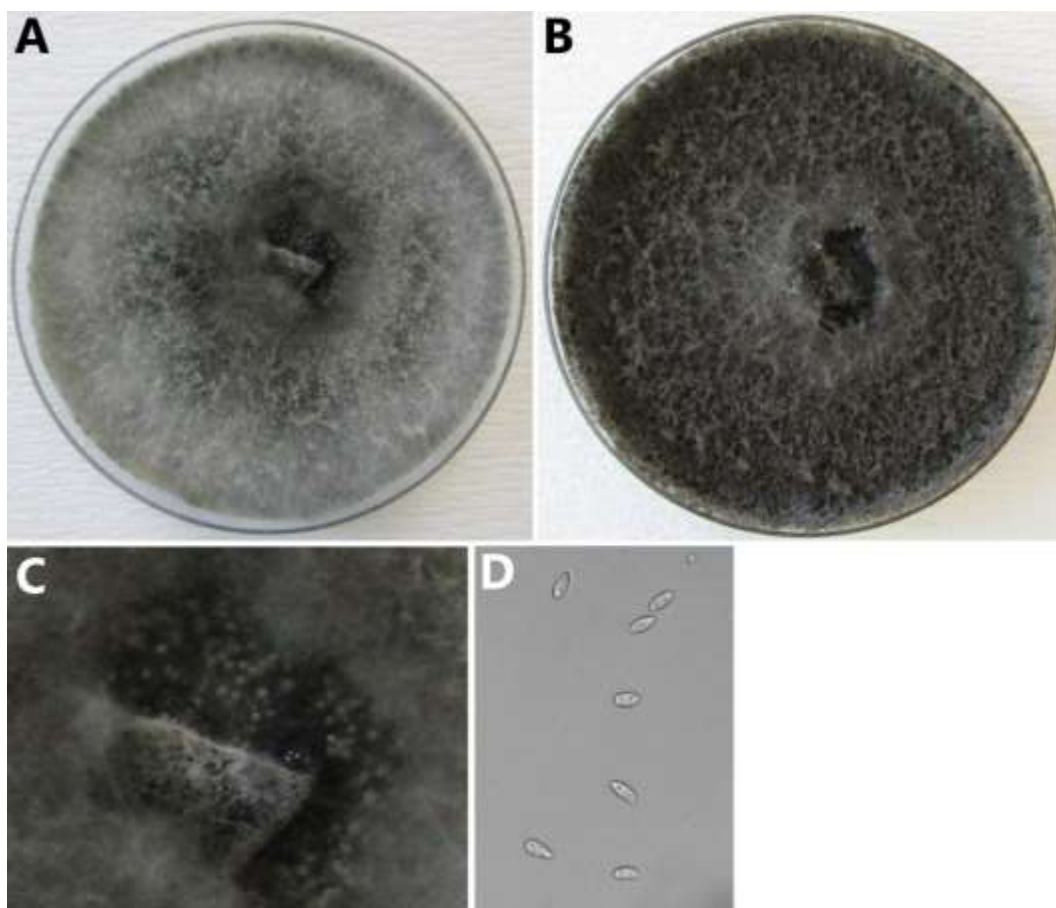
bila statistički značajna ($P > 0.05$). Nakon 20 dana od zasejavanja ispitivani izolati sporulisali su i formirali loptaste piknide, plodonosne tvorevine obrasle hifama sive boje (Slika 29C). Konidije su eliptične ili izduženo eliptične, jednoćelijske, hijalinske, dimenzija 13 - 25 x 5 - 8 μm (prosečno 16,3 x 7,09 μm) (Slika 29D). Nije utvrđena statistički značajna razlika u izgledu i veličini konidija ispitivanih izolata *B. dothidea* ($P > 0.05$). Nijedan od ispitivanih izolata *B. dothidea* nije formirao teleomorfni stadijum na PDA podlozi ni posle 5 meseci gajenja.



Slika 29. *Botryosphaeria dothidea*: A – 10 dana stara kolonija na PDA podlozi; B – 20 dana stara kolonija na PDA podlozi; C – piknidi; D – konidije

➤ ***Diplodia seriata***. Svih 4 ispitivanih izolata poreklom sa 4 lokaliteta (Tabela 8) obrazuju brzorastuću miceliju u početku beličaste boje koja 10 dana nakon zasejavanja dobija svetlosivu, a 20 dana posle zasejavanja tamnosivu boju (Slika 30A-B). Iako je kolonija slične boje kao kod *B. dothidea*, izolati *D. seriata* formiraju ređu vazdušastu miceliju sa slabije izraženim udruživanjem hifa. Nakon 3-4 dana od zasejavanja dolazi do pigmentacije podloge koja 10 dana posle zasejavanja dobija mrku, a 20 dana posle

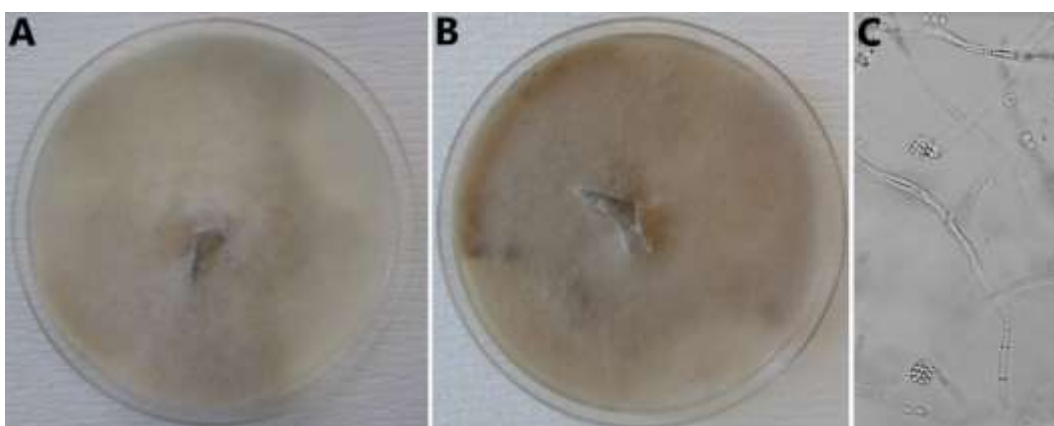
zasejavanja crnu boju (Slika 30B). Prosečan porast svih reprezentativnih izolata bio je 7,14 - 8,2 mm/dan (prosečno 7,81 mm/dan). Porast je bio ujednačen kod svih izolata. Ispitivani izolati su sporulisali 20 dana posle zasejavanja i formirali loptaste piknide obrasle hifama sive boje (Slika 30C). Konidije su bile eliptične, jednoćelijske, dimenzija 15,64 - 24,73 x 7,55 - 19,62 μm (prosečno 18,34 x 9,21 μm) (Slika 30D). Konidije su bile u početku hijalinske dok zrele konidije dobijaju braon boju što je, osim razlike u izgledu kultura, drugi morfološki taksonomski karakter po kome se ove dve vrste mogu razlikovati. Nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini i izgledu konidija ispitivanih izolata *D. seriata* ($P > 0.05$). Nijedan od ispitivanih izolata *D. seriata* nije formirao teleomorfni stadijum na PDA podlozi ni posle 5 meseci gajenja.



Slika 30. *Diplodia seriata*; A – 10 dana stara kolonija na PDA podlozi; B – 20 dana stara kolonija na PDA podlozi; C – piknidi; D – konidije

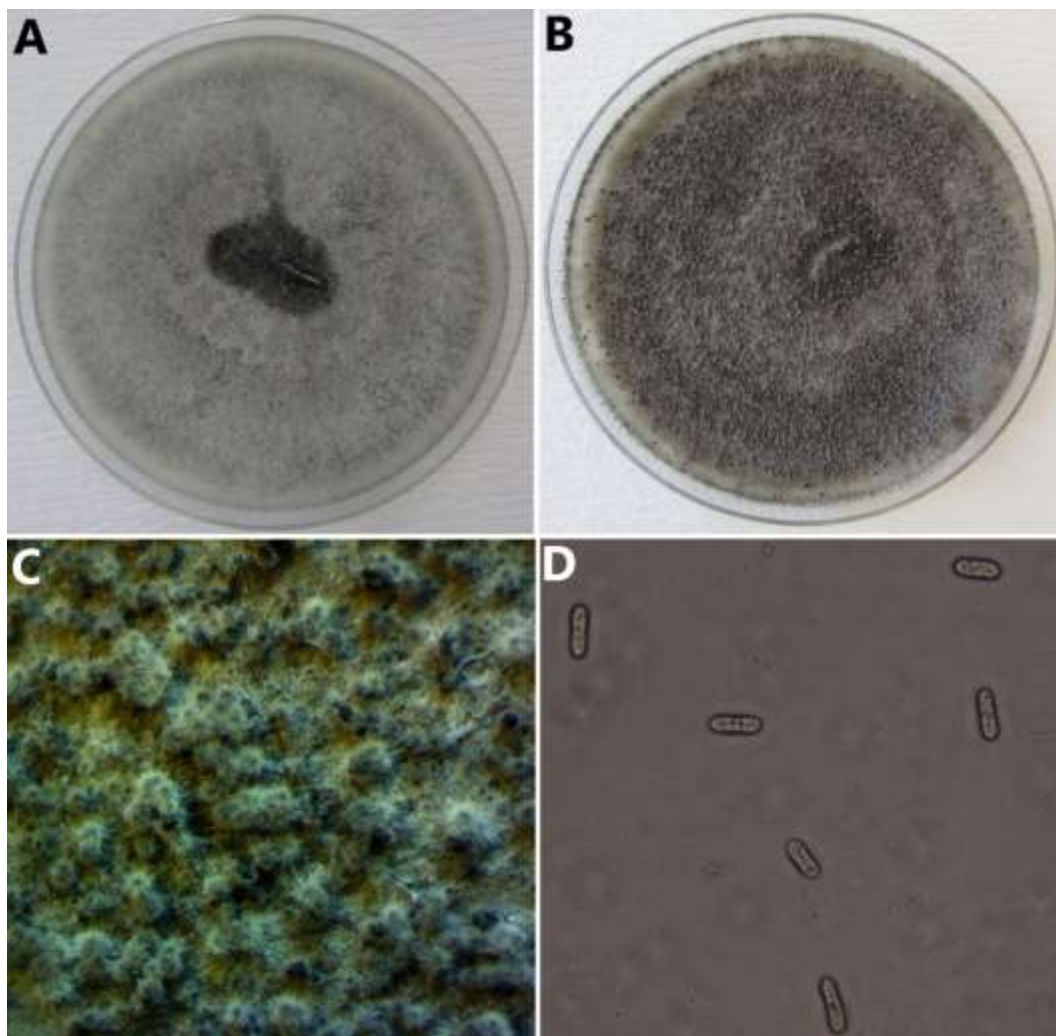
➤ ***Botrytis cinerea*.** Odabrani izolati *Botrytis cinerea* poreklom sa 3 lokaliteta (Tabela 8) formirali su svetlosivu do sivu, brzorastuću, gustu, vunastu miceliju na PDA podlozi 10 dana posle zasejavanja (Slika 31A). Prosečan porast 3 reprezentativna izolata bio je 7,43 - 8,57 mm/dan (prosečno 8,02 mm/dan). Razlika u prosečnom dnevnom porastu između

ispitivanih izolata nije bila statistički značajna ($P > 0.05$). Vremenom kolonije dobijaju tamnosivu boju (Slika 31B). Ispitivani izolati nisu formirali sklerocije ni 40 dana posle zasejavanja. Konidiofore su hijalinske, septirane, sužavaju se od osnove ka vrhu, razgranate u vršnom delu, dužine od 850 - 1821 (prosečno 1218 μm). Konidije su jednoćelijske, hijalinske, okruglaste prečnika 3,04 - 4,18 μm (prosečno 3,68 μm) (Slika 31C). Nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini konidiofora i konidija ispitivanih izolata *B. cinerea* ($P > 0.05$). Nijedan od ispitivanih izolata *B. cinerea* nije formirao teleomorfni stadijum na PDA podlozi ni posle 5 meseci gajenja. Navedene morfološke osobine odgovaraju vrsti *B. cinerea*.



Slika 31. *Botrytis cinerea*: A – 10 dana stara kolonija na PDA podlozi; B – 20 dana stara kolonija na PDA podlozi; C – konidije.

➤ *Colletotrichum kahawae*. Tri ispitivana izolata poreklom sa 3 lokaliteta (Tabela 8) ispoljili su uniformne morfološke osobine i formirali sive, brzorastuće kolonije na PDA podlozi. Obod kolonije bio je ravan (Slika 32A). Prosečan porast 3 reprezentativna izolata bio je 7 - 7,57 mm/dan (prosečno 7,31 mm/dan). Razlika u prosečnom dnevnom porastu nije bila statistički značajna ($P > 0.05$). Svi izolati imali su ravan tip porasta kolonija.

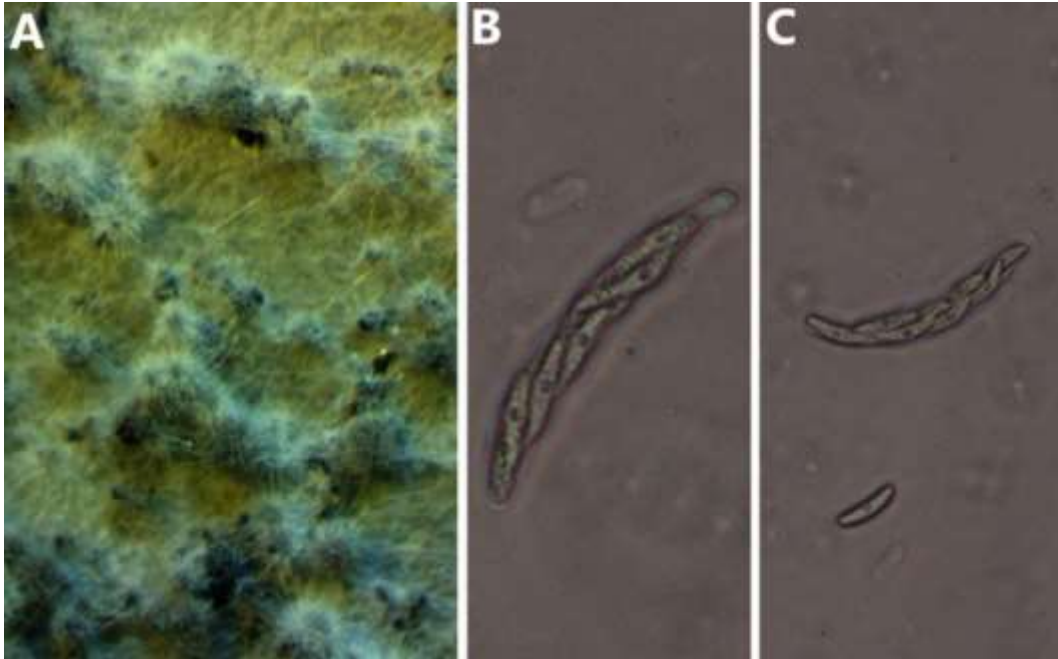


Slika 32. *Colletotrichum kahawae*: A – 10 dana stara kolonija na PDA podlozi; B – 20 dana stara kolonija na PDA podlozi; C – acervule; D – konidije

Nijedan od ispitivanih izolata nije sporulisao 10 dana posle zasejavanja dok su 20 dana posle zasejavanja svi ispitivani izolati formirali brojne acervule na PDA (Slika 32B) po čitavoj površini podloge i u njima su se u sluzastoj masi oslobađale brojne konidije (Slika 32B-C). Nije zabeleženo prisustvo seta. Konidije su bile jednoćelijske, hijalinske, cilindričnog oblika sa zaobljenim krajevima, dimenzija 14 - 21 x 6 - 7 μm (prosečno 16,37 x 6,25 μm) (Slika 32D). Ispitivani izolati *C. kahawae* nisu se statistički razlikovali u pogledu veličine konidija ($P > 0.05$).

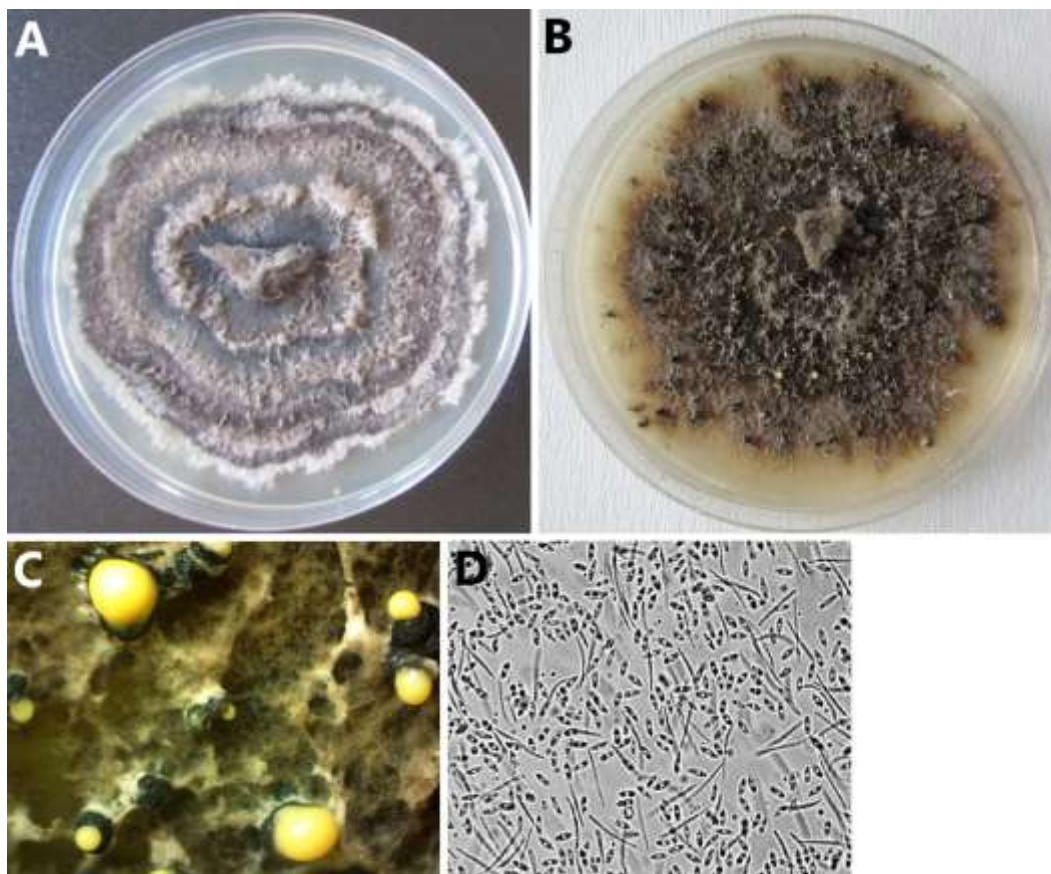
Jedan od 3 odabrana izolata *C. kahawae*, KCA5-16, poreklom sa lokaliteta Čačak sa sorte Loch Ness formirao je teleomorfni stadijum na PDA podlozi 10 dana posle zasejavanja. Peritecije su se formirale kao okruglaste plodnosne tvorevine crne boje, obrasle sivim dlačicama (Slika 33A). Askusi su hijalinski, vretenasti dimenzija 70,2 -

91,6 x 8,2 - 11,4 μm , prosečno 80,6 x 10,4 μm (Slika 33B-C). Askusi sadrže 7 - 8 jednoćelijskih, hijalinskih, vretenastih askospora veličine 19,5 - 22,8 x 5,2 - 6,3 μm , prosečno 21,3 x 5,7 μm (Slika 33C).



Slika 33. *Colletotrichum kahawae*. A – plodnosne tvorevine; B-C – Askusi sa askosporama

➤ ***Diaporthe betulae***. Dva odabrana reprezentativna izolata poreklom sa 2 lokaliteta (Tabela 8) ispoljila su uniformne morfološke osobine. Ispitivani izolati formirali su vazдушnu miceliju u početku beličaste boje da bi 10 dana po zasejavanju kolonija dobila i nijanse braon boje praćene braon pigmentacijom podloge (Slika 34A). Kolonija je ispoljila zonirani porast sa neravnim ivicama (Slika 34A). Posle 20 dana od zasejavanja došlo je i do promene u izgledu kolonija usled jake pigmentacije podloge koja je dobila tamnobraon boju (Slika 34B). Ispitivani izolati sporulisali su 20 dana posle zasejavanja i formirali piknide iz kojih su se oslobađale žućkaste kapi eksudata (Slika 34B-C).

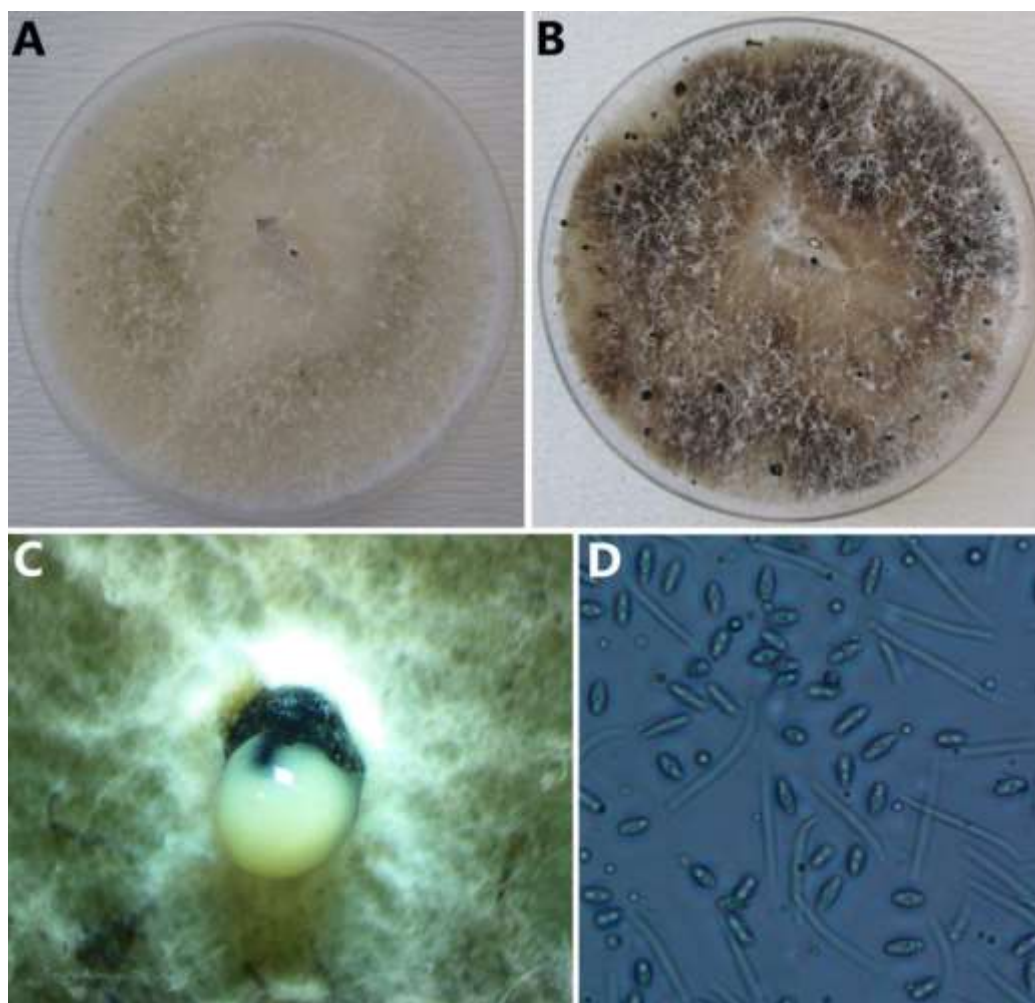


Slika 34. *Diaporthe betulae*: A – 10 dana stara kolonija na PDA podlozi; B – 20 dana stara kolonija na PDA podlozi; C – piknidi; D – α i β konidije

U eksudatu nalaze se mnogobrojne α i β konidije. Alfa konidije su jednoćelijske, hijalinske, izduženo elipsaste, zaobljenih krajeva sa po dve uljane kapi, veličine 6,0 - 9,25 x 2,24 - 3,47 μm (prosečno 7,73 x 2,96 μm) (Slika 34D). Beta konidije su jednoćelijske, hijalinske, končaste, veličine 19,35 - 27,54 x 1,29 - 2,19 μm (prosečno 23,54 x 1,72 μm) (Slika 34D). Nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini i izgledu alfa i beta konidija ispitivanih izolata *D. betulae* ($P > 0.05$). Nijedan od ispitivanih izolata *D. betulae* nije formirao teleomorfni stadijum na PDA podlozi ni posle 5 meseci gajenja.

➤ ***Diaporthe eres*.** Jedan ispitivani izolat poreklom sa lokaliteta Dragojevac iz zasada sorte Čačanska bestrna (Tabela 8) formirao je belu, vazдушnu, brzorastuću, umereno gustu koloniju sa ravnim obodom na PDA (Slika 35A). Prosečan dnevni porast bio je 5,38 mm/dan. Deset dana posle zasejavanja došlo je do početka sporulacije, formirali su se malobrojni, sitni pojedinačni piknidi (Slika 35A). Ispitivani izolat obilno je sporulisao na PDA podlozi 20 dana posle zasejavanja u vidu mnogobrojnih piknida iz kojih su se

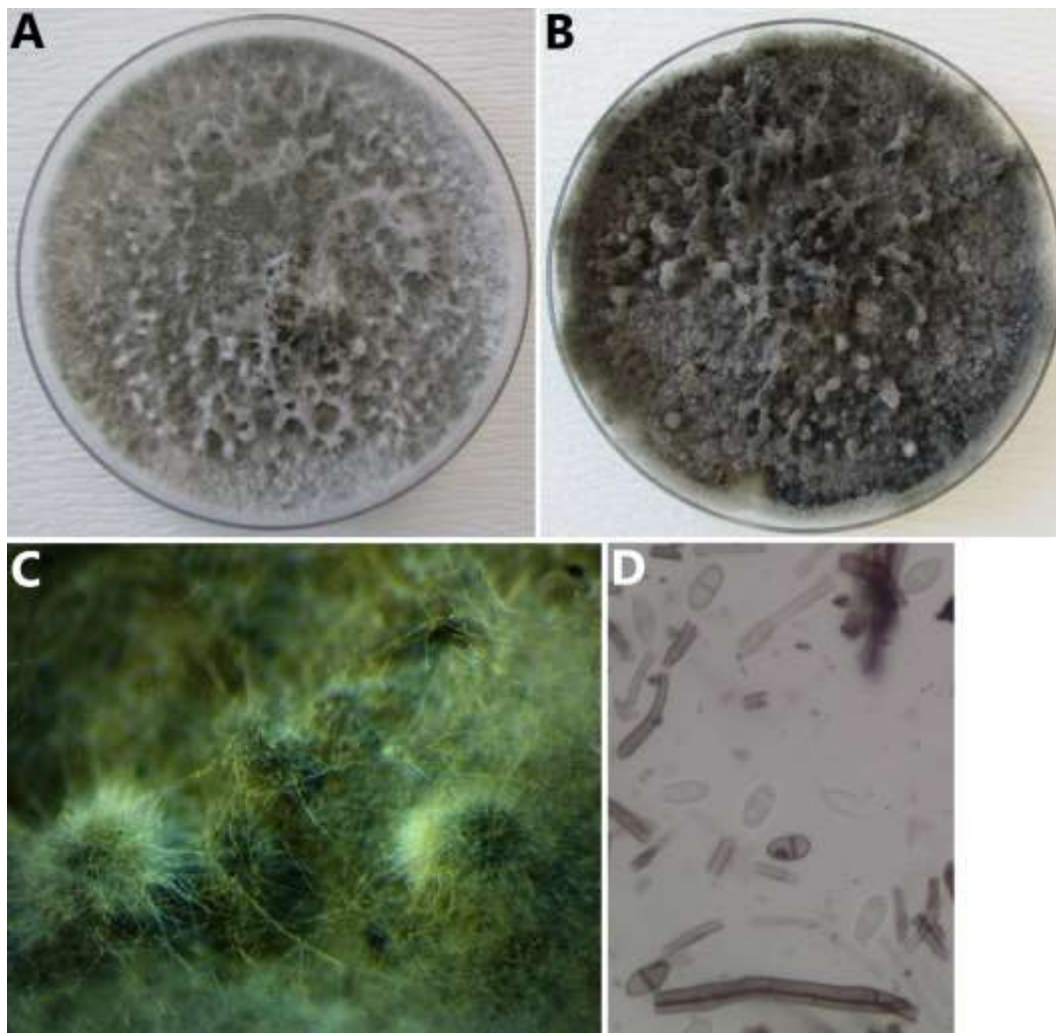
oslobađale žućkaste kapi eksudata (Slika 35B-C). Posle 20 dana od zasejavanja došlo je i do promene u izgledu kolonija usled pigmentacije podloge koja je dobila tamnobraon boju (Slika 35B). U eksudatu nalaze se mnogobrojne α i β konidije (Slika 35B). Alfa konidije su jednoćelijske, hijalinske, izduženo elipsaste, zaobljenih krajeva sa po dve uljane kapi, veličine 6,07 - 9,71 x 2,4 - 3,47 μm (prosečno 7,71 x 3,05 μm) (Slika 35D). Beta konidije su jednoćelijske, hijalinske, končaste, veličine 16,16 - 30,88 x 1,08 - 2,29 μm (prosečno 19,97 x 1,67 μm) (Slika 35D). Ispitivani izolat *D. eres* nije formirao teleomorfni stadijum na PDA podlozi ni posle 5 meseci gajenja.



Slika 35. *Diaporthe eres*: A – 10 dana stara kolonija na PDA podlozi; B – 20 dana stara kolonija na PDA podlozi; C – piknidi; D – α i β konidije

➤ *Neofusicoccum parvum*. Jedan izolat *N. parvum* (KZAI13-15) poreklom sa lokaliteta Zaječar iz zasada sorte Čačanska bestrna (Tabela 8), odabran je za detaljnu morfološku karakterizaciju. Ispitivani izolat obrazuje gustu, vazdušnu, brzorastuću miceliju koja 10 dana nakon zasejavanja dobija sivo-beličastu (Slika 36A), a 20 dana posle zasejavanja

tamnosivu boju (Slika 36B). Karakteristično je da micelija formira grupisane hife vazdušne micelije koji se izdižu od podloge (Slika 36A-B). Posle 3-4 dana javlja se pigmentacija podloge počev od centralnog dela ka periferiji.



Slika 36. *Neofusicoccum parvum*. A – 10 dana stara kolonija na PDA podlozi; B – 20 dana stara kolonija na PDA podlozi; C – konidiomate; D – konidije

Nakon 10 dana od zasejavanja podloga menja boju u tamnozelenu (Slika 36A), a 20 dana posle zasejavanja postaje potpuno crna (Slika 36B). Prosečan dnevni porast bio je 7,95 mm/dan. Nakon 20 dana od zasejavanja ispitivani izolat formirao je loptaste piknidijske plodnosne tvorevine crne boje obrasle sivim dlačicama (Slika 36C). Konidije su eliptične ili jajaste, svetlobraon boje i formiraju jednu septu, dimenzija 12,03 - 19,02 x 6,16 - 8,17 μm (prosečno 14,13 x 7,08 μm) (Slika 36D). Navedene morfološke osobine odgovaraju vrsti *N. parvum*. Ispitivani izolat *N. parvum* nije formirao teleomorfni stadijum na PDA podlozi ni posle 5 meseci gajenja.

5.5. Molekularna identifikacija i karakterizacija

Primenom metode lančane reakcije polimeraze uspešno su amplifikovani ciljani fragmenti molekula DNA svih odabranih izolata. Korišćenjem odgovarajućih parova prajmera amplifikovani su ITS region rDNA, TEF-1 α , TUB, i FG1093. Sekvence amplifikovanih fragmenata korišćene su za molekularnu identifikaciju i karakterizaciju ispitivanih izolata. Potvrda morfološke identifikacije obavljena je sekvenciranjem ITS regiona rDNA najmanje jednog izolata iz svake morfološke grupe iz svakog zasada. U toku ovog ispitivanja ukupno je generisano 73 različite sekvence poreklom od odabranih izolata svih 10 morfoloških grupa i različitih genskih regiona (ITS region rDNA, TEF-1 α , TUB, i FG1093). Uspešnom amplifikacijom i sekvenciranjem, kao i analizom homologije dobijenih nukleotidnih sekvenci uspešno je izvršena molekularna identifikacija ukupno 18 izolata *Paraconiothyrium fuckelii*, 18 izolata *Gnomoniopsis idaeicola*, 12 izolata *Septoria* spp., 5 izolata *Botryosphaeria dothidea*, 4 izolata *Diplodia seriata*, 5 izolata *Botrytis cinerea*, 5 izolata *Colletotrichum kahawae*, 2 izolata *Diaporthe betulae*, 3 izolata *Diaporthe eres* i 1 izolata *Neofusicoccum parvum* (Tabela 12).

Odabranih 11 izolata *G. idaeicola* (KMS4-14, KVR2-14, KRU9-15, KNEI7-15, KZAI1-15, KMI5-15, KDK28-16, KPK10-16, KAR2-16, KKR7-16, KSV1-16) (Tabela 12), molekularno je identifikovano i analiziranjem homologije nukleotidnih sekvenci TEF-1 α , TUB, i FG1093 gena.

Tabela 12. Pregled sekvenci ispitivanih izolata dobijenih u ovom radu

Oznaka izolata	Vrsta	GenBank pristupni broj			
		ITS	β -tubulin	tef-1 α	FG1093
KLE3-13	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052683	/	/	/
KLE10-13	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052684	/	/	/
KLE14-13	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052685	/	/	/
KDR2-13	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052686	/	/	/
KDR9-13	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052688	/	/	/
KDR10-13	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052687	/	/	/
KMS8-14	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052689	/	/	/
KMI7-15	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052690	/	/	/
KBOI7-16	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052692	/	/	/
KZAI1-15	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052691	/	/	/
KBOI3-16	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052693	/	/	/
KDK19-16	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052694	/	/	/
KME3-16	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052695	/	/	/
KPK3-16	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052696	/	/	/

KAR1-16	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052697	/	/	/
KBR2-16	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052698	/	/	/
KBR17-16	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052699	/	/	/
KKR5-16	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	MK052700	/	/	/
KMS4-14	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537338	MG860499	MG755816	MG860489
KVR2-14	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537339	MG860500	MG773585	MG860490
KRU9-15	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537340	MG860501	MG773586	MG860491
KNEI7-15	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537341	MG860502	MG773587	MG860492
KZAI1-15	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537342	MG860503	MG773588	MG860493
KMI5-15	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537337	MG860504	MG773589	MG860494
KDK28-16	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537333	MG860505	MG773590	MG860495
KPK10-16	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537334	MG860506	MG773591	MG860496
KAR2-16	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537335	MG860507	MG773592	MG860497
KKR7-16	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MF537336	MG860508	MG773593	MG860498
KSV1-16	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MG878401	MG878402	MG878403	MG878404
KMS2-14	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MG893859	/	/	/
KMS6-14	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MG893860	/	/	/
KMS12-14	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MG893861	/	/	/
KVR1-14	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MG893862	/	/	/
KMI8-15	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MG893863	/	/	/
KRU7-15	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MG893864	/	/	/
KZAI13-15	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	MG893865	/	/	/
KNEI1-15	<i>Septoria</i> spp.	MK015608	/	/	/
KNEI4-15	<i>Septoria</i> spp.	MK015609	/	/	/
KBOI1-16	<i>Septoria</i> spp.	MK015607	/	/	/
KKZ1-16	<i>Septoria</i> spp.	MK015610	/	/	/
KDK4-16	<i>Septoria</i> spp.	MK015611	/	/	/
KPK5-16	<i>Septoria</i> spp.	MK015612	/	/	/
KBR14-16	<i>Septoria</i> spp.	MK015613	/	/	/
KIV6-16	<i>Septoria</i> spp.	MK015614	/	/	/
KIV7-16	<i>Septoria</i> spp.	MK015615	/	/	/
KCA1-16	<i>Septoria</i> spp.	MK015616	/	/	/
KME7-16	<i>Septoria</i> spp.	MK069590	/	/	/
KME19-16	<i>Septoria</i> spp.	MK015617	/	/	/
KDR12-13	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MH992666	/	/	/
KMI3-15	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MH992668	/	/	/
KRU15-15	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MH992669	/	/	/
KDK29-16	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MH992665	/	/	/
KKR1-16	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MH992667	/	/	/
KMI4-15	<i>Diplodia seriata</i>	MK012552	/	/	/
KDO7-15	<i>Diplodia seriata</i>	MK012551	/	/	/
KNEI1-15	<i>Diplodia seriata</i>	MK012553	/	/	/
KBOI1-16	<i>Diplodia seriata</i>	MK012550	/	/	/
KDO2-15	<i>Botrytis cinerea</i>	MH997908	/	/	/
KDO4-15	<i>Botrytis cinerea</i>	MH997909	/	/	/
KDO9-15	<i>Botrytis cinerea</i>	MH997910	/	/	/
KRU14-15	<i>Botrytis cinerea</i>	MH997911	/	/	/
KBR13-16	<i>Botrytis cinerea</i>	MH997907	/	/	/

KDR1-13	<i>Colletotrichum kahawae</i>	MK002874	/	/	/
KDR8-13	<i>Colletotrichum kahawae</i>	MK002875	/	/	/
KDR17-13	<i>Colletotrichum kahawae</i>	MK002876	/	/	/
KCA5-16	<i>Colletotrichum kahawae</i>	MK002873	/	/	/
KKR14-16	<i>Colletotrichum kahawae</i>	MK002877	/	/	/
KMS7-14	<i>Diaporthe betulae</i>	MK012548	/	/	/
KNEIII3-15	<i>Diaporthe betulae</i>	MK012549	/	/	/
KDR3-13	<i>Diaporthe eres</i>	MK012545	/	/	/
KDR21-13	<i>Diaporthe eres</i>	MK012546	/	/	/
KDR22-13	<i>Diaporthe eres</i>	MK012547	/	/	/
KZAI3-15	<i>Neofusicoccum parvum</i>	MH988433	/	/	/

/ – nije sekvencionirano

➤ ***Paraconiothyrium fuckelii***. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA 18 ispitivanih izolata *P. fuckelii* (Tabela 12) potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije. Poređenjem svih 18 ITS sekvenci rDNA (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 602 karaktera) ispitivanih izolata *P. fuckelii* utvrđen je visok stepen međusobne nukleotidne sličnosti (99,3 – 100 %, do 4 bp razlike). Ispitivani izolati *P. fuckelii* iz Srbije ispoljili su visoku nukleotidnu identičnost od 99 – 100% (86 do 100% pokrivenosti) sa 15 sekvenci *P. fuckelii* dostupnim u GenBank bazi podataka, poreklom iz Nemačke (JX496104), Italije (KX009437, JX496096, i KC339222), Danske (JX496098), Holandije (JX496113 i JX496112), Velike Britanije (KT876505), Švedske (FJ228185), Letonije (JF340287), Tajlanda (KJ939278), Kine (JX522477), Južne Koreje (JN017200), SAD (LT796857) i Meksika (AY904055) sa *Picea abies*, *Rosa* sp., *Posidonia oceanica*, *Rubus* sp., *Fraxinus excelsior*, *Alnus glutinosa* i jagode. Takođe ustanovljena je visoka nukleotidna identičnost od 99,6% sa jedinom raspoloživom sekvencom *P. fuckelii* u Qbank bazi podataka poreklom iz Danske (CBS 797.95) sa *Rubus* sp., kao i sa 4 sekvence *P. fuckelii* dostupne u Boldsystems bazi podataka (99-100% identičnosti).

➤ ***Gnomoniopsis idaeicola***. Analiza homologije nukleotidnih sekvenci sva četiri genska regiona (ITS, β -tubulin, tef-1 α i FG1093) potvrdila je rezultate konvencionalne identifikacije odabranih izolata *G. idaeicola*. Poređenjem svih 18 ITS sekvenci rDNA ispitivanih izolata *G. idaeicola* (Tabela 12) (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 604 karaktera) utvrđen je visok stepen međusobne nukleotidne sličnosti (99,3 – 100 %, do 4 bp razlike). Analizom homologije nukleotidnih sekvenci

ITS regiona rDNA svih ispitivanih izolata *G. idaeicola* utvrđena je visoka nukleotidna identičnost sa sekvencama izolata *G. idaeicola* dostupnim u GenBank bazi podataka i to dva izolata sa kivija iz Novog Zelanda (KC145872 i KC145891), dva izolata sa *Rubus* iz Francuske (KT692597 i NR145281) i jednim izolatom sa lišća *Myrtus communis* iz Španije (KC959208). Visoka nukleotidna identičnost (100%) ispitivanih izolata *G. idaeicola* utvrđena je i sa 3 sekvence (KC145891, KC145872, GU320820) dostupne u Boldsystems bazi podataka poreklom iz Novog Zelanda i Francuske sa *Actinidia deliciosa*, *Rubus fruticosus* i *Rubus* sp. U Qbank bazi podataka još uvek nema raspoloživih sekvenci *G. idaeicola* za poređenje.

Poređenjem sekvenci gena za β -tubulin svih 11 ispitivanih izolata *G. idaeicola* (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 721 karakter) utvrđen je visok stepen međusobne nukleotidne sličnosti (98,9 – 100%, do 8 bp razlike). Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata utvrđena je visoka nukleotidna identičnost od 98 do 100% sa izolatima *G. idaeicola* poreklom iz SAD (GU320781, GU320783, GU320784) i Francuske (GU320780) sa *Rubus* sp. i *Rubus armeniacus*.

Poređenjem sekvenci gena za *tef-1 α* ispitivanih izolata *G. idaeicola* (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 1081 karakter) utvrđen je visok stepen međusobne nukleotidne sličnosti (99,4 – 100%, do 7 bp razlike). Analiza homologije nukleotidnih sekvenci *tef-1 α* svih ispitivanih izolata *G. idaeicola* otkrila je visoku nukleotidnu identičnost od 99% sa 4 izolata *G. idaeicola*, jednim iz Francuske (GU320796) sa *Rubus* sp., i tri iz SAD (GU320797, GU320798, GU320799) sa *Rubus pedatus* i *Rubus armeniacus*.

Poređenjem sekvenci gena FG1093 svih 11 ispitivanih izolata *G. idaeicola* utvrđen je visok stepen međusobne nukleotidne sličnosti (100%). Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata utvrđena je visoka nukleotidna identičnost od 100% sa jedinom sekvencom *G. idaeicola* dostupnom u GenBank bazi podataka (JF274654) poreklom iz SAD sa *Rubus armeniacus*.

➤ ***Septoria* spp.** Analiza homologije sekvenci ITS regiona rDNA potvrdila je rezultate konvencionalne identifikacije odnosno pripadnost odabranih izolata rodu *Septoria* (Tabela 12). Poređenjem svih 12 ITS sekvenci rDNA (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 548 karaktera) ispitivanih izolata *Septoria* spp. utvrđen je

visok stepen međusobne nukleotidne sličnosti (99,1 – 100 %, do 5 bp razlike). Sekvenca izolata KME7-16 razlikovala se u 5 bp od sekvenci svih ostalih izolata. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA većine ispitivanih izolata *Septoria* spp. utvrđena je 100% nukleotidna identičnost sa jedinom dostupnom sekvencom vrste *Septocytia ruborum* poreklom iz Srbije sa kupine (JN133277). I sekvenca izolata KME7-16 ispoljila je visoku nukleotidnu identičnost od 98,9% sa navedenom sekvencom. Poređenjem sekvenci ispitivanih izolata sa sekvencama ITS regiona rDNA osam dostupnih izolata vrste *Sphaerulina westendorpii*, poznatog patogena kupine, utvrđena je homologija nukleotidnih sekvenci od 96 do 98,7%. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata utvrđen je i visok stepen nukleotidne identičnosti od 99-100% sa sekvencama 17 izolata iz 17 vrsta iz rodova *Septoria*, *Sphaerulina*, *Mycosphaerella*, *Apseudocercospora* i *Cercospora* dostupnih u GenBank bazi podataka, odnosno preko 99% sa sekvencama 6 izolata iz 4 vrste roda *Septoria* dostupnih u Qbank bazi podataka i 99 - 100% sa sekvencama 4 izolata iz 4 vrste roda *Septoria* dostupnim u Boldsystems bazi podataka.

➤ ***Botryosphaeria dothidea***. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrđena je morfološka identifikacija svih 5 odabranih izolata *B. dothidea* (Tabela 12). Poređenjem ITS sekvenci rDNA ovih izolata (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 515 karaktera) utvrđen je visok stepen međusobne nukleotidne sličnosti (100%). Upoređivanjem sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka ustanovljena je visoka nukleotidna identičnost od 99-100% (99-100% pokrivenosti) sa sekvencama vrste *B. dothidea* i to iz Irana (KC467063, KC467062, KC218814, KC218813, JX073099, JX073098, KF466486), Kine (JN638454, JQ936677), Japana (AB645745, AB645744, AB645749), SAD (JQ411394, KY711227) i Slovenije (AJ938004). Navedeni izolati ispoljili su visoku nukleotidnu identičnost od 99% sa još najmanje 60 sekvenci vrste *B. dothidea* dostupnim u GenBank bazi podataka poreklom iz različitih delova sveta sa različitih domaćina. Takođe analizom homologije nukleotidnih sekvenci utvrđena je i visoka identičnost od 99 do 100% sa preko 80 sekvenci vrste *B. dothidea* dostupnih u Boldsystems bazi podataka. Nije ustanovljena značajna nukleotidna sličnost sekvenci ispitivanih izolata ni sa jednom sekvencom dostupnom u Qbank bazi podataka.

➤ ***Diplodia seriata***. Analiza homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrdila je rezultate konvencionalne identifikacije odabranih izolata *D. seriata* (Tabela 12). Poređenjem sekvenci ITS regiona rDNA svih odabranih izolata (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 590 karaktera) utvrđen je visok stepen međusobne sličnosti (100%). Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata sa drugim sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka ustanovljeno je da su najbliži (nukleotidna identičnost 100%, pokrivenost 100%) sekvenci izolata *D. seriata* poreklom iz Irana (KC020170). Osim toga visok stepen nukleotidne identičnosti od 99-100% ustanovljen sa najmanje 88 sekvenci vrste *D. seriata* dostupnih u GenBank bazi podataka odnosno sa najmanje 70 sekvenci vrste *D. seriata* dostupnih u Boldsystems bazi podataka poreklom iz različitih zemalja sa različitih domaćina.

➤ ***Botrytis cinerea***. Konvencionalna identifikacija 5 odabranih izolata *B. cinerea* (Tabela 12) potvrđena je analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA. Poređenjem sekvenci ispitivanih izolata (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 530 karaktera) utvrđen je visok stepen međusobne sličnosti od (99,6 – 100 %, do 2 bp razlike). Analizom homologije nukleotidnih sekvenci sa drugim sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka ustanovljeno je da su izolati KDO4-15 i KDO9-15 ispoljili visoku nukleotidnu identičnost od 100% (100% pokrivenosti) sa sekvencama vrste *B. cinerea* iz Nemačke (CP009808), Španije (EF207413), SAD (KR094468), Kanade (KF859924, KF859923, KF859922, KF859921, KF859918) i Pakistana (KY319171, KX889115). Ustanovljena je i visoka nukleotidna identičnost (99-100%) svih 5 ispitivanih izolata *B. cinerea* sa još najmanje 50 izolata *B. cinerea* dostupnih u GenBank bazi podataka poreklom iz različitih zemalja širom sveta sa različitih domaćina. Takođe potvrđena je i veoma visoka nukleotidna identičnost od preko 99% sa preko 30 sekvenci vrste *B. cinerea* dostupnih u Boldsystems bazi podataka. Nije ustanovljena značajna nukleotidna sličnost sekvenci ispitivanih izolata ni sa jednom sekvencom dostupnom u Qbank bazi podataka.

➤ ***Colletotrichum kahawae***. Pripadnost ispitivanih izolata vrsti *C. kahawae* uglavnom su podržali rezultati analize homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA (Tabela

12). Međutim, kako je utvrđena visoka homologija nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA i sa nekim drugim vrstama roda *Colletotrichum*, a da bi se sa sigurnošću utvrdio identitet ispitivanih izolata, urađena je filogenetska analiza koja je potvrdila da sekvence svih ispitivanih izolata pripadaju vrsti *C. kahawae*. Poređenjem nukleotidnih sekvenci svih ispitivanih izolata (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 561 karakter) ustanovljen je visok stepen međusobne sličnosti (99,5 – 100%, do 3 bp razlike). Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *C. kahawae* ustanovljena je visoka nukleotidna identičnost od 99-100% (99-100% pokrivenosti) sa sekvencama *Colletotrichum kahawae* iz Kostarike (MF422167) i Kenije (NR_144787) sa *Olea europea*, *Colletotrichum kahawae* subsp. *cigarro* iz Australije (NR_120138), SAD (JX010228), Novog Zelanda (JX010214) i Angole (AM903329) sa *Coffea robusta*, *Vaccinium* sp. i *Persea americana* dostupnim u GenBank bazi podataka. Visoka nukleotidna identičnost od 99% do 100% (do 100% pokrivenosti) utvrđena je sa 8 sekvenci *Colletotrichum kahawae* subsp. *cigarro* iz Novog Zelanda, Brazila, Australije, Južne Afrike, Švajcarske i Nemačke sa *Vaccinium* sp., *Miconia* sp., *Toronia toru*, *Olea europaea*, *Kunzea ericoides*, *Dryandra* sp., *Dryas octopetala* i *Hypericum perforatum* kao i sa 5 sekvenci *Colletotrichum kahawae* subsp. *kahawae* iz Kenije, Angole, Kameruna i Malavi sa *Coffea* sp. i *Coffea arabica* dostupnim u Qbank bazi podataka. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata sa sekvencama dostupnim u Boldsystems bazi podataka utvrđena je visoka nukleotidna identičnost od preko 99% sa dve sekvence *C. kahawae* iz Angole poreklom sa *Coffea arabica*. Pored najveće sličnosti sekvenci ispitivanih izolata sa sekvencama *Colletotrichum kahawae* utvrđena je i visoka nukleotidna identičnost od 99-100% sa sekvencama još najmanje 12 vrsta roda *Colletotrichum* dostupnim u GenBank bazi podataka, odnosno sekvencama 12 vrsta roda *Colletotrichum* dostupnih u Boldsystems bazi podataka. Nije ustanovljena značajna nukleotidna sličnost sekvenci ispitivanih izolata ni sa jednom sekvencom dostupnom u Qbank bazi podataka.

➤ ***Diaporthe betulae***. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA dva odabrana izolata *Diaporthe* sp., nisu mogla biti identifikovana do nivoa vrste. Tek nakon sprovedene filogenetske analize i generisanja stabla sa usaglašenim međuodnosima u okviru vrsta roda *Diaporthe* ustanovljeno je da pripadaju vrsti *D.*

betulae. Analizom sekvenci ITS regiona rDNA ova dva izolata (Tabela 12) (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 588 karaktera) ustanovljena je 100% identičnost. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ustanovljena je najviša nukleotidna identičnost od 99 – 100% (89 do 100% pokrivenosti) sekvenci ispitivanih izolata sa sekvencama vrste *Diaporthe eres* (KJ210530, MF509748, JF430491, KP903572), ali i sekvencama *Diaporthe nobilis* (KU377285, KU377278, KJ609009, KJ609010, KX866898, KX866878, KX866917, KC343148), *Diaporthe vaccinii* (JX846914, KJ739486, KM979752, EU520050, KC488259, KJ739488), *Phomopsis capsici* (KY345415, KR870865, KR870864, KR870863, KR870862), *Phyllosticta papayae* (FJ462748), *Phomopsis occulta* (HM439635) dostupnim u GenBank bazi podataka. Takođe ustanovljena je visoka nukleotidna identičnost od 99-100% sa dve sekvence *D. eres* i 4 sekvence *D. cf. nobilis* dostupne u Boldsystems bazi podataka. Nije ustanovljena značajna homologija nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata ni sa jednom sekvencom dostupnom u Qbank bazi podataka.

➤ ***Diaporthe eres***. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA 3 ispitivana izolata morfološki identifikovana kao *Diaporthe* sp. utvrđeno je da se najverovatnije radi o vrsti *D. eres*. Kako je utvrđen visok stepen homologije nukleotidnih sekvenci i sa nekim drugim vrstama roda *Diaporthe* tek je filogenetskom analizom sa sigurnošću ustanovljeno da ispitivani izolati pripadaju vrsti *D. eres*. Poređenjem sekvenci ITS regiona rDNA (Tabela 12) (nakon poravnanja i skraćivanja na dužinu najkraće sekvence – 592 karaktera) ispitivanih izolata *D. eres* utvrđen je visok stepen međusobne sličnosti (100%). Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *D. eres* ustanovljena je visoka nukleotidna identičnost od 99-100% sa 17 sekvenci vrste *D. eres* iz Hrvatske (HQ533144 i HQ533143), Srbije (JF430487, KX274026), Litvanije (EU571099), Danske (LC171683), Nemačke (KU712214), Italije (KC343074), Letonije (KP903602), Poljske (KT004549, KX506004, KX506001, KX506003), Norveške (GQ996572), SAD (DQ491514), i Austrije (HQ115664, KC343075) dostupnih u GenBank bazi podataka, odnosno sa još najmanje 19 sekvenci vrste *D. eres* dostupnih u Boldsystems bazi podataka poreklom iz različitih delova sveta sa različitih domaćina.

Osim toga analizom homologije nukleotidnih sekvenci ustanovljena je i visoka nukleotidna identičnost (99-100%) ispitivanih izolata sa sekvencama vrsti *Phomopsis mali* (LC171696, AB665315), *Diaporthe cotoneastri* (LC171652, KC145884), *Diaporthe amygdali* (AF103001), *Diaporthe vaccinii* (KC488258, KX498066, AB470842, EU561633, KX498067), *Phomopsis quercina* (JX262803), *Diaporthe helianthi* (AJ312352), *Diaporthe rosicola* (MG828895), *Diaporthe celastrina* (NR_152457), *Diaporthe phaseolorum* (EU030325, AF001021), *Phomopsis prunorum* (LC206590, LC206441, LC206437, LC206648, LC206641, LC206636) dostupnih u GenBank bazi podataka. Nije ustanovljena značajna nukleotidna sličnost sekvenci ispitivanih izolata ni sa jednom sekvencom dostupnom u Qbank bazi podataka.

➤ ***Neofusicoccum parvum***. Analiza homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA jednog odabranog izolata *N. parvum* iz Srbije potvrdila je rezultate konvencionalne identifikacije (Tabela 12). Sekvenca izolata KZAI3-15 ispoljila je visoku nukleotidnu identičnost od 99-100% (99-100% pokrivenosti) sa velikim brojem sekvenci vrste *N. parvum* dostupnim u GenBank bazi podataka. Najveća sličnost ustanovljena je sa izolatima iz Južne Afrike (KU997474, KU997539), Kenije (FJ904817), Zimbabvea (KF923242), Alžira (KJ657701, KJ657700), Havaja (MG650104), Meksika (JQ647911, JQ647908), Brazila (EU938334), Grčke (JN135282), Australije (MH057193, MH057203) i Kine (KX960799, MF314146), kao i sa još najmanje 64 sekvence iz različitih delova sveta sa različitih domaćina. Utvrđena je i veoma visoka nukleotidna identičnost od 99 do 100% sa najmanje 70 sekvenci vrste *N. parvum* dostupnih u Bolddsystems bazi podataka. Nije ustanovljena visoka nukleotidna identičnost sekvenci ispitivanih izolata ni sa jednom sekvencom dostupnom u Qbank bazi podataka.

5.6. Filogenetske analize

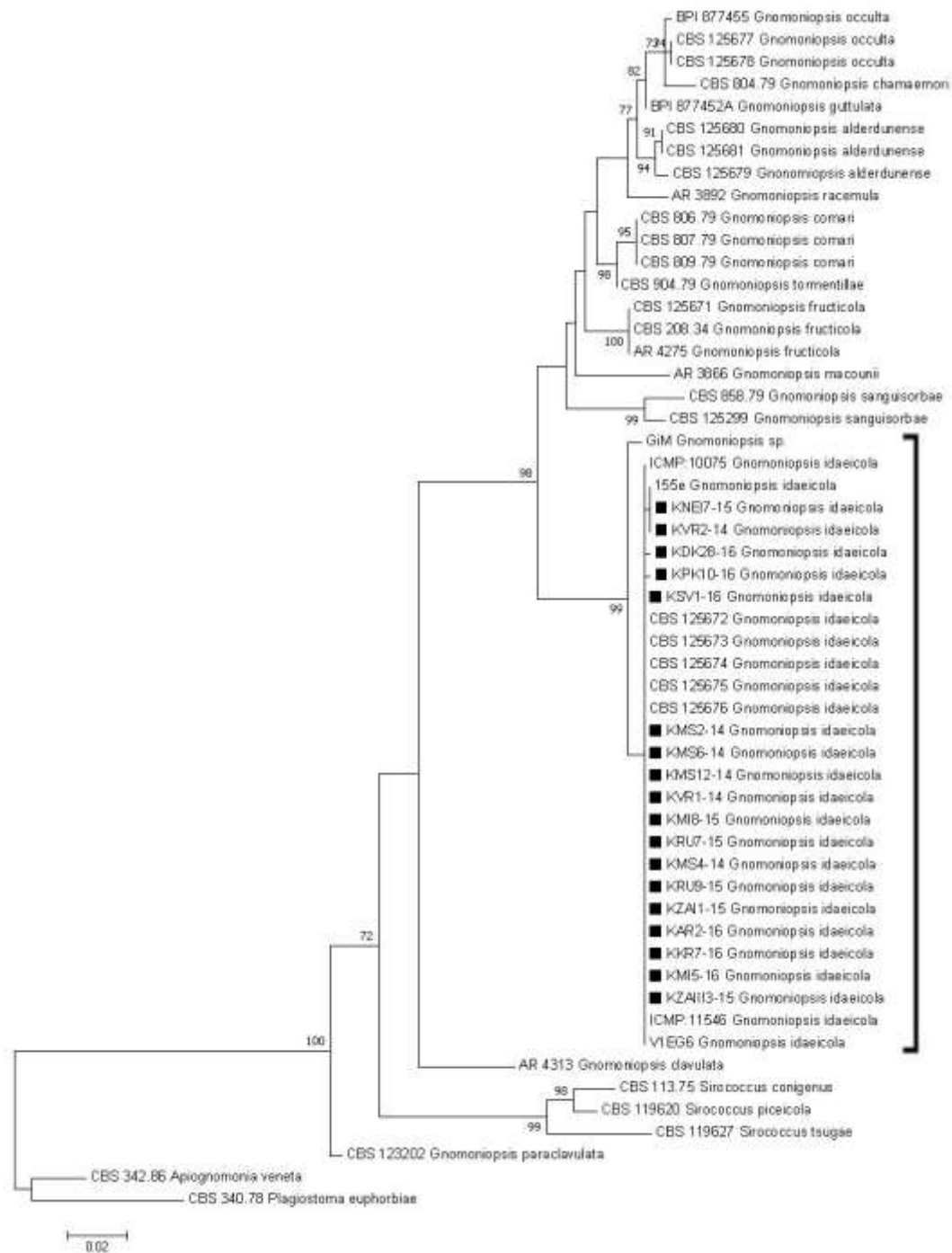
Molekularna karakterizacija i filogenetske analize evolutivnih međudnosa zasnovana su na analizi sekvenci ITS regiona rDNA kao i multilokus analizi zasnovanoj na kombinovanim sekvencama ITS regiona rDNA, gena za β -tubulin, tef-1 α i FG1093. Molekularna karakterizacija zasnovana na analizi sekvenci ITS regiona rDNA urađena je za vrste *Gnomoniopsis idaeicola*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe betulae*, *Diaporthe eres* i *Neofusicoccum parvum*.

Detaljna filogenetska multilokus analiza urađena je za vrstu *G. idaeicola* analizom kombinovanih sekvenci ITS regiona rDNA, gena za β -tubulin, tef-1 α i FG1093.

➤ **Filogenetske analize *Gnomoniopsis idaeicola*:** Za molekularnu karakterizaciju i filogenetska ispitivanja izolata *G. idaeicola* korišćene su sekvence četiri molekularna markera (ITS region rDNA, β -tubulin, tef-1 α i FG1093). Filogenetske analize obuhvatile su sekvence izolata *G. idaeicola* iz Srbije generisane u ovom radu, sve sekvence *G. idaeicola* dostupne u GenBank bazi podataka kao i prethodno ustanovljene tipske vrste uključene u usaglašeno filogenesko stablo *Gnomoniopsis* spp. Rekonstruisana su dva filogenetska stabla, na osnovu pojedinačnog molekularnog markera, ITS regiona rDNA i drugo na osnovu sva četiri molekularna markera (ITS region rDNA, β -tubulin, tef-1 α i FG1093), nakon njihovog kombinovanja.

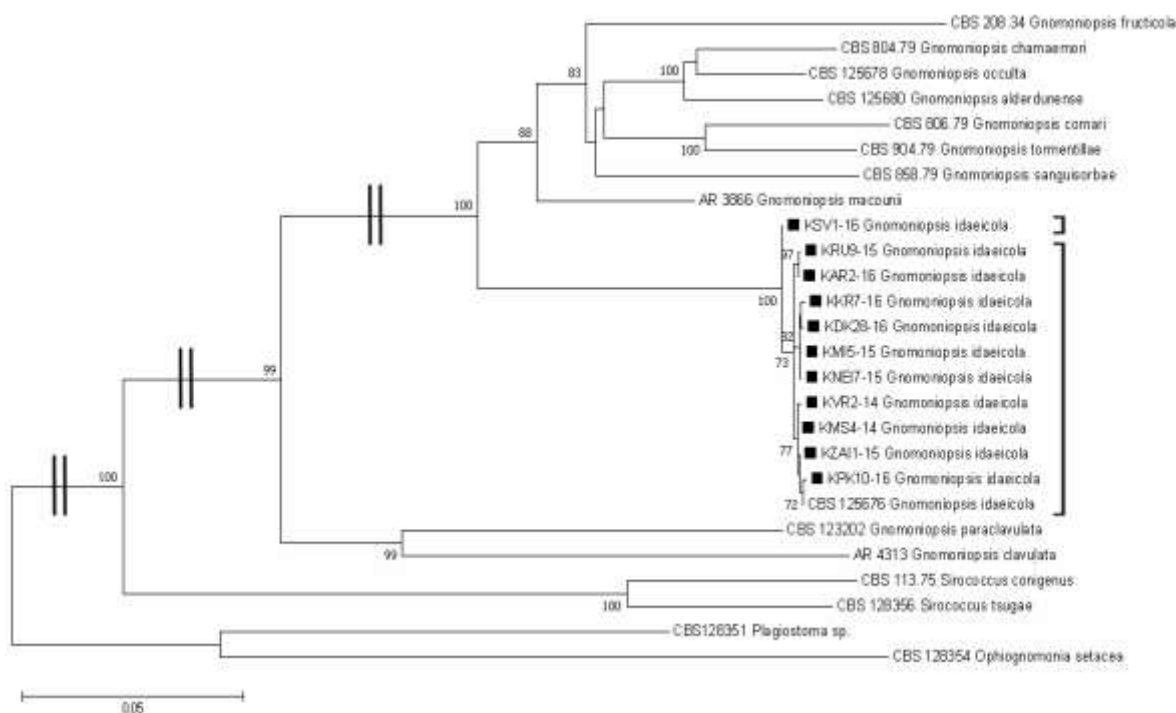
Za rekonstrukciju filogenetskog stabla na osnovu sekvenci ITS regiona rDNA korišćene su sekvence 18 izolata poreklom iz Srbije i 31 reprezentativnog izolata *Gnomoniopsis* spp., tri izolata *Sirococcus* spp. i dve autgrupe *Apiognomonina veneta* (Sacc. & Speg.) Höhn i *Plagiostoma euphorbiae* (Fuckel) Fuckel koje su poslužile za rutovanje stabla. Nakon uparivanja ukupno 54 odabrane sekvence, skraćene su na 534 karaktera, a filogenetsko stablo rekonstruisano je korišćenjem Maximum likelihood metode i bootstrap podrške od 1000 ponavljanja. Primenjen je Gamma raspored Tamura-Nei model (G+I) nukleotidne supstitucije. Bootstrap vrednosti manje od 70% su izostavljene.

Maximum likelihood analiza 54 ITS sekvence generisala je filogenetsko stablo u kojem je uspostavljeno razdvajanje i topologija koja odgovara rodu *Gnomoniopsis* spp. (Slika 37). Svi izolati *G. idaeicola*, kako poreklom iz Srbije tako i preostalih devet dostupnih izolata poreklom iz različitih domaćina i geografskih područja (SAD, Španija, Francuska i Novi Zeland), formirali su jedan filogenetski klaster, sa jakom “bootstrap” podrškom od 98%. Izolat *Gnomoniopsis* sp. poreklom iz Irana sa kupine (GiM) takođe se grupisao u *G. idaeicola* klaster ali na zasebnoj grani, sa visokom “bootstrap” podrškom od 99%.



Slika 37. Filogenetsko stablo rekonstruisano iz sekvenci ITS regiona rDNA 18 ispitivanih izolata poreklom iz Srbije i 31 reprezentativnog izolata *Gnomoniopsis* spp., tri izolata *Sirococcus* spp. i dve autgrupe *Apiognomonina veneta* i *Plagiostoma euphorbiae* korišćenjem Maximum likelihood metode. Filogram je generisan u MEGA6 softveru korišćenjem Tamura-Nei model Gamma distributed (G+I). Bootstrap analiza urađena je u 1000 ponavljanja, i prikazane su bootstrap vrednosti >70% pored odgovarajućih grana. Izolati *Gnomoniopsis idaeicola* poreklom iz Srbije označeni su crnim kvadratom sa leve strane.

Multilokus filogenetska analiza bazirana na kombinovanim sekvencama genetičkih markera ITS region rDNA, β -tubulin, *tef-1 α* i FG1093 gena, obuhvatila je 11 odabranih izolata poreklom iz Srbije, 11 reprezentativnih izolata vrsta roda *Gnomoniopsis*, dve vrste roda *Sirococcus*, i dve autgrupe *Plagiostoma* sp. i *Ophiognomonia setacea* (Pers.) Sogonov, koje su poslužile za rutovanje stabla. ITS region rDNA, β -tubulin, *tef-1 α* i FG1093 sekvence prvo su pojedinačno (po genima) uparivane i skraćivane i dobijene su sekvence dužine 530, 788, 1123 odnosno 426 karaktera, a zatim je izvršena konkatenuacija sekvenci sva četiri genska regiona ukupne dužine 2867 karaktera. Filogenetsko stablo generisano je korišćenjem Maximum likelihood metode i bootstrap podrške od 1000 ponavljanja. Primenjen je Gamma distributed Tamura-Nei model (G+I) nukleotidne supstitucije. Bootstrap vrednosti manje od 70% su izostavljene.



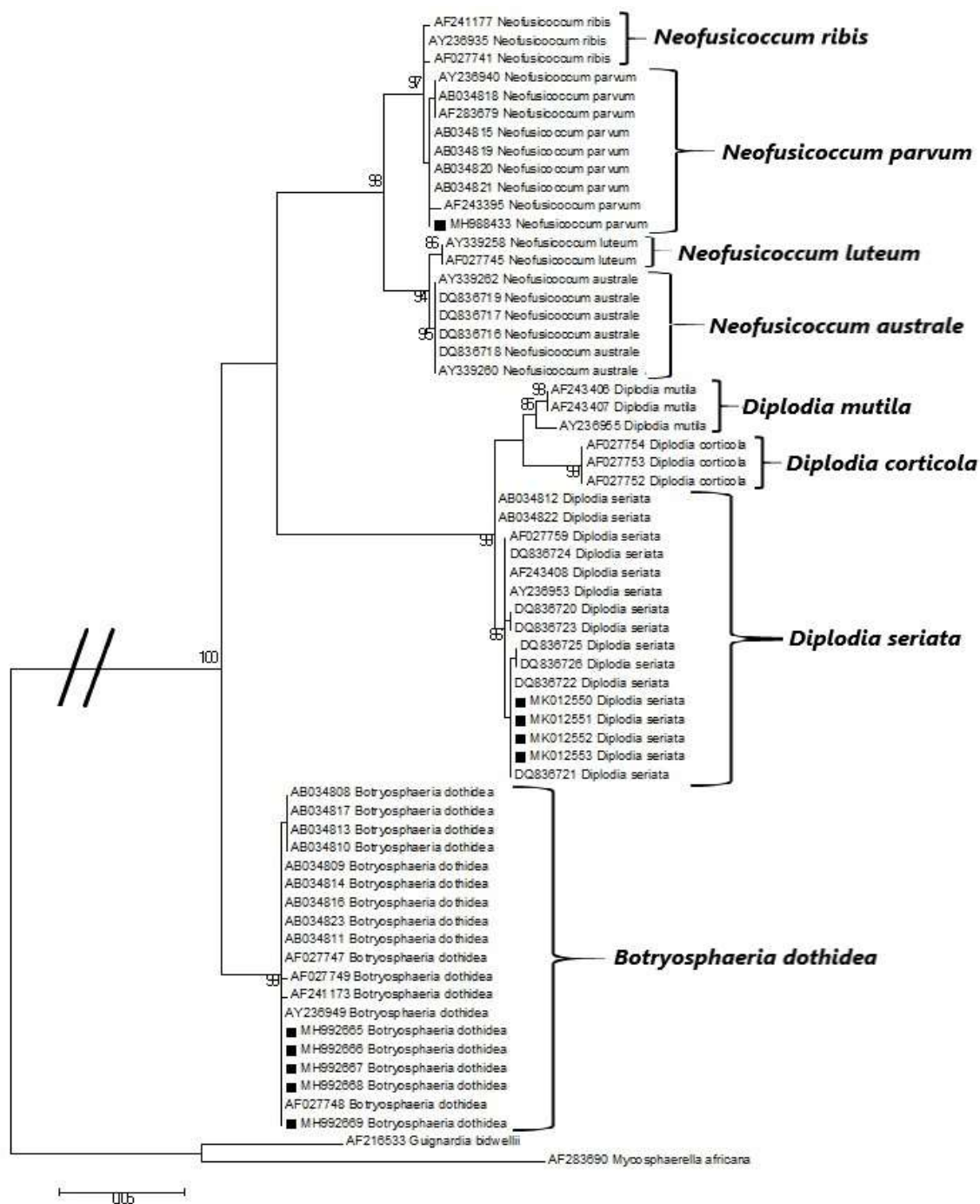
Slika 38. Filogenetsko stablo rekonstruisano iz spojenih sekvenci ITS regiona rDNA, gena za β -tubulin, *tef-1 α* i FG1093 11 ispitivanih izolata poreklom iz Srbije, 11 reprezentativnih izolata *Gnomoniopsis* spp., dve vrste roda *Sirococcus* i dve autgrupe *Plagiostoma* sp. i *Ophiognomonia setacea* korišćenjem Maximum likelihood metode. Filogram je generisan u MEGA6 softveru korišćenjem Tamura-Nei model Gamma distributed (G+I). Bootstrap analiza urađena je u 1000 ponavljanja, i prikazane su bootstrap vrednosti >70% pored odgovarajućih grana. Izolati *G. idaeicola* poreklom iz Srbije označeni su crnim kvadratom sa leve strane.

Multilokus filogenetsko stablo (Slika 38) pokazalo je sličnu topologiju na nivou roda *Gnomoniopsis* kao i filogenetsko stablo zasnovano na ITS regionu rDNA (Slika 37),

sa jasno razdvojenim i prethodno usaglašenim i priznatim grupama vrsta. Dobro definisan klaster *G. idaeicola* obuhvatio je svih 11 izolata iz Srbije kao i jedini izolat iz SAD dostupan u bazi podataka, ali sa boljom rezolucijom pozicije pojedinih izolata u okviru vrste. U okviru tog klastera izolati *G. idaeicola* razdvajaju su u dve grane, sa jakom "bootstrap" podrškom od 100%. U prvu granu odvojio se samo jedan izolat poreklom iz Srbije sa lokaliteta Svilajnac (KSV1-16), dok su ostalih 10 izolata poreklom iz Srbije i jedan izolat iz SAD grupisani u drugu granu u okviru koje postoji dalje grupisanje. Mada značaj ovog dodatnog grupisanja još uvek nije dovoljno jasan, pruža uvid u varijabilnost populacije *G. idaeicola*.

➤ **Filogenetske analize vrsta familije Botryosphaeriaceae:** Za molekularnu karakterizaciju i filogenetska ispitivanja izolata identifikovanih kao *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* i *Neofusicoccum parvum* korišćene su sekvence ITS regiona rDNA izolata iz Srbije generisane u ovom radu, kao i reprezentativne sekvence dostupne u GenBank bazi podataka koje podržavaju filogeniju u okviru familije Botryosphaeriaceae i vrste izvan ove familije koje su poslužile kao autgrupe. Korišćene su sekvence 5 izolata *B. dothidea*, 4 izolata *D. seriata* i 1 izolata *N. parvum* iz Srbije kao i sekvence 8 reprezentativnih izolata *N. parvum*, 3 izolata *N. ribis*, 2 izolata *N. luteum*, 6 izolata *N. australe*, 14 izolata *B. dothidea*, 3 izolata *D. corticola*, 3 izolata *D. mutila*, 12 izolata *D. seriata*, i dve autgrupe *Guignardia bidwelli* i *Mycosphaerella africana*. Nakon uparivanja ukupno 63 odabrane sekvence one su skraćene na 495 karaktera i poslužile za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćenjem Maximum likelihood metode i bootstrap podrške od 1000 ponavljanja. Primenjen je Gamma raspored Tamura-Nei model (G+I) nukleotidne supstitucije. Bootstrap vrednosti manje od 70% su izostavljene.

Maximum likelihood analiza 63 odabrane sekvence ITS regiona rDNA generisala je filogenetsko stablo u kojem je uspostavljeno odgovarajuće razdvajanje i topologija vrsta karakteristična za familiju Botryosphaeriaceae (Slika 39). Odvojilo se 8 različitih filogenetskih grupa koje odgovaraju dobro definisanim i usaglašenim vrstama u okviru familije Botryosphaeriaceae.



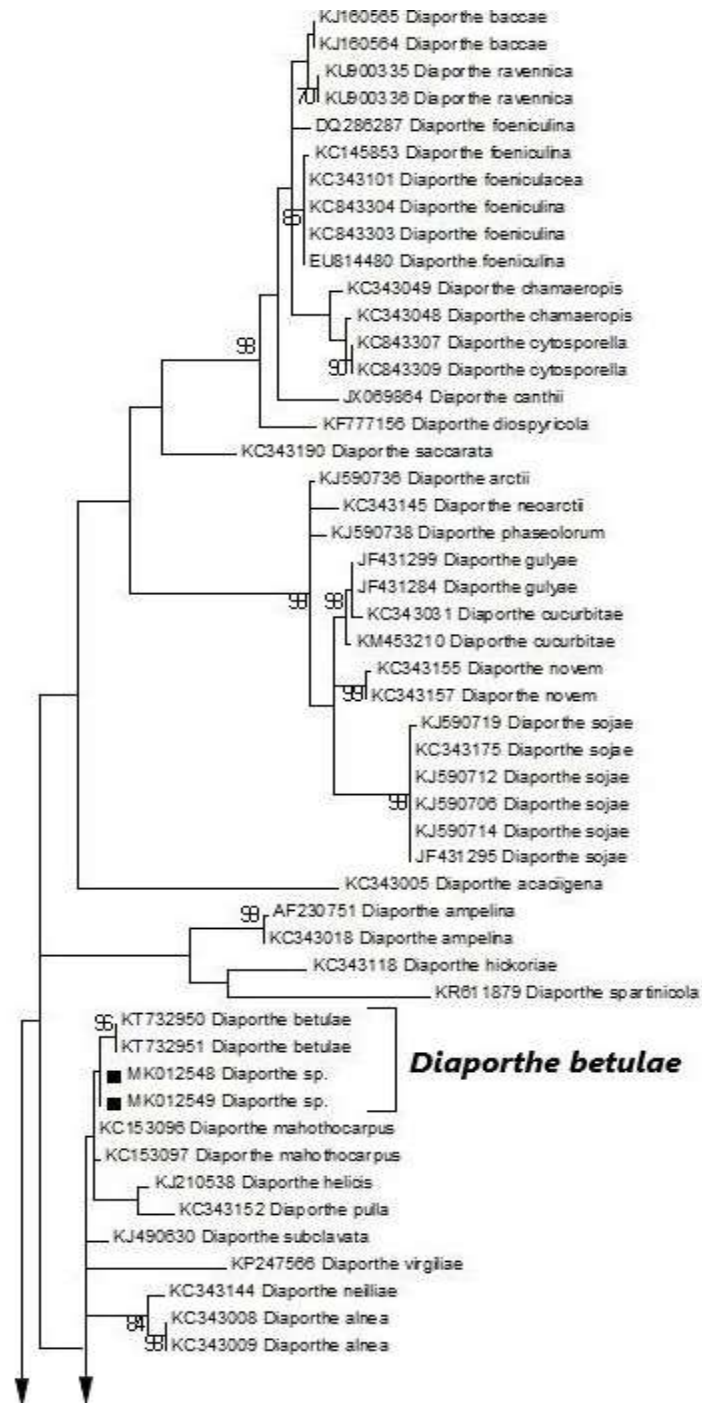
Slika 39. Filogenetsko stablo rekonstruisano iz sekvenci ITS regiona rDNA 5 izolata *Botryosphaeria dothidea*, 4 izolata *Diplodia seriata* i 1 izolat *Neofusicoccum parvum* poreklom iz Srbije, 8 reprezentativnih izolata *N. parvum*, 3 izolata *N. ribis*, 2 izolata *N. luteum*, 6 izolata *N. australe*, 14 izolata *B. dothidea*, 3 izolata *D. corticola*, 3 izolata *D. mutila*, 12 izolata *D. seriata*, i dve autgrupe *Guignardia bidwellii* i *Mycosphaerella africana* korišćenjem Maximum likelihood metode. Filogram je generisan u MEGA6 softveru korišćenjem Tamura-Nei model Gamma distributed (G+I). Bootstrap analiza urađena je u 1000 ponavljanja, i prikazane su bootstrap vrednosti >70% pored odgovarajućih grana. Izolati poreklom iz Srbije označeni su crnim kvadratom sa leve strane.

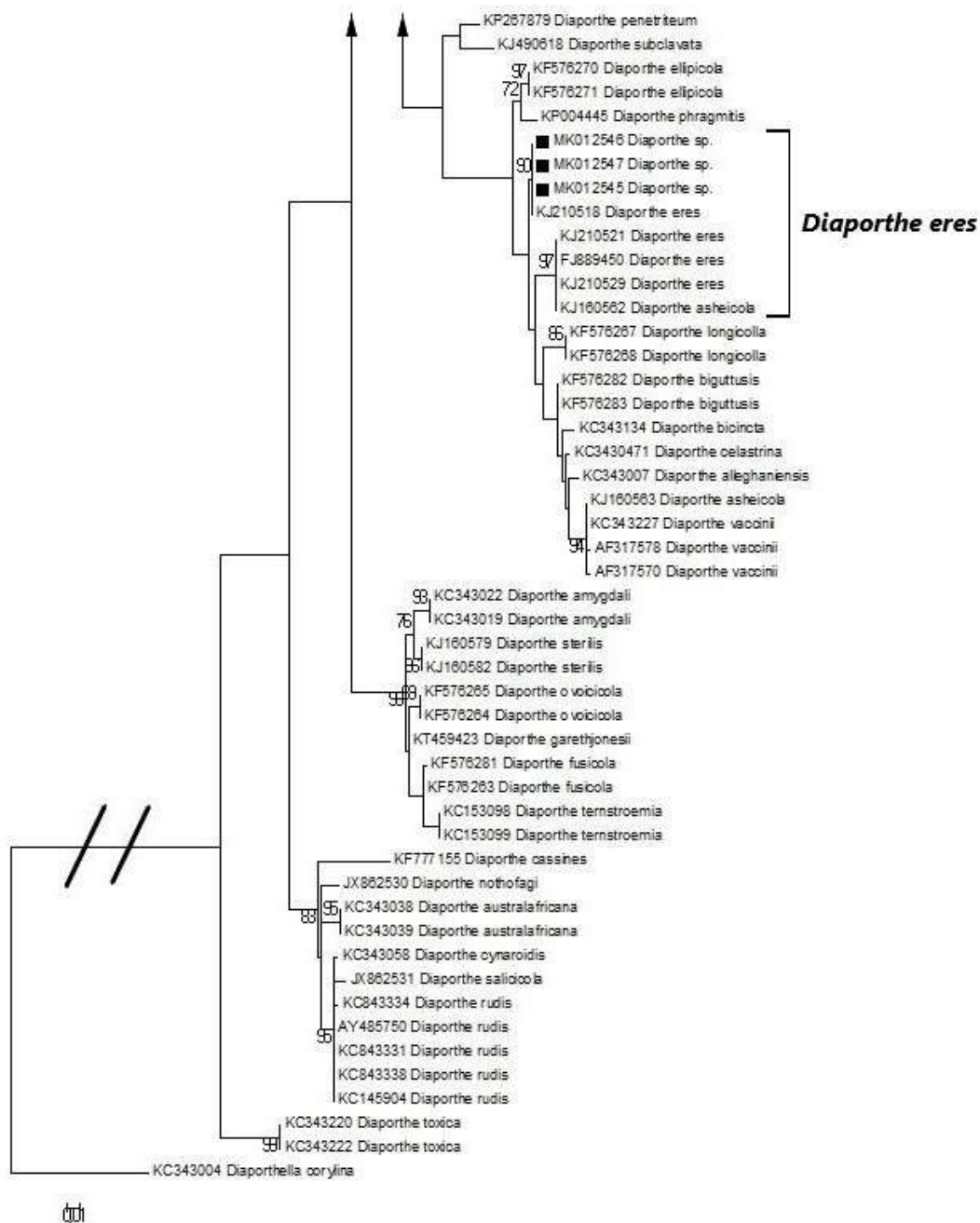
Ispitivani izolati iz Srbije grupisali su se u tri zasebne filogenetske grupe, što je odgovaralo rezultatima morfološke i molekularne identifikacije. Izolati KDR12-13, KMI3-15, KRU15-15, KDK29-16 i KKR1-16 grupisali su se zajedno sa 14 reprezentativnih izolata *B. dothidea* u jasno definisan filogenetski klaster sa visokom “bootstrap” podrškom od 99%. Sa druge strane izolati KMI4-15, KDO7-15, KNEIII1-15 i KBOI1-16 grupisali su se u zaseban filogenetski klaster zajedno sa još 12 reprezentativnih izolata *D. seriata*, takođe sa visokom “bootstrap” podrškom od 99%. U treću filogenetsku grupu izdvojio se izolat KZAI3-15 sa još 8 reprezentativnih izolata vrste *N. parvum* sa visokom “bootstrap” podrškom od 97%. Dobijeni rezultati potvrdili su filogenetsku pripadnost familiji Botryosphaeriaceae kao i taksonomsku poziciju izolata *B. dothidea*, *D. seriata* i *N. parvum* iz Srbije, kao i bližu međusobnu srodnost *D. seriata* i *N. parvum* u odnosu na *B. dothidea*.

➤ **Filogenetske analize vrsta roda *Diaporthe*:** Za molekularnu karakterizaciju i filogenetska ispitivanja izolata idetifikovanih kao *Diaporthe betulae* i *D. eres* korišćene su sekvence ITS regiona rDNA. Filogenetske analize obuhvatile su sekvence izolata iz Srbije generisane u ovom radu kao i sekvence dostupne u GenBank bazi podataka koje su reprezentativne i podržavaju filogeniju u okviru roda *Diaporthe*, kao i jedne vrste izvan ovog roda koja je poslužila kao autgrupa. Korišćene su sekvence 2 izolata *D. betulae* i 3 izolata *D. eres* iz Srbije kao i sekvence reprezentativnih izolata iz GenBank baze podataka i to sekvence 1 izolata *D. acaciigena*, 1 izolata *D. alleghaniensis*, 2 izolata *D. alnea*, 2 izolata *D. ampelina*, 2 izolata *D. amygdali*, 1 izolata *D. arctii*, 2 izolata *D. asheicola*, 2 izolata *D. australafricana*, 2 izolata *D. baccae*, 2 izolata *D. betulae*, 1 izolata *D. bicincta*, 2 izolata *D. biguttusis*, 1 izolata *D. canthii*, 1 izolata *D. cassines*, 1 izolata *D. celastrina*, 2 izolata *D. chamaeropis*, 2 izolata *D. cucurbitae*, 1 izolata *D. cynaroidis*, 2 izolata *D. cytosporella*, 1 izolata *D. diospyricola*, 2 izolata *D. ellipicola*, 4 izolata *D. eres*, 6 izolata *D. foeniculina*, 2 izolata *D. fusicola*, 1 izolata *D. garethjonesii*, 2 izolata *D. gulyae*, 1 izolata *D. helicis*, 1 izolata *D. hickoriae*, 2 izolata *D. longicicola*, 2 izolata *D. mahothocarpus*, 1 izolata *D. neilliae*, 1 izolata *D. neoarctii*, 1 izolata *D. nothofagi*, 2 izolata *D. novem*, 2 izolata *D. ovoicicola*, 1 izolata *D. penetriteum*, 1 izolata *D. phaseolorum*, 1 izolata *D. phragmitis*, 1 izolata *D. pulla*, 2 izolata *D. ravennica*, 1 izolata *D. saccarata*, 1 izolata *D. salicicola*, 6 izolata *D. sojae*, 1 izolata *D. spartinicola*, 2 izolata

D. sterilis, 2 izolata *D. subclavata*, 2 izolata *D. ternstroemia*, 2 izolata *D. toxica*, 3 izolata *D. vaccinii*, 1 izolata *D. virgiliae*, i jedne autgrupe *Diaporthe corylina*.

Nakon uparivanja ukupno 99 odabranih sekvenci one su skraćene na 507 karaktera i poslužile za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćenjem Maximum likelihood metode i bootstrap podrške od 1000 ponavljanja. Primenjen je Gamma raspored Tamura-Nei model (G+I) nukleotidne supstitucije. Bootstrap vrednosti manje od 70% su izostavljene.





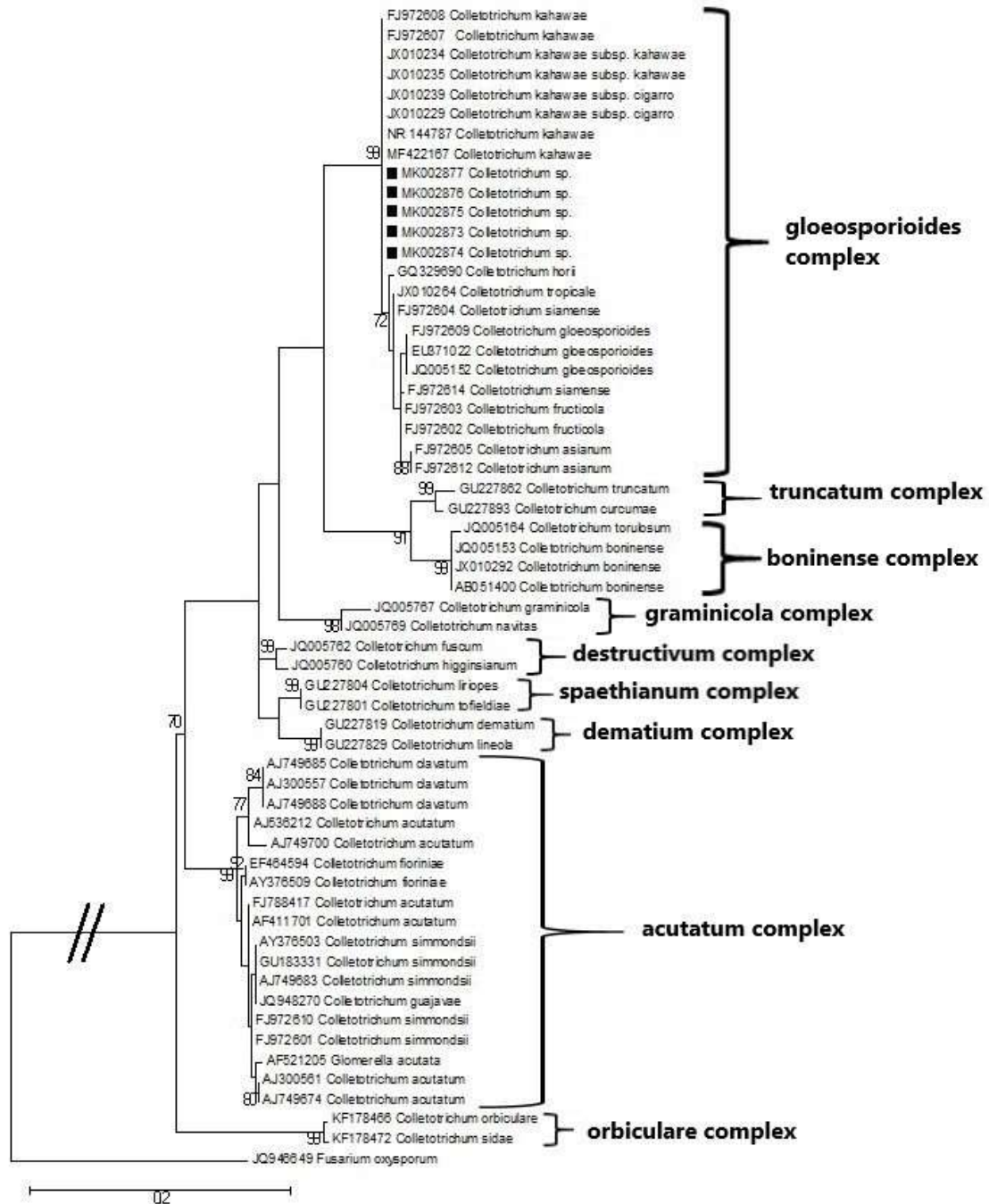
Slika 40. Filogenetsko stablo rekonstruisano iz sekvenci ITS regiona rDNA 93 izolata svrstanih u 49 reprezentativnih vrsta roda *Diaporthe* i jedne autgrupe *Diaporthella corylina* korišćenjem Maximum likelihood metode. Filogram je generisan u MEGA6 softveru korišćenjem Tamura-Nei model Gamma distributed (G+I). Bootstrap analiza urađena je u 1000 ponavljanja, i prikazane su bootstrap vrednosti >70% pored odgovarajućih grana. Izolati poreklom iz Srbije označeni su crnim kvadratom sa leve strane.

Maximum likelihood analiza 99 odabranih sekvenci ITS regiona rDNA generisala je filogenetsko stablo u kojem je uspostavljeno odgovarajuće razdvajanje i topologija vrsta karakterističnih za rod *Diaporthe* (Slika 40). Ispitivani izolati iz Srbije grupisali su

se u dve zasebne filogenetske grupe što je i bilo očekivano usled značajnih razlika u sekvencama ITS regiona rDNA. Izolati KDR3-13, KDR21-13 i KDR22-13 (MK012545, MK012546, MK012547) grupisali su se zajedno sa jednim izolatom vrste *D. eres* sa visokom “bootstrap” podrškom od 90%. Sa druge strane izolati KMS7-14 i KNEIII3-15 (MK012548 i MK012549) grupisali su se zajedno sa dva izolata *D. betulae* takođe sa visokom “bootstrap” podrškom od 96%.

➤ **Filogenetske analize *Colletotrichum kahawae*:** Za molekularnu karakterizaciju i filogenetska ispitivanja izolata identifikovanih kao *C. kahawae* korišćene su sekvence ITS regiona rDNA. Filogenetske analize uključile su sekvence izolata iz Srbije generisane u ovom radu kao i sekvence dostupne u GenBank bazi podataka koje su reprezentativne i podržavaju filogeniju u okviru roda *Colletotrichum*, kao i jedne vrste izvan ovog roda koja je poslužila kao autgrupa. Korišćene su sekvence 5 izolata *C. kahawae* iz Srbije kao i sekvence reprezentativnih izolata i to 2 izolata *C. asianum*, 6 izolata *C. acutatum*, 3 izolata *C. boninense*, 3 izolata *C. clavatum*, 1 izolata *C. curcumae*, 1 izolata *C. dematium*, 2 izolata *C. fructicola*, 2 izolata *C. fioriniae*, 1 izolata *C. fuscum*, 3 izolata *C. gloeosporioides*, 1 izolata *C. guajavae*, 1 izolata *C. graminicola*, 1 izolata *C. higginsianum*, 4 izolata *C. kahawae*, 2 izolata *C. kahawae* subsp. *kahawae*, 2 izolata *C. kahawae* subsp. *cigarro*, 1 izolata *C. liriopes*, 1 izolata *C. lineola*, 1 izolata *C. navitas*, 1 izolata *C. orbiculare*, 2 izolata *C. siamense*, 5 izolata *C. simmondsii*, 1 izolata *C. sidae*, 1 izolata *C. tofieldiae*, 1 izolata *C. tropicale*, 1 izolata *C. truncatum*, 1 izolata *C. torulosum*, 1 izolata *Glomerella acutata*, i jedne autgrupe *Fusarium oxysporum*.

Nakon uparivanja ukupno 59 odabranih sekvenci one su skraćene na 472 karaktera i poslužile za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćenjem Maximum likelihood metode i bootstrap podrške od 1000 ponavljanja. Primenjen je Gamma raspored Tamura-Nei model (G+I) nukleotidne supstitucije. Bootstrap vrednosti manje od 70% su izostavljene.



Slika 41. Filogenetsko stablo rekonstruisano iz sekvenci ITS regiona rDNA 5 izolata *Colletotrichum kahawae* poreklom iz Srbije, 2 reprezentativna izolata *C. asianum*, 6 izolata *C. acutatum*, 3 izolata *C. boninense*, 3 izolata *C. clavatum*, 1 izolata *C. curcumae*, 1 izolata *C. dematium*, 2 izolata *C. fructicola*, 2 izolata *C. fioriniae*, 1 izolata *C. fuscum*, 3 izolata *C. gloeosporioides*, 1 izolata *C. guajavae*, 1 izolata *C. graminicola*, 1 izolata *C. horii*, 1 izolata *C. higginsianum*, 4 izolata *C. kahawae*, 2 izolata *C. kahawae* subsp. *kahawae*, 2 izolata *C. kahawae* subsp. *cigarro*, 1 izolata *C. liriopes*, 1 izolata *C. lineola*, 1 izolata *C. navitas*, 1 izolata *C. orbiculare*, 2 izolata *C. siamense*, 5 izolata *C. simmondsii*, 1 izolata *C. sidiae*, 1 izolata *C. tofieldiae*, 1 izolata *C. tropicale*, 1 izolata *C. truncatum*, 1 izolata *C. torulosum*, 1 izolata *G. acutata*, i jedne autgrupe *Fusarium oxysporum*. Izolati poreklom iz Srbije označeni su crnim kvadratom sa leve strane.

Maximum likelihood analiza 59 odabranih sekvenci ITS regiona rDNA generisala je filogenetsko stablo u kojem je uspostavljeno odgovarajuće razdvajanje i topologija vrsta karakteristična za rod *Colletotrichum*. Uspostavljeno je 9 zasebnih filogenetskih grupa koje odgovaraju definisanim kompleksima vrsta u okviru roda *Colletotrichum* i to kompleksima *gloeosporioides*, *truncatum*, *boninense*, *graminicola*, *destructivum*, *spaethianum*, *dematium*, *acutatum* i *orbiculare* (Slika 41). Svih 5 ispitivanih izolata iz Srbije grupisali su se na istoj grani zajedno sa sekvencama vrste *C. kahawae* uključujući i njene dve podvrste (*C. kahawae* subsp. *kahawae* i *C. kahawae* subsp. *cigarro*) u okviru *gloeosporioides* kompleksa. U istu filogenetsku grupu ali na odvojenim granama izdvojile su se i ostale vrste kompleksa *gloeosporioides* uključujući *C. gloeosporioides*, *C. horii*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. fructicola* i *C. asianum*.

➤ **Filogenetske analize vrsta roda *Septoria*:** Za molekularnu karakterizaciju i filogenetska ispitivanja izolata identifikovanih kao *Septoria* spp. korišćene su sekvence ITS regiona rDNA. Filogenetske analize obuhvatile su sekvence izolata iz Srbije generisane u ovom radu kao i sekvence jasno definisanih reprezentativnih vrsta roda *Septoria* kao i većeg broja vrsta iz srodnih rodova uključujući *Stromatoseptoria*, *Zymoseptoria* i *Sphaerulina* ali i sekvence odgovarajućih autgrupa dostupnih u GenBank bazi podataka. Analizom sekvenci ITS regiona rDNA nije bilo moguće rekonstruisati filogenetsko stablo sa priznatim i usaglašenim međuodnosima između navedenih vrsta i rodova. Kako sekvence ITS regiona rDNA nisu bile dovoljno informativne za ispitivanje međuodnosa između vrsta roda *Septoria* i srodnih rodova istraživanja će biti nastavljena dodatnim analizama novih molekularnih markera.

5.7. Virulentnost izolata *Gnomoniopsis idaeicola*

Za ispitivanje virulentnosti izolata *Gnomoniopsis idaeicola* odabrano je ukupno 10 izolata poreklom sa 10 lokaliteta kako bi se ispitalo da li ima razlike između izolata različitog geografskog porekla. Intenzitet simptoma određen je po skali od 0-5 (Slika 42), a stopa virulentnosti izračunata je kao prosek svih ponavljanja.



Slika 42. Skala od 0-5 za ocenu virulentnosti izolata *Gnomoniopsis idaeicola*. 0 - nema vidljivih simptoma; 1 – nekroza na mestu inokulacije; 2 – nekroza do 2 cm oko mesta inokulacije; 3 – nekroza do 4 cm oko mesta inokulacije; 4 – nekroza do 6 cm oko mesta inokulacije; 5 – nekroza preko 6 cm oko mesta inokulacije.

Zabeležene su značajne razlike u intenzitetu simptoma koji su se razvili kao i intenzitetu sporulacije svih ispitivanih izolata *G. idaeicola*, što je potvrđeno statističkom obradom podataka. Primena Kruskal Wallis testa utvrdila je postojanje značajnih razlika ($P < 0.01$) u pogledu veličine nekrotirane zone, zone izbeljivanja kore i formiranja plodonosnih tvorevina između ispitivanih izolata. Dunn's testom koji je odabran za parna poređenja utvrđeno je da postoji razlika između izolata KMI5-15 koji je bio najvirulentniji i izolata KDK28-16 i KKR7-16 koji su bili najmanje virulentni.

Tabela 13. Virulentnost ispitivanih izolata *Gnomoniopsis idaeicola* poreklom iz Srbije

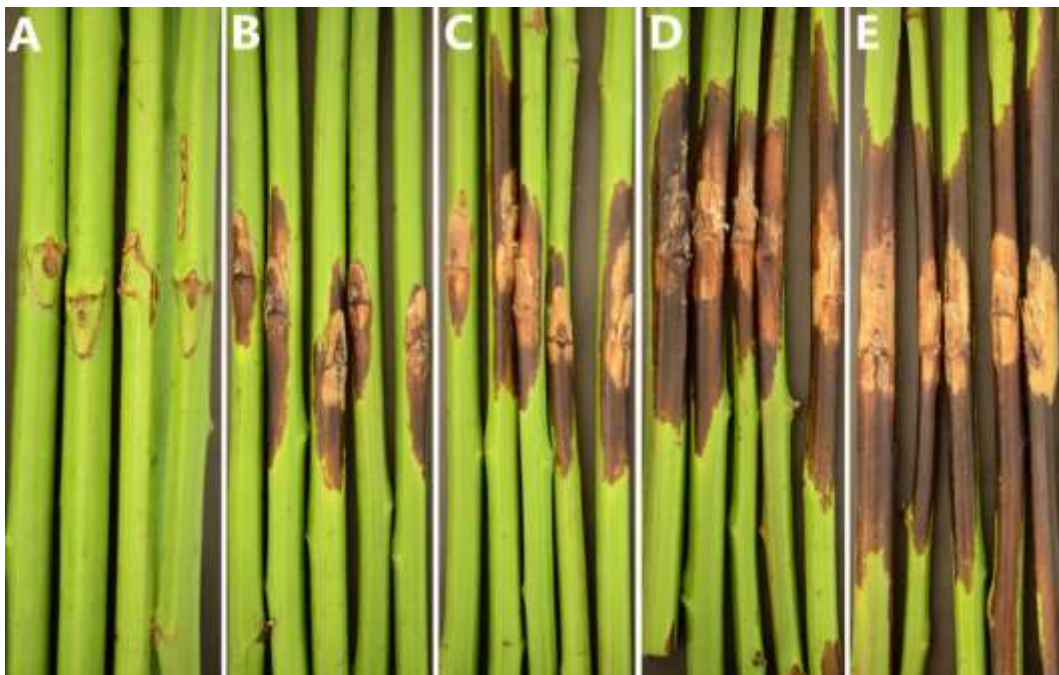
Izolat	Godina izolacije	Lokalitet	Prosečna virulentnost	Sporulacija <i>in vivo</i> ^c
KMI5-15	2015	Miokus	5.0 ^a A ^b	intenzivna
KRU9-15	2015	Ruma	3.8 AB	intenzivna
KZAI1-15	2015	Zaječar	3.6 AB	intenzivna
KPK10-16	2016	Prokuplje	3.6 AB	umerena
KNEI7-15	2015	Negotin	3.2 AB	umerena
KAR2-16	2016	Arilje	3.2 AB	umerena
KMS4-14	2014	Mišar	2.8 AB	slaba
KVR2-14	2014	Vrbovac	2.6 AB	slaba
KDK28-16	2016	Donja Kamenica	2.4 B	slaba
KKR7-16	2016	Kragujevac	1.6 B	slaba
KSV1-16	2016	Svilajnac	-	-

^aProsečna virulentnost poređana opadajućim redosledom;

^bVrednosti obeležene istim slovom ne razlikuju se statistički značajno ($P > 0.05$);

^cIntenzitet sporulacije procenjen na osnovu broja piknida formiranih na veštački zaraženim reznicama stabla kupine 14 dana posle inokulacije: intenzivna – veliki broj piknida raspoređenih celom širom nekrotiranih površina; umerena – srednji broj piknida koji su se formirali oko mesta inokulacije; slaba – svega nekoliko piknida formirano ili nije došlo do sporulacije u svim ponavljanjima.

Najjaču virulentnost ispoljio je izolat KMI5-15 (prosečna ocena 5) (Slika 43E), koji je prouzrokovao formiranje velikih tamno sivih nekrotiranih zona (do 12 cm dužine), sa izbeljivanjem kore od preko 3 cm oko mesta inokulacije, kao i formiranje velikog broja crnih piknida. Sa druge strane najslabiju virulentnost ispoljili su izolati KDK28-16 (prosečna ocena 2,4) i KKR7-16 (prosečna ocena 1,6) (Slika 43B), koji prouzrokuju nekrozu samo u zoni inokulisanog isečka i koji su formirali mali broj piknida, i to ne u svim ponavljanjima (Tabela 13). Svi ostali izolati ispoljili su određene razlike (prosečne ocene kreću se od 2,6 do 3,8) (Tabela 13), međutim one nisu bile statistički značajne ($P > 0.05$).



Slika 43. *Gnomoniopsis idaeicola*: Razlike u virulentnosti pojedinih izolata. A – negativna kontrola; B – slaba virulentnost (izolat KKR7-16); C – D umerena virulentnost (izolati KPK10-16 i KZAI1-15); E – jaka virulentnost (izolat KMI5-15)

6.0 DISKUSIJA

6.1. Uočeni simptomi bolesti stabla kupine u polju

Rezultat ovog istraživanja je identifikacija 10 gljiva prouzrokovaca bolesti stabla kupine u Srbiji i to *Paraconiothyrium fuckelii*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Septoria* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe betulae* i *Neofusicoccum parvum*. Kao prouzrokovaci bolesti kupine u Srbiji prvi put su opisane *G. idaeicola*, *Septoria* spp., *C. kahawae*, *Diaporthe eres*, *D. betulae* i *N. parvum*, dok je masovna pojava *G. idaeicola* na kupini prvi zabeležen slučaj u svetu. Takođe vrsta *D. betulae* prvi put je opisana na kupini kao domaćinu. Najrasprostranjenije i najznačajnije bile su *P. fuckelii* i *G. idaeicola* prisutne u polovini pregledanih zasada, najčešće na sorti Čačanska bestrna. Tokom obilaska terena i sakupljanja uzoraka uočeni su raznovrsni simptomi bolesti stabla kupine. Uglavnom su se javljali u vidu nekrotične pegavosti mrke, braon, braon-crvene ili crvenkaste boje. Pege su uglavnom bile izdužene, oivičene crvenkastim ili purpurnim marginama tamnije u centralnom delu. Veličina pega znatno je varirala, a usled njihovog uvećanja i spajanja mogle su da prekriju i čitave internodije. Starenjem zaraženog tkiva uglavnom je dolazilo do izbeljivnja i pucanja kore. Sporulacija patogena u okviru zaraženog tkiva uglavnom je bila prisutna. Identifikacija patogena na osnovu opisanih simptoma uglavnom nije bila moguća jer su simptomi uzrokovani različitim patogenima bili bar donekle slični.

Paraconiothyrium fuckelii široko je rasprostranjena i značajna vrsta u Srbiji ustanovljena u polovini pregledanih zasada kupine. Javljala se u pojedinačnim ali još češće u mešanim zarazama sa većinom ostalih vrsta detektovanih u ovim istraživanjima, a najčešće sa *Gnomoniopsis idaeicola*. Uočeni simptomi veoma podsećaju na one koje uzrokuju drugi patogeni stabla kupine, a pre svega oni koje uzrokuju *G. idaeicola* i *Botryosphaeria* spp. što je u saglasnosti sa ranije publikovanim opisima (**Arsenijević**, 2006b; **Martin et al.**, 2017). Zaraza sa *P. fuckelii* praćena je pojavom nekrotičnih pega braon ili braon-crvene boje sa upadljivom ljubičastom ivicom. Pege se vremenom uvećavaju kora starenjem puca, mogu i da prstenasto obuhvate stablo. Ovaj patogen detektovan je na sortama Čačanska bestrna, Thornfree i Chester Thornless sa incidencom bolesti do 70% (odnosno 55% u zasadu na lokalitetu Leskovac gde je to bio jedini

detektovani patogen). Nije bilo moguće ustanoviti vezu između incidence bolesti i sorte kupine ili starosti zasada. Tako je u zasadima sorte Čačanska bestrna utvrđena kako niska tako i visoka incidenca bolesti stabla (10 – 70%), dok je na sorti Thornfree incidenca bolesti bila 25 i 35%, odnosno na sorti Chester Thornless 70%. Veza između starosti zasada i nivoa zaraze nije potpuno jasna. Sa jedne strane sličan nivo zaraze javljao se i u mlađim i u starijim zasadima, a sa druge strane u mladom zasadu na lokalitetu Leskovac zabeležena je viša incidenca bolesti nego u starijem zasadu na lokalitetu Brus. Ovo ukazuje na moguće širenje patogena sadnim materijalom. U nekim pregledanim zasadima nije bilo infekcije ili je detektovan veoma nizak nivo bolesti uzrokovan sa *P. fuckelii* bez obzira na starost zasada i sortu kupine. Iako postoje podaci o prisustvu *P. fuckelii* na biljakama kupine u Srbiji i svetu (Arsenijević, 2006b; Martin et al., 2017), nema dostupnih literaturnih podataka o štetama koje ova vrsta pričinjava u proizvodnji kupine. Postoje navodi da masovnijoj pojavi i većim štetama pogoduje prisustvo povreda i rana na biljakama ali bez preciznijih procena (Williamson and Hargreaves, 1978; Seemüller et al., 1978; Martin et al., 2017). Rezultati ovih istraživanja pružaju prvi uvid u rasprostranjenost *P. fuckelii* u proizvodnim područjima Srbije.

Tokom ovih istraživanja *Gnomoniopsis idaeicola* je po prvi put dokazan kao patogen kupine u Srbiji. Ovo je prva zabeležena masovna pojava bolesti na gajenoj kupini izazvana sa *G. idaeicola* u proizvodnom području Evrope i sveta. Ova istraživanja pokazala su da se *G. idaeicola* u Srbiji ističe prema svojoj rasprostranjenosti, štetnosti i značaju. Patogen je bio prisutan u pojedinačnim, ali češće u mešanim zarazama sa većinom drugih patogena obuhvaćenim ovim istraživanjima i to najčešće sa *Paraconiothyrium fuckelii* i *Botryosphaeria dothidea*. Detektovan je gotovo u polovini pregledanih zasada sa simptomima nekrotičnih pega na internodijama i nodusima, braonkasto-crvene, tamnocrvene ili sivo-crne boje sa upadljivom ljubičastom marginom. Starenjem dolazi do izbeljivanja pega i nekrotičnih površina. Osim što je detektovana na velikom broju lokaliteta *G. idaeicola* bila je prisutna na tri od pet sorti kupine obuhvaćenih pregledom sa umerenom do visokom incidencom bolesti (do 80% zaraženih biljaka). Ovako široka rasprostranjenost kao i visoka incidenca bolesti ukazuju da prisustvo *G. idaeicola* na teritoriji Srbije nije rezultat neke skorije introdukcije već je ovaj patogen najverovatnije prisutan već duži vremenski period. Može se pretpostaviti da postoje najmanje dva razloga zašto ovako rasprostranjen i značajan patogen u našoj zemlji nije

detektovan do sada. Pre svega *G. idaeicola* ne prouzrokuje pojavu specifičnih simptoma na listu i stablu kupine, tako da su simptomi verovatno pripisivani drugim, od ranije poznatim patogenima. Simptomi izazvani sa *G. idaeicola* liče na simptome koje izazivaju *P. fuckelii* i *B. dothidea* (Arsenijević, 2006b; Martin et al., 2017). Sa druge strane, proizvodnja kupine u Srbiji je u ekspanziji poslednjih decenija i brzo se širi. Samo u periodu od 1997. do 2005. godine površine pod kupinom su utrostručene. Uporedo sa brzim širenjem proizvodnje došlo je i do promene u sastavu sortimenta, a domaća sorta Čačanska bestrna postala je dominantna zauzimajući oko 60% proizvodnih površina pod kupinom u Srbiji (Nikolić and Milivojević, 2015). Verovatno je tokom tog dinamičnog perioda došlo do podizanja izvesnog broja zasada korišćenjem sadnog materijala koji nije kontrolisan i čiji je zdravstveni status kompromitovan. Sve ovo verovatno je uticalo na masovno širenje gljive *G. idaeicola* koja je danas, kako pokazuju ova istraživanja, značajan prouzrokovatelj bolesti kupine u Srbiji.

Iako ne postoje podaci o ekonomskom značaju i štetnosti bolesti koje prouzrokuje *G. idaeicola* koji bi se uporedili sa drugim prouzrokovateljima bolesti (Martin et al., 2017), rezultati ovih istraživanja ukazuju da je ovaj patogen sposoban da ozbiljno ugrozi proizvodnju kupine kako u Srbiji tako i drugde u svetu i da dovede do gubitaka koji dovode u pitanje rentabilnost proizvodnje. Jedini podatak o proceni gubitka prinosa kupine koji se može povezati sa *G. idaeicola* pružili su Mirhosseini et al. (2015) u Iranu. Mada imenuju prouzrokovatelja kao *Gnomoniopsis* sp. sa velikom verovatnoćom da se radi o vrsti *G. idaeicola*, navode da je nekroza lišća i uvenuća biljaka kupine u Iranu dostizalo incidencu od 80% sa uginućem oko 30% biljaka i gubitkom prinosa koji je procenjen na 50 – 80%. Slična situacija u pogledu incidence bolesti, propadanja biljaka i gubitka prinosa zabeležena je i tokom ovih istraživanja u Srbiji. Utvrđena je incidenca bolesti do 80%, a veći broj proizvođača tvrdio je da su pretrpeli velike gubitke. Najznačajnija pojava bolesti i najveći gubici zabeleženi su u mladom zasadu kupine sorte Loch Ness na lokalitetu Svilajnac, gde je učestalost bolesti procenjena na 70%, što je praćeno uginućem oko 40% biljaka i smanjenjem prinosa od oko 50%.

G. idaeicola je dokazana na tri od pet sorti kupine i to na domaćoj sorti Čačanska bestrna kao i na dve strane sorte, Loch Ness i Thornfree. Dostupni podaci o krugu domaćina i reakciji različitih sorti na infekciju vrstama iz roda *Gnomoniopsis*, a posebno sa *G. idaeicola*, ograničeni su i nema preciznijih opisa (Sogonov et al., 2008; Walker et

al., 2010). Istraživanje u okviru ove disertacije pruža prve podatke o reakcijama nekoliko različitih sorti kupine na infekciju sa *G. idaeicola*. Kako sorte kupine nisu podjednako zastupljene u proizvodnim područjima Srbije, tako nisu zastupljene sa podjednakim brojem uzoraka u ovim istraživanjima. Zbog toga samo pojedini aspekti koji se odnose na interakciju sorte i patogena mogu biti razmotreni. Na osnovu zapažanja sa terena može se zaključiti da sorta i starost zasada nemaju značajan uticaj na nivo infekcije kupine sa *G. idaeicola* u Srbiji. Tako je u zasadima domaće sorte Čačanska bestrna, kao i strane sorte Loch Ness utvrđena visoka incidenca bolesti prouzrokovane sa *G. idaeicola*. Sa druge strane, kada govorimo o uticaju starosti zasada, ustanovljeno je da je i u mladim zasadima (lokalitet Svilajnac) i u starijim zasadima (lokalitet Miokus) zabeležena podjednako visoka incidenca bolesti. Nasuprot tome, jedan broj pregledanih zasada kupine bio je bez ili sa slabom incidencom bolesti *G. idaeicola*, bez obzira na sortu i starost zasada. Iz dobijenih rezultata i zapažanja nije moguće ustanoviti postojanje pozitivne ili negativne korelacije između sorte i starosti zasada i incidence bolesti izazvane vrstom *G. idaeicola* u Srbiji. Moguće je osnovano pretpostaviti da je *G. idaeicola* u nova proizvodna područja introdukovana putem zaraženog sadnog materijala, dok se širenje patogena u okviru zasada, na kraća rastojanja od biljke do biljke, verovatno odvija pomoću vode, prenošenjem konidija raspršivanjem kapi koje mogu da budu nošene i vetrom na kraća rastojanja. Da bi se razumela epidemiologija bolesti koja je veoma kompleksna i uključuje složene aspekte kao što su uticaj starosti biljaka i predispozicije sorte, kao i strategije širenja patogena, neophodne su dodatne informacije o biologiji *G. idaeicola*, kako iz Srbije tako i iz drugih proizvodnih područja u svetu.

U 10 od 24 pregledana zasada kupine detektovani su izolati identifikovani kao nepoznate vrste roda *Septoria*. Ovo je prvi nalaz da je neka gljiva iz roda *Septoria* prouzrokovatelj bolesti kupine u Srbiji. *Septoria* spp. javila se kako u pojedinačnoj infekciji (lokaliteti Knjaževac na sorti Čačanska bestrna, Donja Kamenica na sorti Loch Ness, i Ivanjica na sortama Čačanska bestrna i Loch Ness) tako i u mešanoj infekciji sa drugim patogenima, a najčešće sa *Paraconiothyrium fuckelii*. Patogen je detektovan na domaćoj sorti Čačanska bestrna i stranoj sorti Loch Ness, dok na sortama Thornfree, Chester Thornless i Triple Crown nije utvrđeno njegovo prisustvo. Ova vrsta prouzrokovala je pojavu okruglastih pega crvene ili tamnozeleno boje koje vremenom dobijaju tamniju crvenu boju. Starenjem pege u centralnom delu postaju braonkaste, dok zadržavaju

upadljivu purpurnu marginu. Incidenca bolesti u zasadima zaraženim sa *Septoria* spp. bila je od 5 do 50%. Nije utvrđena ni pozitivna ni negativna korelacija između sorte i starosti zasada kupine sa nivoom infekcije *Septoria* spp. u Srbiji. Tako je incidenca bolesti bila veoma različita u zasadima iste starosti (lokaliteti Boljevac i Knjaževac), ali i niža u nekim starijim (lokalitet Ivanjica) nego u nekim mlađim zasadima (lokalitet Donja Kamenica). Nije utvrđeno da je nivo infekcije u korelaciji sa sortom pa je tako u zasadima obe sorte (Čačanska bestrna i Loch Ness) zabeležena približno ista incidenca bolesti, odnosno u zasadima iste sorte incidenca bolesti je varirala. Simptomi prouzrokovani sa *Septoria* spp. veoma su slični i teško odvojivi od simptoma koje na kupini izaziva *Septocya ruborum*, prouzrokovatelj ljubičaste pegavosti kupine (Arsenijević, 1989; Arsenijević i sar., 1989; Babović i Delibašić, 1994; Aleksić et al., 2012; Williamson, 2017b). Ispitivani izolati *Septoria* spp. osim sličnih simptoma ispoljili su veliku sličnost sa *S. ruborum* i u pogledu morfoloških odnosno molekularnih osobina (ispoljili su 100% nukleotidnu identičnost sa jedinom dostupnom sekvencom *S. ruborum* poreklom iz Srbije sa kupine). Međutim, mali broj izolata *S. ruborum* je okarakterisan, a rezultati filogenetskih ispitivanja ovu grupišu u *Septoria sensu stricto* navodeći da status vrste nije konačan (Quaedvlieg et al., 2013). Navedeni autori takođe ukazuju da morfološke osobine *S. ruborum* odgovaraju rodu *Septoria* što je sve u saglasnosti sa rezultatima koje su pružila i ova istraživanja. Dodatne analize neophodne su da bi se identifikacija ispitivanih izolata sprovela do kraja i ustanovila veza sa *S. ruborum*.

Vrsta *Botryosphaeria dothidea* nađena je u 5 od 24 pregledana zasada kupine u mešanim zarazama zajedno sa drugim prouzrokovateljima nekroze stabla i to najčešće sa *Gnomoniopsis idaeicola* i *Paraconiothyrium fuckelii*. Simptomi koje prouzrokuje nisu specifični i veoma liče na one koje uzrokuju drugi patogeni stabla, a pre svega *P. fuckelii* (Arsenijević, 2006b; Martin et al., 2017), kao i *G. idaeicola*, *Diplodia seriata*, i *Neofusicoccum parvum*, što dodatno otežava postavljanje dijagnoze. *B. dothidea* izazvala je pre svega pojavu nekrotičnih pega tamnobraon ili crvenkaste boje koje starenjem dobijaju svetlosivu boju u centru praćenu pucanjem kore i sporulacijom patogena, što je u saglasnosti sa ranije opisanim simptomima (Arsenijević, 2006b; Smith and Maas, 2017). *B. dothidea* izolovana je u zasadima sorti Čačanska bestrna, Chester Thornless i Thornfree sa incidencom bolesti od 25 do 70%. Na osnovu zapažanja u polju može se reći da sorta i starost zasada nisu značajno uticali na incidencu bolesti. Tako je visoka

incidenca bolesti zabeležena kako kod domaće sorte Čačanska bestrna (lokalitet Kragujevac) tako i kod strane sorte Chester Thornless (lokalitet Miokus), odnosno niža incidenca zabeležena je kod domaće sorte Čačanska bestrna (lokalitet Ruma) kao i kod strane sorte Thornfree (lokalitet Donja Kamenica). **Maas and Uecker** (1984) ustanovili su da postoji značajan uticaj sorte na nivo bolesti uzrokovane sa *B. dothidea* ispitujući šest različitih sorti kupine (Dirksen Thornless, Smoothstem, Black Satin, Thornfree i Hull Thornles) i koristeći dva različita tipa ocene u uslovima polja i prirodne infekcije. Sorta Dirksen Thornless ocenjena je kao najotpornija, a Smoothstem kao najmanje otporna. **Stewart et al.** (2003; 2005) ispitivali su otpornost 11 sorti kupine (Apache, Arapaho, Chester Thornless, Chickasaw, Illini Hardy, Kiowa, Navaho, Ouachita, Prime-Jim™, Shawnee i Triple Crown) na *B. dothidea* veštačkom inokulacijom reznica stabla. Kako su različite sorte neravnomerno prisutne u proizvodnji u Srbiji, a time i neujednačeno zastupljene u broju uzoraka obuhvaćenih istraživanjima, za detaljniju ocenu o njihovoj osetljivosti u prirodnim uslovima, neophodno je obaviti dodatna istraživanja.

Na osnovu zapažanja u polju nije bilo moguće oceniti uticaj *B. dothidea* na smanjenje prinosa ili pojavu drugih šteta jer se nije javila u pojedinačnim već uvek u mešanim zarazama. Osim na kupini u Srbiji je detektovana na šumskim, ukrasnim biljkama i uskladištenim plodovima jabuke (**Karadžić i sar.**, 2000; **Milijašević i Karadžić**, 2003; **Arsenijević**, 2006b; **Vasić et al.**, 2013), dok je u svetu poznato da zaražava još breskvu, vinovu lozu, borovnicu i maslinu (**Stewart et al.**, 2003; **Phillips et al.**, 2005; **Jiye et al.**, 2012). Ne postoje podaci o štetnosti i rasprostranjenosti *B. dothidea* na kupini u Srbiji osim navoda koji je dao **Arsenijević** (2006b) da je ovaj patogen često izolovan iz uzoraka iz zapadne Srbije pa rezultati ovih istraživanja pružaju prve podatke o prisustvu ovog patogena u centralnoj i istočnoj Srbiji. **Smith and Maas** (2017) *B. dothidea* karakterišu kao destruktivnog patogena na bestrnim sortama kupine sposobnog da proizvodnju kupine učini neisplativom do te mere da dovede do krčenja čitavih zasada, napuštanja proizvodnje ili podizanja zasada otpornijih sorti. *B. dothidea* je u ovim istraživanjima bila široko rasprostranjena u Srbiji, kako geografski tako i na različitim sortama kupine, što nedvosmisleno ukazuje na sposobnost patogena da se masovno javi i dovede do ekonomski velikih gubitaka. Osim toga, *B. dothidea* je patogen većeg broja biljaka, što povećava verovatnoću pojave bolesti čak i izvan proizvodnih područja kupine usled postojanja raznovrsnih izvora infekcije.

Diplodia seriata nađena je u 4 od 24 zasada kupine sorti Čačanska bestrna i Chester Thornless (incidenca 20 - 70%), isključivo u mešanim zarazama, a najčešće sa *Paraconiothyrium fuckelii*. Simptomi koje izaziva veoma liče na simptome izazvane drugim gljivama pre svega sa *P. fuckelii* (Arsenijević, 2006b; Martin et al., 2017), kao i *Gnomoniopsis idaeicola*, *Botryosphaeria dothidea* i *Neofusicoccum parvum*. Nekrotične pege tamnobraon ili crvenkaste boje vremenom postaju svetlije u sredini što je praćeno pucanjem kore i prstenastim obuhvatanjem stabla. *D. seriata* parazitira veliki broj drvenastih biljaka iz rodova *Malus*, *Pyrus*, *Prunus*, *Morus*, *Juglans*, *Ribes*, *Rubus*, *Rosa*, *Vaccinium*, *Vitis*, *Citrus* i dr. (Farr et al., 1989) dok je u Srbiji poznata kao patogen kupine, jabuke, vinove loze i paulovnije (Arsenijević, 2006b; Stojanović i sar., 2003; Gajić i sar., 2006; Milijašević, 2009). Kako je uvek pronađena u mešanim zarazama u zasadima, *D. seriata* u Srbiji predstavlja deo kompleksa vrsta prouzrokovaca bolesti stabla kupine i tako doprinosi nastanku šteta. Međutim, poznato je da *D. seriata* može da prouzrokuje ozbiljne zaraze kupine (SAD, Ohajo) sa incidencom bolesti od skoro 100% i tako izazove masovno sušenje biljaka što je za posledicu imalo čak i krčenje čitavih zasada (Ellis et al., 1984). U literaturi nema podataka o štetnosti i rasprostranjenosti *D. seriata* u proizvodnji kupine u Srbiji pa rezultati ovih istraživanja pružaju prvi uvid u rasprostranjenost ovog patogena u proizvodnim područjima Srbije.

Botrytis cinerea bila je prisutna u 3 od 24 pregledana zasada kupine u mešanim zarazama najčešće sa *Gnomoniopsis idaeicola* i *Paraconiothyrium fuckelii*. Simptomi na vegetativnim izdancima bili su u vidu braonkastih pega koje su ponekad bile sa izraženim koncentričnim šarama. Tokom zime dolazilo je i do izbeljivanja zaražene kore. Opisani simptomi bili su u saglasnosti sa prethodno opisanim simptomima koje *B. cinerea* prouzrokuje na stablu kupine kako u Srbiji (Arsenijević, 2006b) tako i u svetu (Williamson, 2017f). Ne postoje dostupni literaturni podaci o uticaju sorte ili starosti zasada kupine na nivo infekcije sa *B. cinerea*, kao ni o štetama na kupini usled zaraze stabla. Kako u ovim istraživanjima nije zabeleženo prisustvo *B. cinerea* u pojedinačnim zarazama nije bilo moguće doneti zaključak o direktnoj štetnosti ovog patogena kao uzročnika nekroze stabla kupine. U Srbiji i svetu *B. cinerea* je veoma značajan i destruktivan patogen plodova kupine sposoban da u potpunosti uništi rod (Tanović et al., 2014; Williamson, 2017f). *B. cinerea* opisana je kao prouzrokovac nekroze stabla kupine

u Srbiji ali su osim simptoma i morfologije izolovanog patogena ostali aspekti ovih zaraza nepoznati (**Arsenijević**, 2006b).

Prisustvo gljive *Colletotrichum kahawae* utvrđeno je u 3 od 24 zasada kupine u mešanim infekcijama sa većinom vrsta otkrivenih u ovim istraživanjima, a pre svega sa *Paraconiothyrium fuckelii* i *Botryosphaeria dothidea*. U dva zasada sorte Čačanska bestrna i jednom zasadu sorte Loch Ness incidenca bolesti kretala se od 40 – 70%. Patogen prouzrokuje pojavu crvenih do ljubičastih, najčešće eliptičnih pega, i po svom izgledu veoma su slične pegama koje izazivaju *Septoria* spp. Vrste iz roda *Colletotrichum* značajni su prouzrokovaci bolesti kupine u svetu. U Južnoj Americi, pre svega u Kolumbiji, prouzrokovaci antraknoze kupine iz roda *Colletotrichum* predstavljaju limitirajući faktor u proizvodnji koji može da dovede do uništavanja i krčenja mnogih zasada (**Rueda-Hernandez et al.**, 2013; **Afanador-Kafuri et al.**, 2014). **Rueda-Hernandez et al.** (2013) identifikovali su *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* kao prouzrokovace bolesti stabla kupine u Severnoj Kolumbiji. Filogenetskom analizom zasnovanom na sekvancama ITS regiona rDNA utvrdili su da su izolati koji su klasifikovani kao *C. gloeosporioides* 100% identični izolatima vrste *C. kahawae* koja pripada *C. gloeosporioides* kompleksu. Osim navedenih vrsta **Afanador-Kafuri et al.** (2014) kao patogene stabla kupine navode i *C. boninense*, *C. karstii* (boninense kompleks), *C. fructicola*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro* (gloeosporioides kompleks), *C. godetiae*, i *C. brassicicola* (acutatum kompleks). Navedeni patogeni mogu da dovedu do velikih gubitaka u prinosu od 50 – 76 % pa čak i do 100% (**Tamayo**, 2001; **Forero de La-Rotta et al.**, 2002; **Rueda-Hernandez et al.**, 2013). Pošto je u Srbiji bila prisutna u mešanim zarazama sa drugim patogenima nije bilo moguće proceniti štetnost *C. kahawae* u pregledanim zasadima. Ovo je prvi nalaz gljive *C. kahawae* ali i uopšte patogena iz roda *Colletotrichum* na kupini u Srbiji. Ne postoje podaci da su gljive iz ovog roda prouzrokovaci bolesti na gajenoj kupini u Srbiji iako su vrste iz kompleksa gloeosporioides opisane kao patogeni višnje, jabuke, kruške, jagode, šljive, tikvice, bršljena, kantariona i bele imele (**Arsenijević**, 1984; **Stojanović**, 1989; **Stojanović i sar.**, 2002; **Trkulja**, 2004; **Ivanović**, 2006; **Ivanović i sar.**, 2007; **Živković**, 2009; **Živković i sar.**, 2008a; **Živković i sar.**, 2008b; **Živković i sar.**, 2012). Taksonomska pozicija *C. kahawae* nije u potpunosti razjašnjena. *C. kahawae* obuhvata dve podvrste, *C. kahawae* subsp. *kahawae* podvrstu usko specijalizovanog parazita kafe, i *C. kahawae* subsp.

ciggaro koji nije parazit kafe i ima širi krug domaćina. Ove dve podvrste morfološki i molekularno jako su slične mada rezultati istraživanja populacione genetike, evolucije i patogenih osobina ukazuju da se radi o dva ekološki i reproduktivno zasebna entiteta (**Batista et al.**, 2017). Buduća istraživanja i bliže određivanje taksonomske pozicije dobijenih izolata uključivanjem dodatnih molekularnih markera i ispitivanja kruga domaćina neophodna su da bi se shvatio položaj ispitivanih izolata *C. kahawae* u odnosu na pomenute podvrste.

Vrsta *Diaporthe betulae* detektovana je u 2 od 24 pregledana zasada kupine i to u mešanim zarazama sa drugim vrstama obuhvaćenim ovim istraživanjima, a najčešće sa *Gnomoniopsis idaeicola*. Ovo je prvi nalaz *D. betulae* kao prouzrokovala bolesti kupine u svetu. Prema dosadašnjim saznanjima i dostupnim literaturnim izvorima jedini poznati domaćin *D. betulae* je *Betula platyphylla* i do sada nije opisana ni na jednoj drugoj biljci domaćinu (**Du et al.**, 2016). S obzirom da je ovo novoformirana vrsta, da je okarakterisan veoma mali broj izolata (**Du et al.**, 2016), kao i činjenice da vrste roda *Diaporthe* uglavnom imaju širi krug domaćina (**Dissanayake et al.**, 2017b), neophodna su dodatna istraživanja većeg broja izolata kako bi se utvrdio značaj ovog nalaza. *D. betulae* izaziva pojavu izduženih eliptičnih pega na stablu kupine sa jasnom purpurnom marginom i nekrotičnim centralnim delom u okviru koga dolazi do izbeljivanja i uzdužnog pucanja kore. Incidenca bolesti u zasadima sorti Thornfree i Čačanska bestrna bila je 35 odnosno 45%. Kako je patogen nađen u samo dva zasada nije bilo moguće izvesti zaključak da li sorta i starost zasada imaju uticaja na incidencu bolesti u polju. **Arsenijević** (2006a) je na osnovu simptoma i morfoloških karakteristika identifikovao *Phomopsis* spp. kao bitne prouzrokovala nekrotične pegavosti i izumiranja izdanaka kupine navodeći da je prema učestalosti i ekonomskom značaju ovo najverovatnije treća mikoza kupine u Srbiji. Međutim, identifikacija patogena nije izvršena do kraja, a morfološke karakteristike samo su delimično opisane. Detaljan opis kolonija i bespolnih tvorevina nedostaju pa nije moguće ove nalaze povezati sa rezultatima dobijenim u ovim istraživanjima. Ipak **Arsenijević** (2006a) navodi da se razvilo dva tipa kolonija ukazujući da se možda radi o dve vrste iz roda *Phomopsis*, što je nalaz sličan rezultatima ovih istraživanja u kojima su dve vrste ovog roda identifikovane kao patogeni kupine.

U 1 od svih pregledanih zasada kupine (sorta Čačanska bestrna) detektovana je vrsta *Diaporthe eres* u mešanoj zarazi sa *Paraconiothyrium fuckelii*, *Botryosphaeria*

dothidea, i *Colletotrichum kahawae*. Simptomi su bili u vidu izduženih eliptičnih ili veoma izduženih pega oivičenih purpurnom marginom i nekrotičnim centralnim delom u okviru koga dolazi do izbeljivanja i uzdužnog pucanja kore. Ovo je prvi nalaz *D. eres* na kupini u Srbiji, mada prema rezultatima **Arsenijević** (2006a) verovatno predstavlja jedan od dva tipa izolata *Phomopsis* spp. koji su tada detektovani. *D. eres* u Srbiji je već opisana na većem broju domaćina uključujući soju, ružu, šljivu, dunju, kantarion i paulovnicu (**Milijašević**, 2005; **Milijašević**, 2009; **Živković et al.**, 2012a; **Pavlović i sar.**, 2012; **Petrović et al.**, 2015; **Ristić et al.**, 2016). U svetu *D. eres* opisana je kao prouzrokovatelj bolesti na kupini jedino u Hrvatskoj u zasadima sorte Thornfree. Bolest se manifestovala u vidu beličastih zona između ili oko nodusa sa zabeleženom incidencom bolesti od 1 do 15% (**Vrandečić et al.**, 2011). Ne postoje podaci o štetnosti ove vrste na kupini kako kod nas tako ni u svetu. Kako se javila samo u jednom zasadu i to u mešanim zarazama ne može se doneti zaključak o štetnosti kao ni o uticaju sorte i starosti zasada na nivo infekcije sa *D. eres*. Međutim, usled široke rasprostranjenosti i velikog broja domaćina na kojima se javlja ova vrsta ima potencijal da u povoljnim uslovima prouzrokuje značajne infekcije.

Prisustvo *Neofusicoccum parvum* utvrđeno je u jednom zasadu sorte Čačanska bestrna na lokalitetu Zaječar sa incidencom bolesti od 60%. Patogen se javio u mešanoj zarazi sa *Gnomoniopsis idaeicola* i *Paraconiothyrium fuckelii*. Nekrotične pege tamnobraon ili cvene boje formiraju se najčešće oko nodusa, mogu i da prstenasto obuhvate stablo, a starije pege u središnjem delu postaju svetlije beličasto-sive boje. Simptomi koje prouzrokuje *N. parvum* veoma su slični onima koje izazivaju *Botryosphaeria dothidea* i *P. fuckelii* (**Arsenijević**, 2006b; **Martin et al.**, 2017), kao i *G. idaeicola*. Kako se patogen javio u mešanoj zarazi sa *G. idaeicola* i *P. fuckelii* usled sličnih simptoma nije bilo moguće utvrditi direktnu štetnost ove vrste. Kao prouzrokovatelj bolesti na kupini *N. parvum* je opisana jedino u Italiji (**Faemma et al.**, 2018), dok je ovo prvi nalaz *N. parvum* na kupini u Srbiji što je drugi nalaz u svetu. Ovaj patogen široko je rasprostranjen kao parazit drvenastih biljaka. Ekonomski je najznačajniji na vinovoj lozi i važan deo kompleksa prouzrokovatelja sušenja čokota vinove loze (**Úrbez-Torres et al.**, 2006; **Kaliterna et al.**, 2013). Značajni domaćini su još jabuka, kruška, breskva, kajsija, trešnja, orah, maslina, citrusi i borovnica (**Pennycook and Samuels**, 1985; **Gadgil et al.**, 2005; **Thomidis et al.**, 2011; **Gramaje et al.**, 2012; **Wright et al.**, 2012; **Abdollahzadeh**

et al., 2013; Zhongdong et al., 2015). Iako je izolovan samo u jednom zasadu kupine usled izražene polifagnosti kao i činjenice da je u Srbiji značajan parazit većeg broja drvenastih biljaka (Zlatković, 2016) ovaj patogen poseduje kapacitet da u povoljnim uslovima uzrokuje značajne infekcije kupine.

6.2. Patogene osobine ispitivanih izolata

Provera patogenosti obuhvatila je 10 identifikovanih vrsta i ukupno 52 odabrana izolata (po jedan izolat svake vrste poreklom iz svakog zasada u kojem je nađen). Potvrđena je patogenost svih odabranih izolata koji su ostvarili zarazu i uzrokovali pojavu simptoma koji su uglavnom odgovarali simptomima prirodne zaraze. Iz reprodukovanih simptoma uspešno je obavljena reizolacija čime su zadovoljeni Koh-ovi postulati, a reizolati su korišćeni za dalji rad.

Svi ispitivani izolati *Paraconiothyrium fuckelii* ispoljili su patogenost, a simptomi nekroze kore i srži na inokulisanim reznicama kupine razvili su se 14 dana posle inokulacija. Patogen je formirao brojne piknide u okviru zaraženog tkiva dok je sposobnost sporulacije potvrđena i *in vitro* na PDA podlozi. Većina izolata prouzrokovala je izbeljivanje kore što podseća na simptome koji nastaju u prirodnim zarazama (Williamson, 2017e). Formiranje brojnih piknida sugerše na veliku reproduktivnu sposobnost i potencijal za brzo i efikasno širenje patogena u prirodi uz mogućnost ostvarivanja većeg broja ciklusa u sezoni. Patogenost izolata *P. fuckelii* dokazna je i u drugim istraživanjima. Ellis et al. (1984) ispitivali su patogenost *P. fuckelii* direktnom inokulacijom biljaka u zasadima i to stabala vegetativnih i rodnih izdanaka kupine sorti Thornfree, Dirksen Thornless i Hull Thornless u poljskim uslovima kao i na sorti Thornfree u testovima sprovedenim u zaštićenom prostoru. Patogenost *P. fuckelii* dokazana je u oba testa, na sve tri sorte, kako na vegetativnim tako i na rodnim izdancima. Rodni izdanci ispoljili su veću osetljivost od vegetativnih, a ustanovljen je i značajan uticaj sorte na nivo infekcije. Kako je u istraživanjima u okviru ove disertacije patogenost proveravana inokulacijom reznica stabla vegetativnih izdanaka kupine sorte Čačanska bestrna nije moguće zaključiti da li postoje razlike u osetljivosti različitih sorti odnosno vegetativnih i rodnih izdanaka. Slično prethodnim istraživanjima Williamson et al. (1986) dokazali su patogenost *P. fuckelii* inokulacijom stabla i utvrdili da postoji razlika u nivou

infekcije maline u zavisnosti od geografskog porekla izolata (SAD, Velika Britanija i Nemačka), kao i u zavisnosti od sorte maline. Osim kupine, maline i ruže kao domaćini *P. fuckelii* u literaturi pominju se još jabuka, kruška, jagoda, borovnica, ribizla i ogrozd (Alfieri, 1969; Humphreys, 1975; Williamson, 2017e).

Svi ispitivani izolati *Gnomoniopsis idaeicola* ispoljili su patogenost sa jasno izraženim simptomima nekroze kore i srži na inokulisanim reznicama nakon kratkog perioda inkubacije. Formiranje brojnih piknida 14 dana od inokulacije slično je prirodnim infekcijama gde takođe dolazi do formiranja piknida što nedvosmisleno ukazuje na veliki potencijal za više sekundarnih infekcija tokom sezone kao i potencijal za moguće brzo širenje u prirodi i masovnu pojavu bolesti. Zanimljivo je da su pojedini izolati *G. idaeicola* ispoljili neobičnu neusaglašenost između intenziteta sporulacije u tkivu domaćina i u kulturi. Najveći broj piknida formirao se u kori reznica inokulisanih izolatom KMI5-15, međutim ovaj izolat ispoljio je odloženu i prilično oskudnu sporulaciju *in vitro* na PDA podlozi. Sa druge strane, izolat KKR7-16 ispoljio je potpuno suprotno ponašanje, odnosno sporulacija na inokulisanim reznicama bila je oskudna ili uopšte nije ni došlo do sporulacije, dok je na PDA podlozi ovaj izolat obilno sporulisao sa brojnim plodonosnim tvorevinama raspoređenim preko cele površine kolonije. Ovakve razlike u sporulaciji koje ispoljavaju neki izolati *G. idaeicola* ukazuju da možda postoji više različitih faktora koji istovremeno utiču na proces sporulacije. *G. idaeicola* je opisana kao patogen biljaka iz roda *Rubus* i to maline (*Rubus idaeus* L.) i srodnih vrsta kao što su *R. nivalis*, *R. pedatus*, *R. procerus*, *R. spectabilis* (Walker et al., 2010; Walker, 2012). Međutim, iako se smatra da *G. idaeicola* ima uzak krug domaćina ograničen na rod *Rubus*, postoje neobjavljeni podaci o njegovoj izolaciji iz *Actinidia deliciosa* iz Novog Zelanda, pšenice iz Francuske (Comby et al., 2016), i *Myrtus communis* iz Španije (Vaz, 2012), ali bez dostupnih podataka o tome kako je identifikacija obavljena i da li je patogenost potvrđena.

Ispitivani izolati vrsta roda *Septoria* ispoljili su patogenost i doveli do pojave jasnih simptoma nekroze kore na inokulisanim reznicama 14 dana posle inokulacije. Nekroza je bila umerena, braon boje. Simptomi nisu bili kao u prirodnim zarazama u vidu crveno-purpurnih pega koje u centralnom delu dobijaju braonkastu nijansu ali zadržavaju purpurnu marginu. Nije došlo do formiranja piknida što nije bilo u saglasnosti sa obilnom sporulacijom i formiranjem plodonosnih tela *in vitro* na PDA podlozi. *Sphaerulina*

westendorpii, prouzrokovatelj septorijske pegavosti kupine na stablu uzrokuje pojavu karakterističnih izduženih pega sa beličastim centrom i braon ili purpurnim obodom nalik antraknoznim pegama (Brannen and Ellis, 2017). Ovo je jedina vrsta u okviru roda *Septoria* koja je prouzrokovatelj bolesti kupine i javlja se jedino na kupini kao domaćinu (Brannen and Ellis, 2017). Utvrđeno je da ne zaražava malinu kako se ranije mislilo dok je smatrana vrstom *Septoria rubi* od koje je izdvojena na osnovu filogenetske analize podržane različitom patogenošću ove dve vrste koje nisu sposobne da prouzrokuju ukrštene zaraze između maline i kupine (Verkley et al., 2013). Ipak *Sphaerulina westendorpii* uzrokuje drugačije simptome u prirodi od onih uzrokovanih sa *Septoria* spp. opisanim u ovom istraživanju. Takav tip simptoma uzrokuje jedino patogen poznat pod nazivom *Septocya ruborum*, prouzrokovatelj ljubičaste pegavosti kupine. U literaturi ova vrsta prepoznata je kao jedan od najznačajnijih patogena kupine (Aleksić et al., 2012). Međutim, jako je malo istraživanja i mali broj okarakterisanih izolata *S. ruborum* pa je status ove vrste još uvek neizvestan. Na osnovu rezultata morfološke i molekularne identifikacije izolata *Septoria* spp. moguće ih je dovesti u vezu sa *S. ruborum*. Aleksić et al. (2012) pružaju rezultate morfološke i molekularne identifikacije *S. ruborum* poreklom sa kupine u Srbiji koji su slični opisanim osobinama izolata *Septoria* spp., a jedina sekvenca *S. ruborum* dostupna u GenBank bazi podataka bila je identična sekvencama *Septoria* spp. generisanim u ovom radu. Slične rezultate zasnovane na filogenetskim istraživanjima prema kojima se vrsta *S. ruborum* svrstava u *Septoria sensu stricto* pružili su Quaedvlieg et al. (2013). Ovi autori navode da je i opisana morfologija *S. ruborum* u vezi sa rodom *Septoria*. Ipak kako je veoma mali broj izolata *S. ruborum* okarakterisan potrebna su detaljnija istraživanja da bi se ustanovila veza između ove vrste i ispitivanih izolata *Septoria* spp., kao i tačna taksonomska pozicija patogena u Srbiji opisanog kao *S. ruborum*.

Ispitivani izolati *Botryosphaeria dothidea* ispoljili su patogenost na inokulisanim reznicama kupine 14 dana posle inokulacije. Simptomi u vidu mrkobraon nekroze oko mesta inokulacije praćeni sporulacijom i izbeljivanjem kore u centralnom delu veoma su podsećali na simptome u prirodi. Patogen je uspešno reizolovan iz simptomatičnih reznica. Kako je do obilne sporulacije došlo u kratkom roku od momenta inokulacije može se zaključiti da *B. dothidea* ima veliki reproduktivni potencijal koji može obezbediti brzo širenje i masovnu pojavu bolesti u prirodi uz ostvarivanje većeg broja zaraza

godišnje. **Maas and Uecker** (1984) inokulacijom stabala kupine sorti Hull Thornless, Dirksen Thornless, Smoothstem, Thornfree, Black Satin i SIUS-68-6-17 dokazali su patogenost *B. dothidea* opisujući pojavu izduženih tamnobraon nekroza 14 dana nakon inokulacije. Proveru patogenosti uradili su na sličan način kao što je to urađeno u ovom istraživanju tako da je sličnost dobijenih rezultata očekivana. Inokulacijom plodova jabuke izolatima *B. dothidea* poreklom sa kupine razvili su se simptomi bele truleži dok su plodovi inokulisani izolatima *Diplodia seriata* ispoljili simptome crne truleži (**Maas and Uecker**, 1984). Ova razlika u ispoljavanju simptoma na inokulisanim plodovima jabuke može imati i dijagnostički značaj što nije obuhvaćeno istraživanjima u okviru ove disertacije. **Maas and Uecker** (1984) utvrdili su različitu otpornost sorti Hull Thornless, Dirksen Thornless, Smoothstem, Thornfree, Black Satin i SIUS-68-6-17 u polju u uslovima prirodne zaraze. Otpornost sorti u Srbiji nije obuhvaćena ovim istraživanjima, a takođe ne postoje dostupni rezultati ispitivanja patogenosti *B. dothidea* na kupini u Srbiji sa kojima bi bili upoređeni rezultati ovog rada. Osim što je značajan patogen kupine u Srbiji (**Arsenijević**, 2006b), *B. dothidea* je patogen šumskih biljaka, ukrasnih biljaka i uskladištenih plodova jabuke (**Karadžić i sar.**, 2000; **Milijašević i Karadžić**, 2003; **Vasić et al.**, 2013).

Svi ispitivani izolati *Diplodia seriata* ispoljili su patogenost na inokulisanim reznicama kupine 14 dana posle inokulacije. Nekroza mrkobraon boje oko mesta inokulacije praćena je sporulacijom i izbeljivanjem kore u centralnom delu što je podsećalo na simptome koji se javljaju u prirodnim infekcijama. Ovim testovima dokazana je i reproduktivna moć patogena koji u kratkom roku formira brojne piknide što u prirodi može da osigura više zaraza godišnje. Slično ovim rezultatima inokulacijom stabla kupine u polju kao i u uslovima staklenika. **Ellis et al.** (1984) potvrdili su patogenost izolata *D. seriata* na vegetativnim i rodnim izdancima kupine sorti Dirksen Thornless, Hull Thornless i Thornfree, a rodni izdanci bili su osetljiviji od vegetativnih. Istraživanja u okviru ove disertacije pružaju prve podatke o patogenosti *D. seriata* na kupini u Srbiji. **Arsenijević** (2006b) naveo je da je osim *B. dothidea* i *D. seriata*, takođe pripadnik familije Botryosphaeriaceae, patogen kupine, ali bez podataka o rasprostranjenosti, patogenosti i morfologiji. *D. seriata* je vrsta sa širokim krugom domaćina koja osim kupine parazitira preko 200 vrsta iz više od 130 familija pretežno drvenastih biljaka (**Farr and Rossman**, 2013). U Srbiji je osim na kupini poznata kao

patogen jabuke, vinove loze i paulovnije (Stojanović i sar., 2003; Gajić i sar., 2006; Milijašević, 2009).

Izolati *Botrytis cinerea* ispoljili su izraženu patogenost na inokulisanim reznicama kupine 14 dana posle inokulacije. Došlo je do pojave mrke nekroze koja se širila oko mesta inokulacije i potpunog sušenja i propadanja reznica. U centralnom delu, oko inokulisanog mesta javila se siva boja ali nije došlo do sporulacije patogena. Simptomi su delimično ličili na one nastale u prirodnim infekcijama ali bez koncentričnih šara i sklerocija koje se formiraju u prirodnim zarazama kupine sa *B. cinerea* (Williamson, 2017f). Nije bilo moguće utvrditi na koji način patogen sporuliše na inokulisanim reznicama odnosno nije utvrđena sporulacija u vidu formiranja konidija i sklerocija u okviru zaraženih nekrotiranih zona što je poznato da se dešava u prirodnim infekcijama kupine sa *B. cinerea* (Williamson, 2017f). Izostanak formiranja sklerocija potvrđen je i *in vitro* na PDA podlozi. *B. cinerea* značajan je patogen plodova kupine sposoban da u potpunosti uništi rod. Osim toga poznato je i da prouzrokuje nekrozu stabla mada ne postoje podaci o štetnosti koju prouzrokuje pojava bolesti na stablu (Arsenijević, 2006b; Williamson, 2017f). Obzirom na izrazito širok krug domaćina (Fernández-Ortuño et al., 2014), široku rasprostranjenost i mnoštvo izvora infekcije, *B. cinerea* predstavlja značajnu pretnju u proizvodnji kupine pre svega kao patogen plodova ali i stabla.

Ispitivani izolati *Colletotrichum kahawae* ispoljili su umerenu patogenost na reznicama kupine 14 dana posle inokulacije prouzrokujući pojavu tamnobraon nekroze oko mesta inokulacije. U okviru nekrotiranog tkiva nije došlo do sporulacije ni do izbeljivanja kore. Simptomi na inokulisanim reznicama donekle su se razlikovali od simptoma u prirodnim zarazama jer je izostalo formiranje crvenih ili purpurnih pega eliptičnog ili okruglastog oblika, a koji su takođe ranije opisani (Rueda-Hernandez et al., 2013). Moguće objašnjenje je da je za formiranje crvenih i ljubičastih pigmenata u i oko zaraženog tkiva bio neophodan duži vremenski period od 14 dana koliko je bilo omogućeno u postavljenom eksperimentu. Afanador-Kafuri et al. (2014) su u sličnom postupku provere patogenosti dokazali patogenost ispitivanih izolata uključujući i *C. kahawae* kroz formiranje nekroza crvenkasto-braon boje koje vremenom postaju ljubičasto-crne. Ovi simptomi slični su onim u prirodnim infekcijama, a takođe došlo je i do formiranja plodonosnih tvorevina 15-25 dana posle inokulacije. Slične rezultate publikovali su i Rueda-Hernandez et al. (2013). U Južnoj Americi prouzrokovali

antraknoze iz roda *Colletotrichum* uključujući i *C. kahawae* značajni su patogeni sposobni da dovedu u pitanje rentabilnost proizvodnje kupine (Tamayo, 2001; Forero de La-Rotta et al., 2002; Rueda-Hernandez et al., 2013). Do danas nije opisano da bolesti stabla kupine u Srbiji prouzokuju vrste roda *Colletotrichum*. Prema raspoloživim podacima u literaturi ovo je prvi nalaz *C. kahawae* ali i uopšte neke vrste iz roda *Colletotrichum* kao prouzrokovača bolesti stabla kupine u Srbiji.

Patogenost svih ispitivanih izolata vrste *Diaporthe betulae* potvrđena je 14 dana posle inokulacije kroz razvoj nekroze mrkobraon boje praćene izbeljivanjem kore i sporulacijum patogena. Simptomi su podsećali na one u prirodnim infekcijama, a iz obolelih reznica izvršena je i reizolacija patogena. Rezultati testova patogenosti potvrdili su da su svi ispitivani izolati *D. betulae* bili veoma agresivni dovodeći do pojave izraženih simptoma bolesti na inokulisanim reznicama kupine uz obilnu sporulaciju pokazujući tako potencijal za masovno širenje uz ostvarivanje većeg broja sekundarnih zaraza godišnje. Ovu vrstu prvi put su opisali Du et al. (2016) na *Betula platyphylla* koja je do danas jedini poznati domaćin ove vrste. *D. betulae* nikada nije opisana niti je poznata kao patogen kupine. Arsenijević (2006a) opisuje nepoznati takson u okviru anamorfnog roda *Phomopsis* kao važnog prouzrokovača bolesti stabla kupine u Srbiji navodeći da se možda radi i o dve različite vrste jer izolati formiraju dva tipa nejednakih kolonija. Međutim, usled nedostatka detaljnih morfoloških opisa i nedovršene identifikacije, nemoguće je povezati ove navode sa izolatima *D. betulae* proučavanim u ovom istraživanju. Ovo su prvi nalazi koji ukazuju da je *D. betulae* prouzrokovač bolesti stabla gajene kupine u svetu. Kako se radi o novo opisanoj vrsti neophodna su dalja istraživanja kako u Srbiji tako i u svetu da bi se odredio krug prirodnih i eksperimentalnih domaćina, izvori inokuluma, načini prenošenja kao i brojni drugi značajni aspekti epidemiologije.

Ispitivani izolat *Diaporthe eres* ispoljio je patogenost sa jasno izraženim simptomima nekroze na inokulisanim reznicama 14 dana posle inokulacije. Tamnobraon nekroza, izbeljivanje kore i sporulacija patogena simptomi su koji liče na prirodne infekcije. Obilna sporulacija u kori inokulisanih reznica kao i obilna sporulacija *in vitro*, potvrđuju značajan reproduktivni kapacitet i mogućnost patogena da se širi i ostvari više sekundarnih zaraza godišnje. Patogenost *D. eres* potvrdili su i Vrandečić et al. (2011) inokulacijom vegetativnih izdanaka kupine sorte Thornfree na sličan način kao što je to urađeno u ovom istraživanju. *D. eres* su kao patogena kupine prvi put opisali Vrandečić

et al. (2011). U Srbiji do ovih istraživanja nije identifikovana kao patogen kupine, ali poznata je kao parazit većeg broja biljaka uključujući soju, ružu, šljivu, dunju, kantarion i paulovnicu (**Milijašević**, 2005; **Milijašević**, 2009; **Živković et al.**, 2012a; **Pavlović i sar.**, 2012; **Petrović et al.**, 2015; **Ristić et al.**, 2016).

Ispitivani izolat *Neofusicoccum parvum* ispoljio je patogenost i prouzrokovao razvoj veoma jasne nekroze 14 dana posle inokulacije. Mrka nekroza praćena obilnom sporulacijom i izbeljivanjem kore veoma je podsećala na simptome koje je patogen prouzrokovao u prirodnim zarazama. Jako izražena patogenost i sporulacija koju ispoljava *N. parvum* nedvosmisleno ukazuje na potencijal za masovnu pojavu i širenje bolesti u prirodi. Slične rezultate dobili su **Faedda et al.** (2018) inokulacijom stabla kupine i reprodukcijom simptoma koji su u velikoj meri ličili na simptome koji su se javili u prirodnim uslovima. Do ovih istraživanja *N. parvum* je kao patogen kupine opisana jedino u Italiji (**Faedda et al.**, 2018). Osim kupine *N. parvum* patogen je većeg broja biljaka uključujući vinovu lozu, jabuku, krušku, breskvu, kajsiju, trešnju, orah, maslinu, citruse, i borovnicu (**Pennycook and Samuels**, 1985; **Gadgil et al.**, 2005; **Úrbez-Torres et al.**, 2006; **Thomidis et al.**, 2011; **Gramaje et al.**, 2012; **Wright et al.**, 2012; **Abdollahzadeh et al.**, 2013; **Zhongdong et al.**, 2015).

6.3. Morfološka karakterizacija ispitivanih osobina

Ispitivanjima morfoloških osobina anamorfa i teleomorfa obuhvaćeno je ukupno 52 izolata svrstanih u 10 morfoloških grupa odnosno identifikovanih vrsta, po jedan reprezentativni izolat iz svake morfološke grupe iz svakog zasada. Proučavane osobine pružile su značajne informacije na osnovu kojih je bilo moguće morfološki razlikovati određeni broj izolovanih vrsta. Međutim, mnoge vrste imaju slične ili varijabilne morfološke osobine tako da je za preciznu i pouzdanu identifikaciju neophodno bilo potvrditi dobijene rezultate molekularnim metodama.

Ispitivani izolati vrste *Paraconiothyrium fuckelii* formirali su pamučasto bele, brzorastuće kolonije, ravnog tipa porasta na PDA podlozi što je bila stabilna karakteristika izolata poreklom iz Srbije. Sposobnost sporulacije bila je izražena kako *in vitro* tako i *in vivo*, međutim nije utvrđena korelacija između sposobnosti sporulacije u kulturi i u biljnom tkivu. *P. fuckelii* formiraju brojne, crne, loptaste piknide kako na PDA

podlozi tako i u kori zaraženih biljaka, a konidije su bile jednoćelijske, loptaste do ovoidne. Intenzitet sporulacije većine ispitivanih izolata bio je umeren. Mikroskopske strukture, piknidi kao i konidije svih ispitivanih izolata *P. fuckelii* bile su uniformne kako u pogledu izgleda tako i u pogledu veličine. Nije utvrđeno formiranje teleomorfog stadijuma na PDA podlozi ni posle 5 meseci gajenja, a takođe nije utvrđeno prisustvo peritecija u obolelim biljkama u polju. **Williamson** (2017e) opisao je formiranje okruglastih piknida i jednoćelijskih konidija koji po izgledu i dimenzijama odgovaraju rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Sa druge strane **Williamson** (2017e) opisuju formiranje peritecija u izumrlim stablima rodnih izdanaka kupine što nije potvrđeno ovim istraživanjima. Moguće je da se polna faza *P. fuckelii* retko javlja u prirodi zbog čega nije pronađena u pregledanim zasadima, dok izostanak formiranja peritecija u kulturi može da ukaže na postojanje kompleksnih faktora koji regulišu sporulaciju. Rezultati ovih istraživanja u skladu su sa morfološkim osobinama anamorfa *P. fuckelii* koje su opisali **Ariyawansa et al.** (2014) i **Williamson** (2017e).

Ispitivani izolati *Gnomoniopsis idaeicola* poreklom sa različitih lokaliteta ispoljili su diverzitet u izgledu kolonija kao i različitu sposobnost sporulacije. Boja kolonija *G. idaeicola* je varijabilna osobina između izolata kako istog tako i različitog porekla (**Walker et al.**, 2010; **Mirhosseini et al.**, 2015). Izolati ispitivani u ovom istraživanju formirali su kolonije bele do bež boje, što je bila stabilna karakteristika izolata *G. idaeicola* poreklom iz Srbije. Sa druge strane ispitivani izolati ispoljili su razlike u tipu (načinu) porasta i u sposobnosti sporulacije *in vitro*. U pogledu tipa porasta izolati *G. idaeicola* ispoljili su značajne razlike, pogotovo u ranijim fazama razvoja kolonije. Definisan je zoniran, ravan i porast tipa ruže. U pogledu sposobnosti sporulacije *in vitro* postojale su značajne razlike između izolata (slaba, umerena i jaka sporulacija). Kako u svetu postoji mali broj okarakterisanih izolata *G. idaeicola*, ovo su prvi rezultati koji ukazuju na diverzitet izolata *G. idaeicola* u pogledu porasta i sporulacije. Nije utvrđena korelacija između sposobnosti sporulacije *in vitro* i *in vivo* i nije poznat razlog ove neusaglašenosti u sporulaciji u kulturi i biljnom tkivu. Do sada ne postoje dostupni literaturni podaci koji govore o variranju u tipu porasta i intenzitetu sporulacije između izolata *G. idaeicola*. Jedini dostupni podaci o sposobnosti sporulacije *Gnomoniopsis* spp. (**Sogonov et al.**, 2008) i izolata *G. idaeicola* poreklom iz Francuske, SAD i Irana (**Walker et al.**, 2010; **Mirhosseini et al.**, 2015) govore da su ispoljili obilnu sporulaciju bez

preciznijeg opisa. Mikroskopske strukture, piknidi kao i konidije svih ispitivanih izolata *G. idaeicola* bile su uniformne kako u pogledu izgleda tako i u pogledu veličine. Morfologija konidija svih ispitivanih izolata odgovarala je karakterističnim osobinama *Gnomoniopsis* spp. (Sogonov et al., 2008). Ne postoje raspoloživi podaci o izgledu i dimenzijama piknida *G. idaeicola* sa kojima bi bili upoređeni piknidi izolata iz ovog istraživanja.

Rezultati istraživanja u Srbiji ukazuju da polna reprodukcija *G. idaeicola* nije uobičajena karakteristika. Nijedan od ispitivanih izolata poreklom iz različitih zasada nije formirao peritecije *in vitro* na PDA podlozi, iako je ovo očekivano i prethodno opisano (Walker et al., 2010). Zbog toga morfologija teleomornog stadijuma *G. idaeicola* proučavana je na uzorcima kupine u kojima je došlo do formiranja polne faze u prirodnim uslovima, u samim zasadima. Pregledom svih 11 zasada kupine u kojima je nađena *G. idaeicola*, formiranje peritecija utvrđeno je samo u jednom zasadu na lokalitetu Miokus. Morfologija polnih tvorevina, peritecija, askusa i askospora slična je i poklapa se sa opisom dostupnim u literaturi (Walker et al., 2010), što je podržano i rezultatima molekularne identifikacije. Epidemiologija gljive *G. idaeicola* nedovoljno je proučena. Podaci vezani za epidemiologiju, posebno za način prezimljavanja kao i značaj različitih izvora inokuluma u svetu ograničeni su na *Gnomoniopsis* kao rod (Walker et al., 2010). Ipak, na osnovu poljskih opažanja, čini se da peritecije imaju ograničen značaj u prezimljavanju i kao izvor inokuluma. Ova hipoteza podržana je činjenicom da nije došlo do unakrsne infekcije između dva susedna zasada kupine sorti Čačanska bestrna i Chester Thornless, oba podignuta pre 15 godina na lokalitetu Miokus. Zasad kupine sorte Čačanska bestrna bio je jako zaražen samo sa *G. idaeicola*, dok ovaj patogen nije bio detektovan u zasadu sorte Chester Thornless koji se nalazio u neposrednoj blizini. Na osnovu ovog zapažanja može se zaključiti da ne postoji, ili je veoma ograničeno širenje patogena putem askospora nošenih vetrom, u dužem vremenskom periodu. Međutim, potpuno drugačija strategija širenja u prirodi, opisana je kod gljive iz istog roda, *Gnomoniopsis smithogilvyi* na kestenu. Kod ovog patogena askospore su najvažniji izvor inokuluma, dok konidije nemaju ili imaju jako ograničen značaj u epidemiologiji (Shuttleworth and Guest, 2017). Uzimajući u obzir da je *G. idaeicola* široko rasprostranjena na kupini u Srbiji, neophodno je sprovesti dalja epidemiološka proučavanja, naročito u pogledu izvora inokuluma i rasejavanja askospora putem vetra.

Potrebu za ovakvim istraživanjima naglašavaju nedavni nalazi *G. idaeicola* kao patogena kivija na Novom Zelandu (<http://nzfungi2.landcareresearch.co.nz>), što predstavlja proširenje kruga domaćina izvan roda *Rubus*. Osim toga, dokazano je da *G. idaeicola* može biti endofit u biljkama pšenice i *Myrtus communis* (Vaz, 2012; Comby et al., 2015).

Ispitivani izolati vrste roda *Septoria* na PDA podlozi formirali su spororastuće kolonije tamnozeleno, zeleno-maslinaste do zeleno-crne boje manje ili više ispupčene, sa talasastom površinom. Nijedan izolat nije izazvao pigmentaciju podloge. Nakon 20 dana od zasejavanja svi izolati sporulisali su formirajući piknidijske plodnosne tvorevine, sa cilindričnim, hijalinskim, pravim ili blago povijenim, zaobljenim konidijama. Nije uočeno formiranje teleomorfnog stadijuma na PDA podlozi ni u prirodnim uslovima u zaraženim biljkama. Opisane morfološke osobine, kako mikroskopske tako i makroskopske, karakteristične su za rod *Septoria* što je potvrđeno kroz poređenje rezultata sa dostupnom literaturom (Verkley et al., 2013). Slična morfologija kolonija opisana je za vrstu *Sphaerulina westendorpii* (Verkley et al., 2013). Međutim, *S. westendorpii* formira konidije koje imaju najčešće 2-3 septe dok su izolati iz Srbije formirali konidije bez septi. Osim razlike u izgledu kolonija molekularnom analizom utvrđena je i razlika u sekvencama ITS regiona rDNA ispitivanih izolata i *S. westendorpii*. Slična morfologija opisana je i za vrstu *Septocytia ruborum* koja se u literaturi pominje kao značajan patogen kupine u Srbiji i svetu (Arsenijević, 2006a; Williamson, 2017b). Ne samo da opisana morfologija ispitivanih izolata *Septoria* spp. odgovara opisima *Septocytia ruborum*, već takođe i simptomi. Sa druge strane u rezultatima Verkley et al. (2013) *Septocytia ruborum* nalazi se u okviru filogenetske grupe *Septoria sensu stricto* i status vrste još nije konačan. Molekularnim analizama u ovim istraživanjima utvrđeno je da su sekvence ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *Septoria* spp. identične sa jedinom sekvencom *S. ruborum* dostupnom u GenBank bazi podataka, koja takođe potiče iz Srbije.

Svi ispitivani izolati *Botryosphaeria dothidea* formirali su brzorastuće kolonije, u početku svetlije beličaste do svetlosive boje dok 20 dana posle zasejavanja postaje tamnosiva. Ono što je bilo karakteristično za sve izolate *B. dothidea* je formiranje grupisanih hifa koje se izdižu sa površine podloge. Pigmentacija podloge je u početku svetlije maslinaste boje, a 20 dana od zasejavanja podloga postaje potpuno crna. Na PDA podlozi došlo je do formiranja loptastih piknida. Morfološke osobine anamorfa *B.*

dothidea bile su uniformne kako u pogledu izgleda tako i u pogledu veličine. Izgled kolonija i morfologija konidija odgovarala je karakterističnim osobinama vrste *B. dothidea* (Maas and Uecker, 1984; Arsenijević, 2006b; Qiu et al., 2008; Smith and Maas, 2017). Nijedan od ispitivanih izolata *B. dothidea* nije formirao teleomorfni stadijum na PDA podlozi i nije nađen u prirodnim uslovima na zaraženim biljkama. Poznato je da se polna faza *B. dothidea* retko javlja u prirodi i verovatno nema veliku ulogu u širenju bolesti već pre svega kao faktor koji obezbeđuje genetsku varijabilnost (Ma et al., 2001). Mada je kupina označena kao domaćin na kome se češće formira polna faza *B. dothidea* (Ma et al., 2001), to nije potvrđeno u ovom istraživanju.

Ispitivani izolati *Diplodia seriata* formirali su brzorastće kolonije u početku beličaste do svetlosive boje dok kasnije micelija dobija tamnosivu boju. Postoji izvesna sličnost u izgledu kolonija *D. seriata* i *B. dothidea*, međutim *D. seriata* formira ređu vazdušastu miceliju, a udruživanje hifa manje je izraženo. Pigmentacija podloge postaje vidljiva već nakon nekoliko dana i postaje sve tamnija dok 20 dana posle zasejavanja ne postane potpuno crna. Nakon 20 dana od zasejavanja formirali su se loptasti piknidi crne boje. Zrele konidije braon boje razlikovale su se po izgledu od hijalinskih konidija *B. dothidea*. Makroskopske i mikroskopske osobine odgovarale su ranije opisanim karakteristikama vrste *D. seriata* poreklom sa kupine i drugih domaćina (Phillips et al., 2007; Ellis et al., 1984), potvrđujući rezultate morfološke identifikacije. Nijedan od ispitivanih izolata *D. seriata* nije formirao teleomorfni stadijum na PDA podlozi, a nije nađen ni u pregledanim zasadima u prirodnim uslovima.

Morfološke karakteristike svih ispitivanih izolata *B. cinerea* bile su uniformne. Izgled kolonija, veličina i oblik konidija nisu se značajno razlikovali između izolata. Zajednička osobina izolata ispitivanih u ovom radu je izostanak formiranja sklerocija na PDA podlozi čak i posle višemesečnog gajenja. Tanović et al. (2009) ispitujući izolate *B. cinerea* poreklom sa plodova kupine i drugog jagodastog voća ustanovili su da preko 60% izolata formira sklerocije, ali jedan deo izolata ih nije formirao. Brzorastuća siva, gusta, vunasta vazdušna micelija i okruglaste, jednoćelijske, hijalinske konidije na dugim hijalinskim, septiranim konidioforama svojim izgledom bile su karakteristične za vrstu *B. cinerea*. Ovakvu morfologiju izolata *B. cinerea* sa različitih domaćina uključujući kupinu i druge vrste roda *Rubus* i drugog jagodastog voća opisuju i drugi autori (Arsenijević, 2006b; Tanović et al., 2009, 2014; Williamson, 2017f; Bristow and Williamson, 2017).

B. cinerea u prirodi retko formira polni stadijum (Li, 2015) što je potvrđeno u ovom istraživanju. Polna faza nije utvrđena kako u prirodnim uslovima tako ni *in vitro* na PDA podlozi. Osim *B. cinerea* sivu trulež kupine prouzrokuje i *B. caroliniana* koja je morfološki veoma slična vrsti *B. cinerea* (Li, 2015). Detektovana je na uskom području u SAD i za razliku od *B. cinerea* ne sporuliše na PDA i King B podlozi (Li, 2015).

Svi odabrani izolati *Colletotrichum kahawae* formirali su sive, brzorastuće kolonije ravnog oboda sa gustom vazdušnom micelijom i obilnom sporulacijom. Izgled kolonija kao i cilindrične, hijalinske konidije sa zaobljenim krajevima odgovaraju opisu *C. kahawae* subsp. *ciggaro* (Weir et al., 2012), što je podržano rezultatima molekularne identifikacije i filogenije. Afanador-Kafuri et al. (2014) opisali su sličnu morfologiju *Colletotrichum* izolata poreklom sa kupine u Južnoj Americi. Međutim, vrsta *C. kahawae* subsp. *ciggaro* formirala je konidije značajno manjih dimenzija od konidija opisanih u ovom istraživanju kao i u istraživanju Weir et al. (2012). Rezultati novijih istraživanja ukazuju da u okviru *C. kahawae* postoje dve podvrste, *C. kahawae* subsp. *kahawae* koja je usko specijalizovan parazit kafe, i *C. kahawae* subsp. *ciggaro* koja nije parazit kafe i ima širi krug domaćina (Batista et al., 2017). Iako su morfološki jako slične rezultati molekularnih istraživanja ukazuju da se najverovatnije radi o dve zasebne vrste (Batista et al., 2017). Jedan ispitivani izolat *C. kahawae* (KCA5-16, poreklom sa lokaliteta Čačak sa sorte Loch Ness) formirao je teleomorfni stadijum na PDA podlozi 10 dana posle zasejavanja. Morfološke karakteristike askusa i askospora odgovaraju karakteristikama *C. kahawae* subsp. *ciggaro* (Weir et al., 2012), što je podržano rezultatima molekularne identifikacije i filogenije kako je već prethodno i navedeno.

Svi ispitivani izolati *Diaporthe betulae* formirali su vazdušnu miceliju beličaste do braon boje sa karakterističnim zoniranim porastom sa nepravilnim ivicama. Pigmentacija podloge braon boje vidljiva je i 10 dana posle zasejavanja dok 20 dana posle zasejavanja dolazi do potpune pigmentacije podloge u tamnobraon boju. Sporulacija je bila zajednička karakteristika ispitivanih izolata i formirali su piknide raspoređene po čitavoj površini podloge. Iz piknida oslobađale su se žućkaste kapi eksudata u kojima su se nalazile mnogobrojne jednoćelijske hijalinske alfa konidije sa dve uljane kapi i jednoćelijske, hijalinske končaste beta konidije. Kolonije sa gustom, beličastom, vazdušnom micelijom vremenom dobijaju braonkastu do tamnozelenu boju sa izraženim zonalnim rastom i nepravilnim ivicama kao i formiranjem plodonosnih tvorevina iz kojih

se oslobađa eksudat opisane su kod vrste *D. betulae* (Du et al., 2016). Izgled kolonija kao i prisustvo jednoćelijskih, hijalinskih alfa konidija sa dve uljane kapi koje su opisali Du et al. (2016) odgovaraju osobinama izolata *D. betulae* u Srbiji. Arsenijević (2006a) u svojim istraživanjima navodi da su izolati identifikovani do roda *Phomopsis* formirali dva tipa kolonija nejednakog izgleda i mnoštvo α i β konidija. Usled oskudnih opisa morfologije nije moguće reći da li su izolati koje je ispitivao morfološki slični izolatima *D. betulae* dokazanim u Srbiji. Nijedan ispitivani izolat nije formirao polni stadijum na PDA podlozi niti je polni stadijum nađen u prirodi na obolelim biljkama kupine.

Morfološke osobine ispitivanih izolata vrste *Diaporthe eres* bile su uniformne. Formirali su belu, brzorastuću, umereno gustu miceliju ravnog oboda na PDA podlozi. Posle 20 dana od zasejavanja došlo je do promene u izgledu kolonija usled pigmentacije podloge u tamnobraon boju, a svi izolati obilno su sporulisali formirajući piknide crne boje na čijim vrhovima se oslobađala sluzasta tečna masa žućkaste boje u vidu kapi u kojoj su se nalazile mnogobrojne α i β konidije patogena. Svi ispitivani izolati formirali su mnoštvo jednoćelijskih α konidija sa dve uljane kapi kao i jednoćelijskih končastih β konidija. Izgled kolonija, dimenzije i izgled alfa i beta konidija odgovarale su opisima vrste *D. eres* poreklom iz obolelih stabala kupine u Hrvatskoj (Vrandečić et al., 2010). Drugi autori takođe opisuju morfologiju *D. eres* sa različitih biljaka domaćina (Anagnostakis, 2007; Kolomiets et al., 2009; Petrović et al., 2015) koja je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja. U Srbiji *D. eres* nije opisana kao patogen kupine, ali je potvrđeno prisustvo dve morfološki različite grupe izolata vrsta roda *Phomopsis* (Arsenijević, 2006a). Nijedan od ispitivanih izolata nije formirao teleomorfni stadijum kako na PDA podlozi tako ni u polju na obolelim biljkama što su opisali i Vrandečić et al. (2010) ispitivanjem morfoloških osobina izolata *D. eres* poreklom sa obolelih stabala kupine.

Ispitivani izolat *Neofusicoccum parvum* obrazovao je brzorastuću svetlosivu miceliju koja starenjem dobija tamnosivu boju sa upadljivim udruživanjem hifa vazdušne micelije koji se izdižu sa podloge nalik na izolate *Botryosphaeria dothidea*. *N. parvum* pigmentiše podlogu u početku u svetlozelenu boju da bi 20 dana nakon zasejavanja podloga postala potpuno crna. Patogen je formirao crne loptaste piknide. Konidije su eliptične, svetlobraon boje sa jednom septom po čemu se razlikuju od srodnih *B. dothidea*

i *Diplodia seriata*. Opisana morfologija odgovara osobinama vrste *N. parvum* (Crous et al., 2006; Phillips et al., 2013).

6.4. Molekularna identifikacija i analize sekvenci ispitivanih izolata

Molekularna identifikacija obuhvatila je ukupno 73 izolata svrstanih u 10 morfoloških grupa koje su identifikovane kao *Paraconiothyrium fuckelii*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Septoria* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe betulae*, *Diaporthe eres* i *Neofusicoccum parvum* na osnovu sekvenci ITS regiona rRNA. Potvrda identifikacije *G. idaeicola* na osnovu sekvenci ITS regiona rRNA obavljena je i na osnovu β -tubulina, tef-1 α i FG1093.

Međusobnim poređenjem sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *Paraconiothyrium fuckelii* ustanovljeno je postojanje izvesne intraspecijske varijabilnosti. Većina izolata imala su identične sekvence, dok su tri izolata poreklom iz Leskovca, Donje Kamenice i Prokuplja bili različiti, pri čemu je maksimalna razlika bila u 4 varijabilna mesta. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata *P. fuckelii* i njihovim poređenjem sa sekvencama dostupnim u GenBank, Qbank i Boldsystems bazama podataka utvrđena je veoma visoka nukleotidna identičnost (99-100%) sa većim brojem sekvenci *P. fuckelii*, čime su potvrđeni rezultati konvencionalne identifikacije. Ova istraživanja potvrdila su da je ITS region rDNA pouzdan molekularni marker za identifikaciju vrste *P. fuckelii* za šta su razvijeni i odgovarajući protokoli. ITS region rDNA dokazano je visokoinformativan u identifikaciji i filogeniji vrsta roda *Paraconiothyrium* (Verkley et al., 2004; Ariyawansa et al., 2014).

Molekularna identifikacija *Gnomoniopsis idaeicola* izvršena je na osnovu četiri molekularna markera, ITS regiona rDNA, β -tubulina, tef-1 α i FG1093. Međusobnim poređenjem generisanih sekvenci *G. idaeicola* utvrđeno je postojanje intraspecijske varijabilnosti. Najvarijabilniji genetički marker bio je β -tubulin gde je zabeležena maksimalna razlika od 8 varijabilnih mesta, dok su tef-1 α i ITS region rDNA bili nešto manje varijabilni sa maksimalno 7 odnosno 4 varijabilna mesta. Poređenjem sekvenci gena za FG1093 nije ustanovljeno postojanje varijabilnosti. Iako se ovaj molekularni marker smatra korisnim za ispitivanje intraspecijske varijabilnosti u okviru vrsti roda *Gnomoniopsis* (Walker et al., 2012), ova istraživanja pokazala su da je FG1093

visokokonzervativan na nivou vrste *G. idaeicola*. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci sva 4 molekularna markera ispitivanih izolata *G. idaeicola* i sekvenci dostupnih u GenBank bazi podataka utvrđen je veoma visok stepen nukleotidne identičnosti sa sekvencama izolata vrste *G. idaeicola* i to sa sekvencama 9 izolata za ITS region rDNA, 5 izolata za *tef-1 α* gen, 5 izolata za β -tubulin i 1 izolatom za FG1093 gene. Iako je mali broj izolata *G. idaeicola* okarakterisan i dostupan je mali broj sekvenci, rezultati molekularne identifikacije u potpunosti podržavaju konvencionalnu identifikaciju. Poređenjem sekvenci ITS regiona rDNA 18 ispitivanih izolata i 9 sekvenci dostupnih u GenBank utvrđeno je da je većina sekvenci identična. Jedan izolat iz GenBank poreklom iz Španije kao i ispitivani izolati KVR2-14 i KNEI7-15, od ostalih su se razlikovali za 1 varijabilno mesto. Navedeni rezultati ukazuju da postoji veća varijabilnost sekvenci ITS regiona rDNA između izolata poreklom iz Srbije nego sa izolatima dostupnim u GenBank bazi podataka. Međutim, sekvence iz baze uglavnom su kraće od sekvenci generisanih u ovom radu, a najveće razlike kod izolata poreklom iz Srbije bile su upravo u okviru dela sekvenci koje nisu dostupne za izolate iz GenBank. Poređenjem sekvenci *tef-1 α* gena 11 ispitivanih izolata i analizom njihove homologije sa sekvencama 5 izolata dostupnih u GenBank utvrđeno je postojanja izražene varijabilnosti između izolata i to do 8 varijabilnih mesta razlike. Poređenjem sekvenci gena za β -tubulin 11 ispitivanih izolata i 5 sekvenci izolata dostupnih u GenBank ustanovljeno je da su sekvence 3 izolata iz GenBank bile identične sa većinom ispitivanih izolata, odnosno od pojedinih su se razlikovale do 6 varijabilnih mesta. Preostala dva izolata poreklom iz SAD su se od drugih izolata razlikovali do 17 varijabilnih mesta. Jedina sekvenca FG1093 dostupna u GenBank bila je identična sekvencama ispitivanih izolata. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da su sva 4 molekularna markera obuhvaćena istraživanjima imala dovoljnu rezoluciju za identifikaciju do nivoa vrste i mogu se uspešno koristiti u identifikaciji *G. idaeicola*, za šta su razvijeni i odgovarajući protokoli. Ovi rezultati potvrđuju rezultate **Walker et al.** (2010) i **Walker et al.** (2012) koji su utvrdili da su ITS region rDNA, β -tubulin, *tef-1 α* i FG1093 bili pouzdani u identifikaciji vrsta roda *Gnomoniopsis* uključujući i *G. idaeicola*.

Međusobnim poređenjem sekvenci ITS regiona rDNA 12 ispitivanih izolata *Septoria* spp. utvrđeno je da većina sekvenci nije ispoljila varijabilnost, dok se samo jedna sekvenca izolata KME7-16 razlikovala u 5 varijabilnih mesta od preostalih 11 izolata. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata sa sekvencama dostupnim

u GenBank, Qbank i Boldsystems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne identičnosti od 99 do 100% sa velikim brojem sekvenci vrsta roda *Septoria* ali i sa nekim sekvencama vrsta rodova *Mycosphaerella*, *Cercospora*, *Sphaerulina* kao i sa jedinom dostupnom sekvencom vrste *Septocytia ruborum*, patogena kupine u Srbiji (Aleksić et al., 2012). Međutim, jako mali broj izolata *S. ruborum* je okarakterisan i dostupna je samo jedna sekvenca ITS regiona rDNA. Sa druge strane status vrste *S. ruborum* nije definisan. Rezultati obimnih filogenetskih analiza vrsta roda *Septoria* i srodnih rodova, *S. ruborum* svrstavaju u okviru filogenetske grupe *Septoria sensu stricto* naglašavajući da pitanje pozicije ove vrste ostaje da se reši obzirom da je dostupan samo jedan izolat i da je samo jedna sekvenca deponovana (Quaedvlieg et al., 2013). Adair et al. (2012) ispitivali su varijabilnost između izolata *S. ruborum*, a sve sekvence ITS regiona rDNA ispoljile su visok stepen nukleotidne identičnosti sa sekvencama vrsti roda *Septoria* dostupnim u GenBank bazi podataka. Navedeni rezultati slični su rezultatima ovih istraživanja. Međutim, sekvence koje su generisali nisu deponovane pa nisu mogle da budu obuhvaćene ovim ispitivanjima. Daljom filogenetskom analizom sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *Septoria* spp. kojom je obuhvaćen i veći broj reprezentativnih vrsta roda *Septoria* ali i srodnih rodova *Stromatoseptoria*, *Zymoseptoria* i *Sphaerulina*, nije bilo moguće razdvojiti vrste koje su priznate i za koje su već definisani međudnosi. Zato ispitivani izolati ostaju identifikovani do nivoa roda *Septoria*, a buduća istraživanja obuhvatiće dalju karakterizaciju i sekvenciranje dodatnih molekularnih markera s obzirom da ITS region rDNA nije bio dovoljno informativan. Slične rezultate nalazimo i u istraživanjima Verkley et al. (2013) gde je takođe utvrđeno da ITS region rDNA nema dovoljnu rezoluciju za razdvajanje srodnih vrsta u okviru roda *Septoria* nasuprot filogeniji zasnovanoj na kombinovanim sekvencama ITS regiona rDNA, LSU rRNA, RPB2, ACT, CAL, Btub i EF.

Molekularna identifikacija *Botryosphaeria dothidea* izvršena je analizom sekvenci ITS regiona rDNA 5 odabranih izolata. Međusobnim poređenjem sekvenci ispitivanih izolata *B. dothidea* utvrđena je 100% nukleotidna identičnost, odnosno nije utvrđena varijabilnost između različitih izolata. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata *B. dothidea* utvrđen je visok stepen nukleotidne identičnosti (99-100%) sa velikim brojem sekvenci vrste *B. dothidea* dostupnih u GenBank i Boldsystems bazama podataka čime su potvrđeni rezultati konvencionalne identifikacije. Rezultati

istraživanja pokazali su da je ITS region rDNA pouzdan molekularni marker u identifikaciji vrste *B. dothidea* za šta su razvijeni i odgovarajući protokoli koji predstavljaju osnov za brzu detekciju i identifikaciju patogena. Rezultati molekularne identifikacije potvrđeni su i kroz filogenetsku analizu zasnovanu na sekvencama ITS regiona rDNA koja je uspešno razdvojila srodne vrste i rodove u okviru familije Botryosphaeriaceae. Navedene podatke potvrđuju i rezultati drugih istraživanja. Prema **Slippers et al.** (2007) ITS region rDNA pružio je dovoljnu rezoluciju za molekularnu identifikaciju i karakterizaciju srodnih vrsti iz familije Botryosphaeriaceae. Slično tome ITS region rDNA uspešno je korišćen za identifikaciju i razdvajanje *B. dothidea* od drugih srodnih vrsta prouzrokovaca bolesti vinove loze u Kini (**Jiye et al.**, 2012). Osim navedenih i druga istraživanja potvrdila su vrednost ITS regiona rDNA u identifikaciji vrste *B. dothidea* (**Smith and Stanosz**, 2001; **Slippers et al.**, 2004; **Taylor et al.**, 2005; **Alves et al.**, 2005; **Phillips et al.**, 2005; **Úrbez-Torres et al.**, 2006; **Qiu et al.**, 2008; **Pitt et al.**, 2010).

Analizom i međusobnim poređenjem sekvenci ITS regiona rDNA 4 ispitivana izolata *Diplodia seriata* nije utvrđena varijabilnost. Njihovim poređenjem sa sekvencama dostupnim u GenBank i Boldsystems bazama podataka utvrđena je veoma visoka nukleotidna identičnost (99-100%) sa velikim brojem sekvenci vrste *D. seriata* poreklom iz različitih delova sveta sa različitih domaćina čime su potvrđeni rezultati morfološke identifikacije. Vrednost ITS regiona rDNA potvrdili su i rezultati filogenetske analize koja je uspešno razdvojila *D. seriata* od srodnih vrsta i rodova familije Botryosphaeriaceae. Razvijeni su i protokoli koji omogućavaju brzu rutinsku detekciju i identifikaciju patogena. Saglasno rezultatima ovog istraživanja i drugi autori potvrđuju da je ITS region rDNA pouzdan molekularni marker za identifikaciju *D. seriata* (**Phillips et al.**, 2005; **Wet et al.**, 2008; **Quaglia et al.**, 2014; **Elena et al.**, 2015).

Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata *Botrytis cinerea* sa sekvencama dostupnim u GenBank i Boldsystems bazi podataka utvrđena je veoma visoka nukleotidna identičnost (99-100%) sa velikim brojem sekvenci vrste *B. cinerea* poreklom iz različitih zemalja sa različitih domaćina. Ovim su potvrđeni rezultati morfološke identifikacije. Međusobnim poređenjem sekvenci ispitivanih izolata utvrđeno je postojanje varijabilnosti. Dva od pet sekvencirana izolata razlikovali su se za po jedno varijabilno mesto od ostalih, odnosno u 2 varijabilna mesta međusobno. ITS region rDNA

pokazao se kao molekularni marker sa dovoljnom rezolucijom za identifikaciju vrste *B. cinerea*.

Ispitivani izolati vrste *Colletotrichum kahawae* identifikovani su analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA i sekvenci dostupnih u GenBank, Qbank i Boldsystems bazi podataka. Visok stepen nukleotidne identičnosti utvrđen je sa većim brojem sekvenci *C. kahawae*, *C. kahawae* subsp. *cigarro* i *C. kahawae* subsp. *kahawae*. Iako navedeni podaci podržavaju identitet ispitivanih izolata, postoji visoka identičnost i sa sekvencama drugih srodnih vrsta u okviru roda *Colletotrichum*. Filogenetske analize pokazale su da su se svi ispitivani izolati odvojili u zaseban filogenetski klaster na istoj grani sa sekvencama *Colletotrichum kahawae* uključujući i *C. kahawae* subsp. *cigarro* i *C. kahawae* subsp. *kahawae*. Rezultati nekih istraživanja ukazuju da je ITS region rDNA za mnoge vrste roda *Colletotrichum* informativan u ograničenom stepenu (Crouch et al., 2009; Weir et al., 2012), što potvrđuju i rezultati ovog istraživanja. Molekularna identifikacija *C. kahawae* bila je moguća tek sprovođenjem filogenetske analize, što je u saglasnosti sa rezultatima Weir et al. (2012) prema kojima *C. kahawae* subsp. *cigarro* i *C. kahawae* subsp. *kahawae* od ostalih vrsti mogu uspešno da se razlikuju samo na osnovu sekvenci ITS regiona rDNA. Podvrste *C. kahawae* subsp. *cigarro* i *C. kahawae* subsp. *kahawae* morfološki i molekularno veoma su slične, a prema nekim istraživanjima predstavljaju dva ekološki i reproduktivno zasebna entiteta (Batista et al., 2017). Prema ovim autorima *C. kahawae* subsp. *kahawae* je usko specijalizovan parazit kafe, dok *C. kahawae* subsp. *cigarro* ima širi krug domaćina i ne parazitira kafu. Dodatna istraživanja i sekvenciranje novih molekularnih markera potrebna su kako bi se utvrdilo kojoj podvrsti pripadaju ispitivani izolati *C. kahawae* iz Srbije.

Konvencionalna identifikacija izolata *Diaporthe betulae* potvrđena je rezultatima molekularne identifikacije i filogenije zasnovane na sekvencama ITS regiona rDNA. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci 2 odabrana izolata sa sekvencama dostupnim u GenBank i Boldsystems bazama podataka ustanovljena je visoka nukleotidna identičnost od 99 – 100% sa većim brojem sekvenci vrsta roda *Diaporthe*. Kako analiza homologije nukleotidnih sekvenci nije dala precizne rezultate, identifikacija je dovršena sprovođenjem filogenetske analize generisanih sekvenci zajedno sa sekvencama definisanih reprezentativnih vrsta roda *Diaporthe*. Filogenetska analiza

zasnovana je na konceptu koji su primenili **Dissanayake et al.** (2017a). Rezultat analize je filogenetsko stablo sa topologijom i razdvajanjem vrsta saglasno rezultatima koji su dobili **Dissanayake et al.** (2017a). Ispitivani izolati izdvojili su se u zaseban i jasno definisan filogenetski klaster zajedno sa sekvencama vrste *D. betulae*.

Molekularna identifikacija odabranih izolata *D. eres* potvrdila je rezultate morfološke identifikacije. Međusobnim poređenjem sekvenci 3 izolata *D. eres* iz Srbije nije utvrđena varijabilnost u okviru ITS regiona rDNA. Analizom homologije sekvenci ispitivanih izolata *D. eres* sa sekvencama dostupnim u GenBank i Boldsystems bazama podataka utvrđena je visoka nukleotidna identičnost od 99 do 100% sa većim brojem sekvenci vrste *D. eres* uključujući i sekvence poreklom sa kupine iz Hrvatske. **Vrandečić et al.** (2011) su morfološki i molekularno na osnovu sekvenci ITS regiona rDNA identifikovali vrstu *D. eres* kao prouzrokovača nekroze stabla kupine sorte Thornfree u Hrvatskoj. Osim visokog stepena homologije nukleotidnih sekvenci sa dostupnim sekvencama vrste *D. eres* potvrda molekularne identifikacije sprovedena je i kroz filogenetsku analizu i generisanje filogenetskog stabla sa jasnim razdvajanjem vrsta u okviru roda *Diaporthe* i grupisanjem sekvenci ispitivanih izolata u jasno izdvojen klaster sa drugim izolatima vrste *D. eres*. Uspešnu identifikaciju *D. eres* zasnovanu na sekvencama ITS regiona rDNA potvrđuju i **Kolomiets et al.** (2009).

Analizom homologije nukleotidne sekvence odabranog izolata *Neofusicoccum parvum* potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije. Utvrđen je veoma visok stepen nukleotidne identičnosti (99-100%) sa velikim brojem sekvenci vrste *N. parvum* dostupnih u GenBank i Boldsystems bazama podataka. ITS region rDNA bio je dovoljno informativan za identifikaciju vrste *N. parvum*, a razvijen je i odgovarajući protokol za brzu detekciju i identifikaciju. Rezultati molekularne identifikacije potvrđeni su i filogenetskim ispitivanjima zasnovanim na sekvencama ITS regiona rDNA koji se pokazao kao molekularni marker dovoljne rezolucije za razdvajanje srodnih vrsta u okviru porodice Botryosphaeriaceae. Do sličnih rezultata došli su i drugi autori. Koristeći sekvence ITS regiona rDNA i EF1-a **Pitt et al.** (2010) identifikovali su i okarakterisali vrste iz porodice Botryosphaeriaceae udružene sa propadanjem vinove loze. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je ITS region rDNA bio podjednako informativan kao i EF1-a i veoma efikasan u razlikovanju *N. parvum* od drugih srodnih vrsta. **Wat et al.**

(2008) uradili su filogenetsku analizu zasnovanu na sekvencama ITS regiona rDNA na osnovu čega su uspešno razdvojene *N. parvum* i *N. ribis*, dve veoma bliske vrste.

6.5. Filogenetska karakterizacija i taksonomska pozicija ispitivanih izolata

Molekularna karakterizacija i filogenetska ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvatala su analizu sekvenci ITS regiona rDNA 18 izolata vrste *Gnomoniopsis idaeicola*, 5 izolata *Botryosphaeria dothidea*, 4 izolata *Diplodia seriata*, 1 izolata *Neofusicoccum parvum*, 5 izolata *Colletotrichum kahawae*, 3 izolata *Diaporthe eres* i 2 izolata *Diaporthe betulae*. Filogenetska analiza u okviru vrste *Gnomoniopsis idaeicola* uključila je i multilokus analizu kombinovanih sekvenci ITS regiona rDNA, β -tubulin, *tef-1 α* i FG1093 za 11 odabranih izolata.

Filogenetska analiza vrste *Gnomoniopsis idaeicola* zasnovana na sekvencama ITS regiona rDNA bazirana je na konceptu koji su predložili **Hyde et al.** (2014), a filogenetsko stablo koje je konstruisano bilo je sa definisanom i dovoljnom rezolucijom za razdvajanje vrsta u okviru roda *Gnomoniopsis* (**Walker et al.**, 2010). Svi izolati *G. idaeicola* kako poreklom iz Srbije tako i iz drugih delova sveta izdvojili su se u jasno definisan filogenetski klaster. U okviru istog klastera izdvojio se i jedan izolat *Gnomoniopsis* sp. poreklom iz Irana sa biljaka kupine, ali na blago udaljenoj i jasno definisanoj poziciji. Rezultati molekularne identifikacije izolata označenog kao *Gnomoniopsis* sp. sugerišu da se najverovatnije radi o vrsti *G. idaeicola* (**Mirhosseini et al.**, 2015). Međutim, kako nema raspoloživih sekvenci ostalih genskih regiona, ovaj izolat nije uključen u dalja ispitivanja. Dva patogena takođe iz roda *Gnomoniopsis*, poreklom sa *Rubus* spp., *G. alderdunense* i *G. chamaemori* (**Walker et al.**, 2010), a koji bi se takođe mogli dovesti u vezu sa kupinom, ispoljili su topologiju koja se jasno razlikuje od svih izolata *G. idaeicola* dodatno potvrđujući identifikaciju izolata poreklom iz Srbije. Filogenetske analize pružile su dobru rezoluciju i razdvajanje vrsti roda *Gnomoniopsis*, međutim za proučavanje intraspecijske varijabilnosti *G. idaeicola* bilo je potrebno uključiti dodatne molekularne markere.

Detaljna filogenetska analiza izolata *G. idaeicola* izvršena je multilokus analizom kombinovanih sekvenci ITS regiona rDNA, β -tubulin, *tef-1 α* i FG1093. Generisano je filogenetsko stablo sa topologijom i jasnim razdvajanjem vrsta slično kao kod stabla zasnovanog samo na ITS regionu rDNA. Sekvence svih ispitivanih izolata kao i jednog

referentnog izolata *G. idaeicola* izdvojile su se u jasno definisan klaster. Multilokus filogenetsko stablo pružilo je dodatne informacije i predstavlja prvi uvid u moguću varijabilnost unutar vrste zasnovanu na formiranju podgrupa u okviru grane *G. idaeicola* sa visokom bootstrap podrškom. Jedan izolat poreklom iz Srbije (KSV1-16) pozicionirao se odvojeno od ostalih izolata iz Srbije i jedinog dostunog izolata *G. idaeicola* poreklom iz SAD sa *Rubus armeniacus*. Ovo ukazuje na mogućnost da je ovaj izolat različitog porekla. Kada se uzme u obzir čest uvoz sadnog materijla kupine u Srbiju može se pretpostaviti da su neki izolati različitog geografskog porekla iz različitih proizvodnih područja kupine međusobno povezani. Ipak još puno podataka i okarakterisanih izolata potrebno je da bi se rasvetlio biološki značaj utvrđene varijabilnosti i filogenetski odnos između različitih izolata *G. idaeicola*.

Filogenetska analiza izolata vrsta *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* i *Neofusicoccum parvum* (Botryosphaeriaceae) zasnovana je na sekvencama ITS regiona rDNA (Slippers et al., 2007). Generisano je stablo sa 8 jasno definisanih filogenetskih grupa koje odgovaraju pojedinim vrstama obuhvaćenim ispitivanjima. Svi ispitivani kao i reprezentivni izolati *B. dothidea* izdvojili su se u jasno definisan klaster u okviru koga egzistiraju dve podgrupe. Četiri referentna izolata *B. dothidea* poreklom iz Japana formirali su grupu koja je udaljena od izolata poreklom iz Srbije kao i ostalih referentnih izolata ove vrste. Ovo je prvi uvid u evolutivne međuodnose izolata *B. dothidea* poreklom sa kupine u Srbiji. Svi izolati vrste *D. seriata* obuhvaćeni ovim istraživanjima izdvojili su se u jasno definisan klaster u okviru koga postoji dalje razdvajanje. Topologija srodne *D. mutila* i *D. corticola* jasno se razlikovala od *D. seriata* potvrđujući identifikaciju ispitivanih izolata. U okviru klastera *D. seriata* došlo je do izdvajanja vrsta u 5 podgupa pri čemu su se ispitivani izolati *D. seriata* grupisali zajedno sa 2 izolata iz Južne Afrike poreklom sa *Pyrus communis*. Iako nije utvrđena varijabilnost između ispitivanih izolata analiza je pružila prve podatke o filogenetskim međuodnosima izolata sa kupine i drugih domaćina. Vrednost ITS regiona rDNA u identifikaciji i ispitivanju filogenetskih međuodnosa *D. seriata* i drugih srodnih vrsta porodice Botryosphaeriaceae potvrđuju i rezultati istraživanja drugih autora (Wat et al., 2008; Pitt et al., 2010). Ispitivani izolat *Neofusicoccum parvum* izdvojio se u jasno definisan klaster zajedno sa 8 reprezentivnih izolata vrste *N. parvum* sa jasnom topologijom u odnosu na srodne *N. ribis*, *N. luteum* i *N. australe*. U okviru ovog klastera formirale su se dve podgrupe. Tri izolata *N. parvum*

poreklom iz Novog Zelanda odvojili su se od ostalih reprezentativnih kao izolata iz Srbije ukazujući na postojanje varijabilnosti. Druga istraživanja potvrđuju jasno razdvajanje *N. parvum* od srodnih vrsta roda *Neofusicoccum* na osnovu ITS regiona rDNA (Wat et al., 2008; Pitt et al., 2010).

Filogenetska analiza vrste *Colletotrichum kahawae* zasnovana na sekvencama ITS regiona rDNA urađena je u skladu sa konceptom koji su predložili Hyde et al. (2014). Generisano je filogenetsko stablo sa definisanom rezolucijom za razdvajanje vrsta u okviru roda *Colletotrichum*. Uspostavljeno je 9 zasebnih filogenetskih grupa koje su odgovarale određenim kompleksima vrsta u okviru roda *Colletotrichum*. Sekvence svih 5 ispitivanih izolata *C. kahawae* grupisale su se u okviru klastera gloeosporioides kompleksa ali na zasebnoj i jasno definisanoj grani zajedno sa drugim izolatima *C. kahawae* uključujući i podvrste *C. kahawae* subsp. *kahawae* i *C. kahawae* subsp. *cigarro*. Filogenetskim analizama dopunjeni su rezultati molekularne identifikacije i ispitivani izolati identifikovani su kao *C. kahawae*. Rezultati koje su pružili Rueda-Hernandez et al. (2013) pokazuju da su se izolati poreklom sa kupine razdvojili u dva kompleksa, gloeosporioides i acutatum, pri čemu su se izolati *C. kahawae* izdvojili u okviru gloeosporioides kompleksa ali na odvojenoj i jasno definisanoj grani. Navedeni rezultati slični su rezultatima ovih istraživanja sa tom razlikom što nijedan izolat poreklom sa kupine u Srbiji nije pripadao acutatum kompleksu. Vrsta *C. kahawae* obuhvata dve podvrste *C. kahawae* subsp. *kahawae* i *C. kahawae* subsp. *cigarro* koje iako morfološki slične ne samo da imaju različit krug domaćina već se razlikuju i molekularno (Batista et al., 2017). Da bi se utvrdila tačna filogenetska pozicija ispitivanih izolata *C. kahawae* u odnosu na ove dve podvrste potrebna su dodatna ispitivanja novih molekularnih markera i kruga domaćina.

Kako molekularna identifikacija izolata vrsti *Diaporthe betulae* i *D. eres* zasnovana na analizi homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA nije bila dovoljno pouzdana, sprovedena su i odgovarajuća filogenetska istraživanja koja su obuhvatila referentne izolate većeg broja vrsti roda *Diaporthe* sa usaglašenim i definisanim međuodnosima što je omogućilo identifikaciju ispitivanih izolata. Ispitivani izolati *D. betulae* izdvojili su se na jasno definisanoj grani zajedno sa dva referentna izolata vrste *D. betulae*. Ovo je novoformirana vrsta koja je izolovana iz *Betula platyphylla* jedinog poznatog domaćina (Du et al., 2016). Međutim, dokazano je i opšte prihvaćeno da vrste

roda *Diaporthe* nisu specifične u pogledu domaćina i da se jedna vrsta može naći na više od jedne biljke domaćina (**Rehner and Uecker**, 1994; **Dissanayake et al.**, 2017b), pa su dodatna istraživanja neophodna da bi se ispitaio značaj ovog nalaza. Ispitivani izolati *D. eres* izdvojili su se u jasno definisanu granu sa referentnim izolatima vrste *D. eres* potvrđujući tako rezultate molekularne identifikacije. *D. eres* je polofagna vrsta sa širokim krugom domaćina. U Srbiji je prvi put identifikovana kao patogen kupine tek u ovim istraživanjima iako je poznata kao patogen kupine u susednoj Hrvatskoj (**Vrandečić**, 2011).

6.6. Virulentnost izolata *Gnomoniopsis idaeicola* poreklom sa različitih lokaliteta

Ispitivanjem virulentnosti izolata *G. idaeicola* različitog geografskog porekla utvrđene su značajne razlike. Postojanje razlika u virulentnosti između različitih izolata *G. idaeicola* prvi put su proučene u okviru ove disertacije. U dostupnoj literaturi nema podataka o razlikama u virulentnosti različitih izolata ove vrste. Od svih vrsta iz roda *Gnomoniopsis*, jedino postoje podaci o izolatima *G. smithogilvyi* poreklom iz Australije i Novog Zelanda, koji su nakon veštačkih inokulacija ispoljili različitu virulentnost u poređenju sa izolatima iz Italije (**Shuttleworth and Guest**, 2017). U ovim istraživanjima ustanovljena je različita virulentnost izolata *G. idaeicola* iz Srbije koji su ispoljili slabu, umerenu ili jaku virulentnost. Iako su razlike u virulentnosti bile vidljive, statistički značajne razlike ustanovljene su jedino između izolata koji su bili najviše odnosno najmanje virulentni. Između većine izolata, koji su bili umereno virulentni, nije bilo značajne razlike.

Pojedini izolati *G. idaeicola* ispoljili su neusaglašenost između intenziteta sporulacije u tkivu domaćina i u kulturi. Najveći broj piknida formirao se u kori reznica inokulisanih sa izolatom KMI5-15 koji je bio najvirulentniji, međutim ovaj izolat ispoljio je odloženu i prilično oskudnu sporulaciju na PDA podlozi. Sa druge strane najmanje virulentan izolat KKR7-16 ispoljio je potpuno suprotno ponašanje, odnosno sporulacija na inokulisanim reznicama bila je oskudna ili uopšte nije ni došlo do sporulacije, dok je na PDA podlozi ovaj izolat obilno sporulisao sa brojnim plodonosnim telima raspoređenim preko cele površine kolonije.

7. ZAKLJUČAK

U istraživanjima sprovedenim tokom četvorogodišnjeg perioda dobijeni su značajni rezultati i izvedeni brojni zaključci. Pregledano je 24 zasada na 20 lokaliteta u 13 okruga u Srbiji, sa ukupno 5 najznačajnijih sorti kupine (Čačanska bestrna, Loch Ness, Thornfree, Chester, Thornless i Triple Crown). Uočeni su raznovrsni simptomi na stablu kupine, često u vidu pegavosti, nekroze, pucanja i belila kore. Zabeležena je različita incidenca bolesti od 5 do 80%, a u pojedinim zasadima bilo je intenzivno propadanje biljaka procenjeno na 40% uz direktan gubitak prinosa oko 50%.

Sakupljeno je ukupno 427 uzoraka iz kojih je dobijeno ukupno 468 izolata koji su na osnovu morfoloških karakteristika svrstani u 10 različitih morfoloških grupa. Nakon uspešne provere patogenosti urađena je detaljna morfološka i molekularna identifikacija i karakterizacija 52 izolata.

Ukupno je identifikovano 10 vrsta uključujući *Paraconiothyrium fuckelii*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Septoria* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe betulae* i *Neofusicoccum parvum*. Većina vrsta identifikovana je na osnovu morfološke karakterizacije i analize homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA, dok je za određene vrste obavljena potvrda identifikacije i karakterizacija filogenetskim analizama.

Vrsta *P. fuckelii* bila je najzastupljenija u proizvodnim područjima Srbije, prisutna u 12 od 24 pregledanih zasada, često u visokoj incidenci, izazivajući slične simptome kao i *G. idaeicola* sa kojom je često bila prisutna u mešanim zarazama. Okarakterisano je 12 izolata i pružen je prvi uvid u patogene, morfološke i molekularne osobine izolata sa kupine u Srbiji.

G. idaeicola prvi put je opisana na kupini u Srbiji, što je ujedno i prva otkrivena masovna pojava na kupini u svetu. Patogen je detektovan u 11 od 24 pregledanih zasada kupine. Okarakterisano je 11 izolata i pružen je prvi uvid u postojanje morfološke, molekularne i biološke varijabilnosti između izolata *G. idaeicola*. Utvrđen je različit porast, sporulacija i virulentnost, a analiza kombinovanih sekvenci ITS regiona rDNA, β -tubulina, tef-1 α i FG1093 otkriva postojanje dve grupe u okviru filogenetskog klastera *G. idaeicola*. Dobijeni rezultati pružaju i prvi uvid u moguću epidemiologiju bolesti izazvane sa *G. idaeicola*. Kako se teleomorfni stadijum *G. idaeicola* retko formirao, pretpostavlja se da su piknidi dominantni u epidemiologiji bolesti.

U okviru ovih istraživanja *Septoria* spp. prvi put su opisane kao patogeni kupine u Srbiji, prisutne u 10 od 24 pregledana zasada. Utvrđeno je da je 10 ispitivanih izolata *Septoria* spp. morfološki slično dosadašnjim opisima vrste *Septocytia ruborum*. Status vrste *Septocytia ruborum* u literaturi nije usaglašen, tako da međuodnos ove vrste i izolata *Septoria* spp. dobijenim u ovom radu na osnovu obavljenih molekularnih analiza nije bilo moguće rasvetliti.

B. dothidea i *D. seriata*, poznati patogeni kupine u Srbiji, detektovani su u 5, odnosno 4 od 24 pregledana zasada. Detaljno je okarakterisano 5 izolata *B. dothidea* i 4 izolata *D. seriata*, a dobijeni rezultati pružili su prve informacije o morfološkim, patogenim i molekularnim karakteristikama izolata poreklom sa kupine u Srbiji i dat je prvi uvid u evolutivne međuodnose ispitivanih izolata i reprezentativnih izolata drugih vrsta ovih rodova.

B. cinerea detektovana je na manjem broju lokaliteta, u 3 od 24 pregledana zasada. Predstavljene su prve informacije o morfološkim, patogenim i molekularnim osobinama 3 ispitivana izolata *B. cinerea* poreklom sa stabla kupine u Srbiji.

C. kahawae prvi put je opisana kao patogen kupine u Srbiji. Potvrđena je u 3 od 24 pregledana zasada i okarakterisano je 3 izolata, što je pružilo prve podatke o rasprostranjenosti, morfološkim, patogenim i molekularnim karakteristikama izolata poreklom iz Srbije, kao i njihovom međuodnosu sa ostalim vrstama roda *Colletotrichum*.

D. betulae prvi put je opisana kao patogen kupine u Srbiji, a to je u isto vreme i prvi nalaz ovog patogena na kupini u svetu. Detektovana je u 2 od 24 pregledana zasada, a 2 izolata odabrana su za detaljnu karakterizaciju. Nakon potvrde patogenosti na kupini, identifikacija je obavljena na osnovu specifičnih morfoloških osobina kao i molekularnih i filogenetskih analiza i ustanovljenog međuodnosa sa drugim vrstama roda *Diaporthe*.

Prvi put je *D. eres* opisana kao patogen kupine u Srbiji detektovana u 1 pregledanom zasadu. Okarakterisan je 1 izolat i po prvi put su ispitani i utvrđeni evolutivni međuodnosi ispitivanih izolata sa kupine u Srbiji u odnosu na veći broj reprezentativnih izolata drugih vrsta roda *Diaporthe*.

Vrsta *N. parvum* prvi put je opisana kao patogen kupine u Srbiji, što je drugi nalaz na kupini u svetu. Ova vrsta detektovana je u 1 pregledanom zasadu, okarakterisan je 1 izolat i pružene su prve informacije o morfološkim, biološkim i molekularnim osobinama

izolata *N. parvum* sa kupine u Srbiji uključujući i evolutivne međuodnose sa drugim vrstama ovog i srodnih rodova.

Generisano je i deponovano ukupno 106 sekvenci, razvijeni su i odgovarajući protokoli za brzu detekciju i identifikaciju ispitivanih patogena što predstavlja osnov za preduzimanje odgovarajućih mera suzbijanja. Za 6 vrsta po prvi put je otkriveno da su patogeni kupine u Srbiji, a 1 vrsta prvi put je opisana kao patogen kupine u svetu.

8. LITERATURA

- Adair, R. J., Baguant, J., and Lawrie, A. C. (2012): Variation in *Septocyta ruborum* and its potential for biological control of European blackberry. Proceedings of Eighteenth Australasian Weeds Conference, 343-346.
- Abdollahzadeh, J., Zare, R., Phillips, A. J. L. (2013): Phylogeny and taxonomy of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species in Iran, with description of *Botryosphaeria scharifii* sp. nov. Mycologia, 105: 210-220.
- Afanador-Kafuri, L., González, A., Gañán, L., Mejía, J. F., Cardona, N., and Alvarez, E. (2014): Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. Plant Disease, 98:1503-1513.
- Aghighi, S., Burgess, T. I., Scott, J. K., Calver, M., and Hardy, G. E. St. J. (2016): Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining *Rubus anglocandicans*. Plant Pathology, 65: 451-461.
- Ariyawansa, H. A., Tanaka, K., Thambugala, K. M., Phookamsak, R., Tian, Q., Camporesi, E., Hongsanan, S., Monkai, J., Wanasinghe, D. N., Mapook, A., Chukeatirote, E., Kang, J. C., Xu, J. C., McKenzie, E. H. C., Jones, E. B. G., Hyde, K. D. (2014): A molecular phylogenetic reappraisal of the Didymosphaeriaceae (= Montagnulaceae). Fungal Diversity, 68: 69-104.
- Ariyawansa, H., Hyde, K. D., Liu, J. K., Wu, S. P., Liu, Z. Y. (2016): Additions to Karst Fungi 1: *Botryosphaeria minutispermata* sp. nov., from Guizhou Province, China. Phytotaxa, 275: 35-44.
- Aleksić, M., Stepanović, M., Duduk, B., Rekanović, E. (2012): *Septocyta ruborum*: occurrence and possibility of disease control in Serbia. Acta horticulturae, 946: 277-282.
- Alfieri, S. A. (1969): Stem and graft canker of rose. Plant Pathology, Circular No. 88.
- Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I., Correia, A. (2005): Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. FEMS Microbiology Letters, 245: 221-229.
- Anagnostakis, S. L. (2007): *Diaporthe eres* (*Phomopsis oblonga*) as a pathogen of butternut (*Juglans cinerea*) in Connecticut. Plant Disease, 91:1198.
- Arsenijević, M. (1984): *Glomerella cingulata* (Ston.) Spauld & Schrenk (konidijski stadijum *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.) kao parazit plodova višnje. Jugoslovensko voćarstvo, 18: 45-49.
- Arsenijević, M. (1989): Ljubičastocrvenkasta pegavost i izumiranje izdanaka kupine. Savremena pojjoprivreda, 37: 5-6.
- Arsenijević, M., Guberinić, Đ., Petrov, M. (1989): Karakteristike nekih izolata *Septocyta ruborum* (Lib.) Petrak, Syn. *Rhabdospora ramealis* (Rob. ex Desm.) Sacc., *R. ruborum* (Lib.) Jorstad izolovanih iz gajene kupine. Zaštita bilja, 190: 505-515.

- Arsenijević, M., and Veselić, M. (1995): *Gnomonia rostellata* (Fr.) Wehm., the pathogen of cultivated blackberry plants (*Rubus fruticosus* L., agg.). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 102: 366-374.
- Arsenijević, M., and Veselić, M. (1997): Development of *Gnomonia rostellata* (Fr.) Wehm., *in vitro*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107: 492-500.
- Arsenijević, M., Borić, B., Draganić, M., Spica, G., and Aleksić, G. (1999): Cultural characteristics and pathogenicity of *Seimatosporium lichenicola* (Corda) Shoemaker et Müller isolated from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) plants in Yugoslavia. *Journal of Plant Disease and Protection*, 106: 353-362.
- Arsenijević, M. (2006a): Vrste gljiva – prouzrokovaci nekroze izdanaka gajene i divlje kupine (I) *Septocyta ruborum* (Lieb.) Petrak, *Gnomonia rostellata* (Fr.) Wehm., *Phomopsis* spp., *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. *Biljni lekar*, 1: 40-46.
- Arsenijević, M. (2006b): Vrste gljiva – prouzrokovaci nekroze izdanaka gajene i divlje kupine (II) *Seimatosporium lichenicola*, *Bothryosphaeria dothidea*, *Bothryosphaeria obtusa*, *Coniothyrium fuckelii*, *Sphaceloma necator*, *Botrytis cinerea*. *Biljni lekar*, 2: 117-124.
- Assadollahi, M. (2013): Genetic diversity of *Botrytis cinerea* and its relevance in the development of fungicide resistance. PhD Thesis, University of Debrecen, Doctorate School of Juhasz-Nagy Pal.
- Batista, D., Silva, D. N., Vieira, A., Cabral, A., Pires, A. S., Loureiro, A., Guerra-Guimarães, L., Pereira, A. P., Azinheira, H., Talhinhos, P., do Céu Silva, M., and Várzea, V. (2017): Legitimacy and Implications of Reducing *Colletotrichum kahawae* to Subspecies in Plant Pathology. *Frontiers in Plant Science*, 7: 2051.
- Babović, M., i Delibašić, G. (1994): *Purpurna pegavost stabla kupine u okolini Valjeva*. U: Šestović, Nešković, Perić [ur.] *Zaštita bilja juče, danas, sutra*, Zemun: Društvo za zaštitu bilja Srbije.
- Balaž, J., Grbić, R., i Pižurica, B. (1994): Gljive kao prouzrokovaci sušenja grana breskve i mogućnosti njihovog suzbijanja. *Savremena poljoprivreda*, 42: 43-48.
- Balaž, J., Maširević, S., Radujkov, D., Iličić, R. (2013): Mikoze ukrasnih biljaka. *Biljni lekar*, 41: 611-630.
- Baskarathevan, J., Jaspers, M. V., Jones, E. E., Cruickshank, R. H., Ridgway, H. J. (2012): Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards. *Fungal Biology*, 116: 276-288.
- Baumgartner, K., Fujiyoshi, P. T., Travadon, R., Castlebury, L. A., Wilcox, W. F., Rolshausen, P. E. (2013): Characterization of species of *Diaporthe* from wood cankers of grape in eastern North American vineyards. *Plant Disease*, 97: 912-920.
- Behr, M., Legay, S., and Evers, D. (2013): Molecular identification of *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp. and *Cladosporium* spp. in Luxembourg. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 47: 239-247.

- Billones-Baaijens, R., Jones, E. E., Ridgway, H. J., Jaspers, M. V. (2013): Virulence affected by assay parameters during grapevine pathogenicity studies with Botryosphaeriaceae nursery isolates. *Plant Pathology*, 62: 1214-1225.
- Boyzo-Marin, J., Silva-Rojas, H. V., and Rebollar-Alviter, A. (2015): Biorational treatments to manage dryberry of blackberry caused by *Peronospora sparsa*. *Crop Protection*, 76: 121-126.
- Bristow, P. R., and Williamson, B. (2017): Botrytis Fruit Rot and Blossom Blight. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 34-37.
- Brannen, P. M., and Ellis, M. A. (2017): Septoria Leaf Spot of Blackberry. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 31-32.
- Braun, G. (2017): Fire Blight. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 63-65.
- Bulit, J., and Dubos, B. (1988): *Botrytis* Bunch Rot and Blight in "Compendium of Grape Disease" eds Pearson and Goheen. APS. Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Jaklitsch, W. J., Vasilyeva, L. N. (2002): A preliminary overview of the Diaporthales based on large subunit nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 94: 1017-1031.
- Carbone, I., and Kohn, L. M. (1999): A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Cheng-nan, X., Hong-jun, Z., Fu-mei, C., Zhi-rui, J., Qing-long, D., Ke-qiang, C., Zong-shan, Z. (2016): Species-specific PCR-based assays for identification and detection of Botryosphaeriaceae species causing stem blight on blueberry in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 15: 573-579.
- Chen, Q., Jiang, J. R., Zhang, G. Z., Cai, L., and Crous, P. W. (2015): Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology*, 82: 137-217.
- Clark, J. R., Stafne, E. T., Hall, H. K. and Finn, C. E. (2007): Blackberry Breeding and Genetics, in *Plant Breeding Reviews*, Volume 29 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Clark, J. R., and Finn, C. E. (2011): Blackberry Breeding and Genetics. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 5: 27-43.
- Clark, J. R., and Finn, C. E. (2014): Blackberry cultivation in the world. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36: 46-57.
- Comby, M., Lacoste, S., Baillieul, F., Profizi, C., Dupont, J. (2016): Spatial and Temporal Variation of Cultivable Communities of Co-occurring Endophytes and Pathogens in Wheat. *Frontiers in Microbiology*, 7: 403.

- Converse, R. H., and Martin, R. R. (2017a): Cucumber Mosaic. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 81.
- Converse, R. H., and Martin, R. R. (2017b): Blackberry Calcio. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 78-80.
- Converse, R. H. (1991): Tomato Ringspot. In: Ellis MA, Converse RH, Williams RN, Williamson B, eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Insects. St Paul, MN, USA: APS Press, 49-50.
- Cook, R. (2017): Global Fresh Berry Trends: Focus on the European Market. November 16, 2017 for Amsterdam Produce Show. http://cuisinedocbox.com/Coffee_and_Tea/75743742-Global-fresh-berry-trends-focus-on-the-european-market.html
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J. Z. (2006): Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55: 235-253.
- Crouch, J. A., Clarke, B., Hillman, B. (2009): What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematic and species diagnosis? A case study using the falcate-spored gramminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia*, 101: 648–656.
- Daubeny, H. A. (1996): Brambles. In: Fruit Breeding. Vol. II. Vine and Small Fruit Crops, (Janick J., Moore J.N., eds), John Wileys and Sons, Inc., USA, 109-188.
- Davis, R. P. (2017): Postharvest Soft Rot. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 37-38.
- Denman, S., Crous, P. W., Taylor, J. E., Kang, J. .C., Pascoe, I. and Wingfield, M. J. (2000): An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45: 129-140.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., and Crous, P. W. (2012a): The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 37-113.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., Johnston, P. R., Weir, B. S., Tan, Y. P., Shivas, R. G., and Crous, P. W. (2012b): The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*, 73:1-36.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., and Ellis, J. (2012): The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414-430.
- De Gruyter, J., Boerema, G. H., Van der Aa, H. A. (2002): Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) VI. 2. Section Phyllostictoides: outline of its taxa. *Persoonia*, 18: 1-53.
- Dhingra, O. D., and Sinclair, J. B. (1995): *Basic Plant Pathology Methods*. Second Edition. CRC Press, USA.

- Dissanayake, A. J., Liu, M., Zhang, W., Chen, Z., Udayanga, D., Chukeatirote, E., Li, X., Yan, J., Hyde, K. D. (2015): Morphological and molecular characterisation of *Diaporthe* species associated with grapevine trunk disease in China. *Fungal biology*, 119: 283-294.
- Dissanayake, A. J., Camporesi, E., Hyde, K. D., Zhang, W., Yan, J., and Li, X. (2017a): Molecular phylogenetic analysis reveals seven new *Diaporthe* species from Italy. *Mycosphere*, 8: 853-877.
- Dissanayake, A. J., Phillips, A. J. L., Hyde, K. D., Yan, J. Y, Li, X. H. (2017b): The current status of species in *Diaporthe*. *Mycosphere*, 8: 1106-1156.
- Du, Z., Fan, X., Hyde, K., D., Yang, Q., Liang, Y., and Tian, C. (2016): Phylogeny and morphology reveal two new species of *Diaporthe* from *Betula* spp. in China. *Phytotaxa*, 269: 090–102.
- Ellis, M. A., Kuter, G. A., and Wilson, L. L. (1984): Fungi That Cause Cane Cankers on Thornless Blackberry in Ohio. *Plant Disease*, 68: 812-815.
- Ellis, M. A. (1991): Septoria Leaf Spot of Blackberry. In: Ellis MA, Converse RH, Williams RN, Williamson B, eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Insects*. St Paul, MN, USA: APS Press, 18-19.
- Elena, G., Garcia-Figueres, F., Reigada, S., and Luque, J. (2015): Intraspecific variation in *Diplodia seriata* isolates occurring on grapevines in Spain. *Plant Pathology*, 64: 680-689.
- Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P., and Rossman, A. Y. (1989): *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Farr, D. F., Rossman, A. Y. (2013): Fungal databases. *Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Faedda, R., Scuderi, G., Licciardello, G., and Granata, G. (2018): *Neofusicoccum parvum* causes stem canker of thornless blackberry in Italy. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22301
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Beasley, E. D., Brannen, P. M., and Schnabel, G. (2014): First Report of Fludioxonil Resistance in *Botrytis cinerea* from a Blackberry Field in Georgia. *Plant Disease*, 98: 848.
- Feige, G. B., Ale-Agha, N., and Nagel, B. (2001): Microfungi on Rosaceae in eastern Westphalia (Sauerland, Northrhine-Westphalia, Germany). In: *Proceedings of the 53rd International Symposium on Crop Protection*. Belgium, 8 May 2001, pp. 117-132.
- Focke, W. O. (1910-1914): *Species Ruborum*. Monographic generis Rubi Prodrumus, Stuttgart.
- Forero de La Rotta, M. C., Avila, W., Gonzalez, R. (2002): Estudio sobre Antracnosis en mora de Castilla. In: *Memorias del cuarto seminario nacional de frutales de clima frio moderado: IV Seminario de Frutales de Clima Frio Moderado*. Medellin, Colombia, pp 220–228. Internet Resource: <http://books.google.com/books?id=G8CnojHybXoC> (verified June 28, 2011).

- Garrett, C. M. E. (1978): Crown gall of blackberry: Field spread and susceptibility to disease. *Plant Pathology*, 27: 182-186.
- Garić, R., i Ranković, M. (1996): Bolesti kupine. *Biljni Lekar* 2: 112-114.
- Garibaldi, A., Bertetti, D., Poli, A., Gullino, M. L. (2011): First report of black rot caused by *Phomopsis cucurbitae* on cantaloupe (*Cucumis melo*) in the piedmont region of northern Italy. *Plant Disease*, 95: 1317.
- Gadgil, P. D., Dick, M. A., Hood, I. A., Pennycook, S. R. (2005): Fungi on trees and shrubs in New Zealand. Fungal diversity research series, no. 16.; Fungi of New Zealand Volume 4. Fungal Diversity Press, Hong Kong.
- Gajić, S., Delibašić, G., Vasić, T., Aćimović, S. (2006): Pojava *Botryosphaeria* sp., kao mogućeg prouzrokača raka i izumiranja čokota vinove loze u nekim vinogorjima Srbije. *Zbornik rezimeja, VIII savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor*, 104-105.
- Gardes, M., and Bruns, T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2:113-118.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., and Brygoo, Y. (1997): RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 1177-1185.
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. (2013): *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31:1-41.
- Grimova, L., Winkowska, L., Konrady, M., and Ryšánek, P. (2016): Apple mosaic virus. *Phytopathologia Mediterranea*, 55: 1-19.
- Grahovac, M., Inđić, D., Tanović, B., Lazić, S., Vuković, S., Hrustić, J., Gvozdenac, S. (2011): Integralna zaštita jabuka od prouzrokača truleži u skladištima. *Pesticidi i fitomedicina*, 26: 289-299.
- Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., Damm, U., Armengol, J. (2012): Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia*, 28: 1-13.
- Gubler, W. D., and Rebbollar-Alviter, A. (2017): Downy mildew. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 25-28.
- Humphreys, D. R. J. (1975): Cane Blight (*Leptosphaeria coniothyum* (Fuckel) Sacc.) of Blackberries. *Plant Pathology*, 24: 122-123.
- Hui-Fang, N., Hong-Ren, Y., Ruey-Shyang, C., Ting-Hsuan, H., Ruey-Fen, L. (2012): A nested multiplex PCR for species-specific identification and detection of Botryosphaeriaceae species on mango. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 819-828.
- Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., de Cock, A. W. A. M., Dissanayake, A. J., Glockling, S. L., Goonasekara, I. D., Gorczak, M., Hahn, M., Jayawardena, R. S., van Kan, J. A. L., Laurence, M. H., André

- Lévesque, C., Li, X., Liu, J. K., Maharachchikumbura, S. S. N., Manamgoda, D. S., Martin, F. N., McKenzie, E. H. C., McTaggart, A. R., Mortimer, P. E., Nair, P. V. R., Pawlowska, J., Rintoul, T. L., Shivas, R. G., Spies, C. F. J., Summerell, B. A., Taylor, P. W. J., Terhem, R. B., Udayanga, D., Vaghefi, N., Walther, G., Wilk, M., Wrzosek, M., Xu, J. C., Yan, J., and Zhou, N. (2014): One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity*, 67: 21-125.
- Ivanović, M., Ivanović, D. (2005): Bolesti voćaka i vinove loze i njihovo suzbijanje. Beograd, 2005.
- Ivanović, M., Duduk, B., Nastovski, N. (2006): Bolesti kantariona i njihovo suzbijanje. U: Kantarion (*Hypericum perforatum* L.) i druge vrste roda *Hypericum* (Radanović D., Nastovski T., Menković N., priređivači), str. 91-102. Institut za proučavanje lekovitog bilja „Josif Pančić“, Beograd.
- Ivanović, M. S., Duduk, B. B., Ivanović, M. M., Ivanović, M. S. (2007): Nova bolest jagode u Srbiji. *Biljni lekar*, 35: 491-498.
- Jacobs, K. A., and Rehner, S. A. (1998): Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia*, 90: 601–610.
- Jennings, D. L. (1988): Raspberries and Blackberries – Their Breeding, Disease and Growth. Academic Press, London.
- Jiye, Y., Yue, X., Shengwei, Y., Zhongyue, W., Xinghong L. (2012): Characterization of *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of grapevine canker in China. *Australasian Plant Pathology*, 41: 351-357.
- Kaliternam, J., Milicevic, T., Cvjetkovic, B. (2012): Grapevine trunk diseases associated with fungi from the Diaporthaceae family in Croatian vineyards. *Archives of industrial hygiene and toxicology*, 63: 471-478.
- Kaliternam, J., Milicevic, T., Bencic, D., and Durajlija, B. (2013): First Report of *Neofusicoccum parvum* Associated with Grapevine Trunk Diseases in Croatia. *Plant Disease*, 97:1656.2-1656.2.
- Karačić, A., Ivić, D., Perić, D., Rotim, N. (2011): Ljubičasta pjegavost kupine *Septocytia ruborum* (Lib.) Petr. (sin. *Rhabdospora ramealis* (Roberge ex Desm.) Sacc.) u Tomislavgradu. *Glasnik zaštite bilja*, 1/2011: 84-87.
- Karadžić, D., Milijašević, T., Keča, N. (2000): Prilog proučavanju parazitske gljive *Botryosphaeria dothidea* uzročnika raka i sušenja stabala. *Glasnik Šumarskog Fakulteta*, 83: 87-97.
- Keserović, Z., Magazin, N. (2012): "Voćarstvo Srbije – stanje i perspektive". Primena podataka Popisa poljoprivrede 2012. u analizi stanja poljoprivrede i planiranju agrarne politike u Republici Srbiji. *Zbornik radova*, 192-210.
- Kerssies, A., Bosker-van Zessen, I., Wagemakers, C. A. M., and van Kan, J. A. L. (1997): Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Disease*, 81: 781-786.
- Khazaeli, P., Zamanizadeh, H., Morid, B., Bayat, H. (2010): Morphological and Molecular Identification of *Botrytis cinerea* Causal Agent of Gray Mold in *Rose*

- Greenhouses in Central Regions of Iran. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 1: 19-24.
- Kolomiets, T., Mukhina, Z., Matveeva, T., Bogomaz, D., Berner, D. K., Cavin, C. A., Castlebury, L. A. (2009): First report of stem canker of *Salsola tragus* caused by *Diaporthe eres* in Russia. *Plant Disease*, 93: 110.
- Kudela, V., Kocourek, F., Barnet, M. (2012): Czech and English names of plant diseases and pests. Praha 2012.
- Langford, G., Stanley, J., Andersen, M. T., and Braithwaite, M. (2003): Boysenberry decline: identification and control of a serious disease of boysenberries. *New Zealand Plant Protection*, 56: 103-105.
- Levis, C., Fortini, D., and Brygoo, Y. (1997): Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular Genetics and Genomics*, 254: 674–680.
- Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., Schnabel, G. (2012): *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia*, 104: 650-658.
- Li, X., Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., and Schnabel, G. (2014): Resistance to fludioxonil in *Botrytis cinerea* isolates from blackberry and strawberry. *Phytopathology*, 104: 724-732.
- Li, X. (2015): "Characterization of a New *Botrytis* Species and Fungicide Resistance in *Botrytis Cinerea* from Blackberry". All Dissertations. Paper 1483.
- Lindqvist-Kreuzer, H., Hellqvist, S., Koponen, H., and Valkonen, J. P. T. (2003): *Phoma–Didymella* complex on hybrid arctic bramble with wilting symptoms. *Plant Pathology*, 52: 567-578.
- Locke, T. (2017): Silver Leaf. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 33-34.
- Lombard, L., van Leeuwen, G., Guarnaccia, V., Polizzi, G., van Rijswick, P., Rosendahl, K., Crous, P. (2014): *Diaporthe* species associated with *Vaccinium* in Europe. *Phytopathologia Mediterranea*. [S.l.], apr. 2014. ISSN 1593–2095. <http://www.fupress.net/index.php/pm/>
- Lyman, M. R., Curry, K. J., Smith, B. J., and Diehl, S. V. (2004): Effect of *Cercospora rubi* on blackberry floral bud development. *Plant Disease*, 88: 195-204.
- Maas, J. L., and Uecker, F. A. (1984): *Botryosphaeria dothidea* Cane Canker of Thornless Blackberry. *Plant Disease*, 68: 720-726.
- Maas, J. L., Galleta, G. J., Ellis, M. A. (1989): Cane canker diseases of thornless blackberry in eastern united states. *ISHS Acta Horticulturae*, 262:29.
- Martin, M. T., Cuesta, M. J., and Martin, L. (2014): Development of SCAR Primers for PCR Assay to Detect *Diplodia seriata*. *International Scholarly Research Notices*, Volume 2014, Article ID 824106, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/824106>
- Martin, R. R., MacFarlan, S., Sabanadzovic, S., Diego, Q., Poudel, B., Tzanetakis, E. (2013): Viruses and Virus Diseases of *Rubus*. *Plant Disease*, 97: 168-182.
- Martin, R. R., and Tzanetakis, I. E. (2017): Other Viruses and Viruslike Agents. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry*

- and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 91-93.
- Martin, R. R. (2017): *Rubus stunt*. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 67-69.
- Martin, R. R., Ellis, M. A., Williamson, B., Williams, R. N. (2017): Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Martin, R. R., and Converse, R. H. (2017): Raspberry Leaf Curl. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 86-87.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., and Fermaud, M. (2003): Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology, 109: 479-488.
- Ma, Z., Boehm, E. W. A., Luo, Y., and Michailides, T. J. (2001): Population structure of *Botryosphaeria dothidea* from pistachio and other hosts in California. Phytopathology, 91: 665-672.
- Ma, Z., and Michailides, T. J. (2005): Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. Plant Disease, 10: 1083-1089.
- Maširević, S., Jasnić, S. (2006): Trulež korena, stabla i glavice suncokreta. Biljni lekar, 34: 336-343.
- Melnik, V. A., Popushoj, J. S. (1992): Nesavershenie gribi na drevesnih i kustarnikovih porodah (Fungi imperfecti on woody and shrub plants, in Russian). Atlas. Moldavian Academy of Sciences, Plant Physiology Institute, 322-325.
- Mercier, J., and Kong, M. (2017): *Verticillium* Wilt. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 56-58.
- Michailides, T. J. (1991): Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. Phytopathology, 81:566-573
- Mims, C. W., and Richardson, E. A. (2007): Ultrastructure of teliospores and promycelium and basidiospore formation in the two-spored form of *Gymnoconia nitens*, one of the causes of orange rust of *Rubus*. Canadian Journal of Botany, 85: 935-940.
- Mirhosseini, H. A., Rahimian, H., Babaeizad, V., and Hashemi, L. (2015): Outbreak of leafspot on blackberry (*Rubus fruticosus*) caused by *Gnomoniopsis* sp. in Iran. New Disease Reports, 31: 9.
- Miletić, N. (2000): Zaštita vinove loze. Biljni lekar, 28: 166-168.
- Milijašević, T. (2005): Bolesti ruža i mere zaštite. VII savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar. Zbornik rezimea, 187-188.
- Milijašević, T. (2009): Parazitske i saprofitske gljive na vrstama iz roda *Paulownia*. Glasnik Šumarskog fakulteta, 99: 91-99.

- Milijašević, T., Karadžić, D. (2003): Pojava *Botryosphaeria dothidea* – uzročnika sušenja ukrasnih biljaka u urbanim sredinama. Zbornik Rezimeja sa VI Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 24.
- Mijušković, M. (1953): Neke bolesti i štetočine agruma na Crnogorskom primorju. Zaštita bilja, 19: 47-60.
- Moročko, I., Fatehi, J. (2007): Molecular characterization of strawberry pathogen *Gnomonia fragariae* and its genetic relatedness to other *Gnomonia* species and members of Diaporthales. Mycological research, 111: 603-614.
- Morin, L., Gomez, D. R., Evans, K. J., Neill, T. M., Mahaffee, W. F., Linde, C. C. (2013): Invaded range of the blackberry pathogen *Phragmidium violaceum* in the Pacific Northwest of the USA and the search for its provenance. Biological Invasions, 15: 1847-1861.
- Montgomerie, I. G. (2017): Stamen Blight. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 39-40.
- Moral, J., Lovera, M., Benitez, M. J., Arquero, O., and Trapero, A. (2007): First report of *Botryosphaeria obtusa* causing fruit rot of quince (*Cydonia oblonga*) in Spain. Plant Pathology, 56: 351.
- Moyano, C., Alfonso, C., Gallego, J., Raposo, R., and Melgarejo, P. (2003): Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. European Journal of Plant Pathology, 109: 515-522.
- Muntanola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija, Niro Književne novine, Beograd, 13–320.
- Munro, J. M., Dolan, A., and Williamson, B. (1988): Cane spot (*Elsinoe veneta*) in red raspberry: infection periods and fungicidal control. Plant Pathology, 37: 390-396.
- Nikolić, D. M., i Milivojević, M. J. (2015): Jagodaste voćke. Tehnologija gajenja. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Nikolić, M., and Tanović, B. (2012): *Rubus* and *Ribes* Industry in Serbia: a Production Model for Developing Countries. Proceedings of the Tenth International *Rubus* and *Ribes* Symposium. Acta Horticulturae, 946: 405-412.
- Niekerk, J. M, Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., Haleen, F. (2004): DNA phylogeny morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species occurring on grapevines. Mycologia, 96: 781-798.
- Nordskog, B., Stensvand, A., and Heiberg, N. (2003): Fungi Occurring on Aerial Constituents of Cultivated Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) in Norway. Acta Agriculturae Scandinavica, 53: 21-28.
- O'Donnell, K., and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution, 7: 103-116.
- Pavlović, S., Stojanović, S., Kuzmanović, S., Starović, M., Živković, S., Dolovac, N. (2012): Etiologija oboljenja važnijih plantažno gajenih lekovitih biljaka u Srbiji. Zaštita bilja, 63: 224-241.

- Pastrana, A. M., Kirkpatrick, S. C., Kong, M., Broome, J. C., and Gordon, T. R. (2017): *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, a New Forma Specialis Causing Fusarium Wilt of Blackberry. *Plant Disease*, 101: 2066-2072.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J. (2009): Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: A case study on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51: 259-268.
- Perišić, M. (1951): *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc-prouzrokovatelj sušenja grana i stabla maline. *Zaštita bilja*, 8.
- Petrović, K., Vidić, M., Ricconi, L., Đorđević, V., and Rajković, D. (2015): First Report of *Diaporthe eres* Species Complex Causing Seed Decay of Soybean in Serbia. *Plant Disease*, 99: 1186.
- Pennycook, S. R., Samuels, G. J. (1985): *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon*, 24: 445-458.
- Pellegrini, N., Searfina, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., and Brighenti, F. (2003): Total antioxidant capacity of plant, foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133: 2812-2819.
- Phillips, A. J. L. (2002): *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 3-18.
- Phillips, A. J. L., Rumbos, I. C., Alves, A., Correia, A. (2005): Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia*, 159: 433-439.
- Phillips, A. J. L., Crous, P. W and Alves, A. (2007): *Diplodia seriata*, the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusata*. *Fungal Diversity*, 25: 141-155.
- Phillips, A. J. L., Lopes, J., Abdollahzadeh, J., Bobev, S., Alves, A. (2012): Resolving the *Diplodia* complex on apple and other Rosaceae hosts. *Persoonia*, 29: 29-38.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., and Crous, P.W. (2013): The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76: 51-167.
- Pitt, W. M., Huang, R., Steel, C. C., and Savocchia, S. (2010): Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16: 258-271.
- Putnam, M. L. (2017): Crown and Cane Gall. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 61-63.
- Qiu, Y., Savocchia, S., Steel, C. C., and Ash, G. J. (2008): *Botryosphaeria dothidea* associated with grapevine trunk disease in south-eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 37: 482-485.

- Quaglia, M., Moretti, C., Buonauro, R. (2014): Molecular characterization of *Diplodia seriata*, a new pathogen of *Prunus laurocerasus* in Italy. *Phytoparasitica*, 42: 189-197.
- Quaedvlieg, W., Verkley, G. J. M., Shin, H. D., Barreto, R. W., Alfenas, A. C., Swart, W. J., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. (2013): Sizing up *Septoria*. *Studies in Mycology*, 75: 307-390.
- Reyes-Carmona, J., Yousef, G. G., Martinez-Peniche, R. A., and Lila, M. A. (2005): Antioxidant Capacity of Fruit Extracts of Blackberry (*Rubus* sp.) Produced in Different Climatic Regions. *Journal of Food Science*, 70: 497-503.
- Republički zavod za statistiku - Republika Srbija (2018): Biljna proizvodnja od 2005, kupine. <http://webrzs.stat.gov.rs/WebSite/Public/ReportResultView.aspx?rptKey=indId%3d130102IND01%26102%3dRS%2cRS1%2cRS11%2cRS12%2cRS2%2cRS21%2cRS22%262%3d201500%2c201600%2c201700%2639%3d35001%266%3d1%2c2%2c3%26sAreaId%3d130102%26dType%3dName%26lType%3dSerbianCyrillic>
- Rehner, S. A., and Uecker, F. A. (1994): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the Coelomycete *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botany*, 72: 1666-1674.
- Ristić, D., Stevnović, M., Stošić, S., Vučurović, I., Gašić, K., Gavrilović, V., Živković, S. (2016): *Diaporthe eres* as a pathogen of quince fruit (*Cidonia oblonga*) in Serbia. Book of proceedings, VII International Scientific Agricultural Symposium “Agrosym 2016”, Jahorina, BIH, 1270-1275.
- Rueda-Hernandez, K. R., Cardona, A. S., Cadavid-Restrepo, G. E., Benjumea, C. I. S., Gutierrez, G. P. C., Isaza, R. E. A. (2013): Differential Organ Distribution, Pathogenicity and Benomyl Sensitivity of *Colletotrichum* spp. from Blackberry Plants in Northern Colombia. *Journal of Phytopathology*, 161: 246-253.
- Rumbos, C. (1987): Twig and branch dieback of walnut trees induced by *Botryosphaeria ribis*. *Plant Pathology*, 36: 602-605.
- Rehner, S. A., and Buckley, E. (2005): A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97: 84-98.
- Sakalidis, M. L., Hardy, G. E. St. J., Burgess, T. I. (2011): Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum*-*Neofusicoccum ribis* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60: 333-344.
- Santos, L., Phillips, A. J. L., Crous, P. W., and Alves, A. (2017): *Diaporthe* species on Rosaceae with descriptions of *D. pyracanthae* sp. nov. and *D. malorum* sp. nov. *Mycosphere*, 8: 485-511.
- Seemüller, E., Kartte, S., and Erdel, M. (1978): Penetration of the Periderm of Red Raspberry Canes by *Leptosphaeria coniothyrium*. *Journal of Phytopathology*, 123: 362-369-

- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. and Wingfield, M. J. (2004): Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, 96: 83-101.
- Slippers, B., Smit, W. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. (2007): Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology*, 56: 128-139.
- Slippers, B., Roux, J., Wingfield, M. J., van der Walt, F. J. J., Jami, F., Mehl, J. W. M., Marais, G. J. (2014): Confronting the constraints of morphological taxonomy in the Botryosphaeriales. *Persoonia*, 33: 155-168.
- Smith, B. J. (2017): Rosette of Blackberry. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 23-25.
- Smith, B. J., and Killebrew, J. F. (2002): Epidemiology and Control of Blackberry Rosette Caused by the Fungus *Cercospora rubi*. *Proc. 8th IS on Rubus and Ribes*, 319-323.
- Smith, B. J., and Maas, J. L. (2017): Botryosphaeria Cane Canker of Blackberry. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 22-23.
- Smith, D. R., and Stanosz, G. R. (2001): Molecular and morphological differentiation of *Botryosphaeria dothidea* (anamorph *Fusicoccum aesculi*) from some other fungi with *Fusicoccum* anamorphs. *Mycologia*, 93: 505-515.
- Sogonov, M. V., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Mejia, L. C., White, J. F. (2008): Leaf-inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales. *Studies in Mycology*, 62: 1-77.
- Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. (1995): *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3rd ed. W. H. Freeman and Company, New York.
- Stanisavljević, M. (1998): Nova sorta kupine bez bodlji Čačanska bestrna. *Zbornik Jugoslovenskog simpozijuma o jagodastom voću*. Beograd, 75.
- Stojanović, S. (1989): Proučavanje *Sphaeropsis visci* (Salm.) Sacc. i *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. – parazita bele imele. *Zaštita bilja*, 190: 493-503.
- Stojanović, S., Živković, S., Gavrilović, V., Starović, M., Aleksić, G., Pavlović, S. (2003): *Botryosphaeria obtusa* prouzrokovatelj truleži ploda jabuke u Srbiji. *Zaštita bilja*, 54: 19-31.
- Stojanović, S., Gavrilović, V., Starović, M., Pavlović, S., Živković, S. (2002): Novi domaćini gljiva iz roda *Colletotrichum* u Srbiji. *Zaštita bilja*, 53: 171-179.
- Strik, B. C., Clark, J. R., Finn, Ch. E., Baados, P. M. (2007): Worldwide production of blackberries. *Acta Horticulturae*, 777: 209-217.

- Stewart, P. J., Clark, J. R., Fenn, P. (2003): Evaluation of Resistance to *Erwinia amylovora* and *Botryosphaeria dothidea* in Eastern U.S. Blackberry Cultivars. Horticultural studies, 32-34.
- Stewart, P. J., Clark, J. R., Fenn, P. (2005): Detached Cane Assay of Resistance to *Botryosphaeria* Cane Canker (*Botryosphaeria dothidea*) in Eastern U.S. Blackberry Genotypes. International Journal of Fruit Science, 5: 57-64.
- Stević, M., Šević, M., Vukša, P. (2014): Efikasnost kombinacije piraklostrobin + boskalid u suzbijanju sive truleži i plamenjače salate. Biljni lekar, 42: 308-313.
- Stojanović, S. D. (2004): Poljoprivredna fitopatologija. Kragujevac, 2004.
- Sutton, B. C. (1980): The Coleomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew UK, 1980.
- Sutton, B. C., and Williamson, B. (2017): Ascospora Dieback. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 20-22.
- Taylor, A., Hardy, G. E. St J., Wood, P., and Burgess, T. (2005): Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. Australasian Plant Pathology, 34: 187-195.
- Tamayo, P. J. (2001): Mora de Castilla. In: Principales Enfermedades del Tomate de Arbol, la Mora y el Lulo en Colombia. Boletín Técnico 12. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. Rionegro, Antioquia, Colombia, pp 21. Internet Resource: http://books.google.com/books?id=DdNND_xsSAC (verified Jun 28, 2012).
- Tanović, B. (2012): *Botrytis cinerea* - prouzročivač sive truleži jagodastog voća. Biljni lekar, 40: 77-91.
- Tanović, B., Delibašić, G., Milivojević, J., Nikolić, M. (2009): Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. Archives of Biological Sciences, 61: 419-429.
- Tanović, B., Hrustić, J., Mihajlović, M., Grahovac, M., Delibašić, G. (2014): *Botrytis cinerea* in raspberry in Serbia I: Morphological and molecular characterization. Journal Pesticides and Phytomedicine, 29: 237-247.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.
- Thomidis, T., Michailides, T. J. (2009): Studies on *Diaporthe eres* as a new pathogen of peach trees in Greece. Plant Disease, 93:1293-1297.
- Thomidis, T., Michailides, T. J., Exadaktylou, E. (2011): *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. European Journal of Plant Pathology, 131: 661,8.
- Travis, J. W., and Williamson, B. (2017): Anthracnose. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 8-11.

- Travadon, R., Baumgartner, K., Rolshausen, P. E., Gubler, W. D., Sosnowski, M. R., Lecomte, P., Halleen, F., Peros, J. P. (2012): Genetic structure of the fungal grapevine pathogen *Eutypa lata* from four continents. *Plant Pathology*, 61: 85-95.
- Tzanetakis, I. E., Guzmán-Baeny, T. L., VanEsbroeck, Z. P., Fernandez, G. E., and Martin, R. R. (2009): First report of Impatiens necrotic spot virus in blackberry Southeastern United States. *Plant Disease*, 93: 432.
- Tzanetakis, I. E. (2017): Blackberry virus F. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 80.
- Tzanetakis, I. E., Susaimuthu, J., Sabanadzovic, S., and Martin, R. R. (2017): Blackberry Yellow Vein Disease. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 71-75.
- Trkulja, V. (2004): Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* spp. prouzrokovaca gorke truleži ploda jabuke. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Udayanga, D., Liu, X. Z., Crous, P. W., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Hyde, K. D. (2012): A multilocus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity*, 56: 157-171.
- Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Chukeatirote, E., Hyde, K. D. (2014a): Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. *Fungal Diversity*, 67:203-229.
- Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A., Hyde, K. D. (2014b): Species limits in *Diaporthe*: a molecular reassessment of *D. citri*, *D. cytosporrella*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia*, 32: 83-101.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., Gubler, W. D. (2006): Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90: 1490-1503.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., and Gubler, W. D. (2008): Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92: 519-529.
- Úrbez-Torres, J. R., and Gubler, W. D. (2009): Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 93: 584-592.
- USDA (2018): United States Department of Agriculture. Statistics by Subject. National Statistics for Blackberries.
https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_Subject/result.php?48648E85-64E2-37B7-9801-5821F6CEB7F3§or=CROPS&group=FRUIT%20%26%20TREE%20NUTS&comm=BLACKBERRIES

- Varadi, C., Kovacs, V. G., Gilly, A. (1993): *Leptosphaeria coniothyrium* (Fuck.) sacc. and *Botryosphaeria obtusa* (SCHW.) Shoem., new pathogens of thornfree bramble in Hungary. *Bibliography*, 29: 471.
- Vasić, M., Duduk, N., Vico, I., Ivanović, M. S. (2013): First report of *Botryosphaeria dothidea* causing white rot of apple fruit in Serbia. *Plant Disease*, 97: 1659.
- Verkley, G. J. M., Quaedvlieg, W., Shin, H. D., and Crous, P. W. (2013): A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Studies in Mycology*, 75: 213-305.
- Verkley, G. J. M., da Silva, M., Wicklow, D. T., and Crous, P. W. (2004): *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology*, 50: 323-335.
- Veličković, M. (2000): Jagodasto voće. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Veselić, M., and Arsenijević, M. (1998): Host range of *Gnomonia rostellata* (Fr.) Wehm., the Pathogen of Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Plants. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 33: 291-296.
- Veselić, M. (1994): Morfološke, odgajivačke i patogene odlike *Gnomonia rostellata* (FR.) Wehm., parazita gajene kupine. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Vrandečić, K., Jurković, D., Ćosić, J. (2010): *Phomopsis* vrste na vinovoj lozi u istočnoj hrvatskoj [*phomopsis* species on grapevine in eastern Croatia, in Croatian]. *Glasilo biljne zaštite*, 4: 246-252.
- Vrandečić, K., Jurkovic, D., Cosic, J., Postic, J. (2011): First Report of Cane Blight on Blackberry Caused by *Diaporthe eres* in Croatia. *Plant disease*, 95: 612.
- Walker, D. M., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Sogonov, M. V., White, J. F. (2010): Systematics of genus *Gnomoniopsis* (Gnomoniaceae, Diaporthales) based on a three gene phylogeny, host associations and morphology. *Mycologia*, 102: 1479-1496.
- Walker, D. M., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., White, J. F. Jr. (2012): New molecular markers for fungal phylogenetics: Two genes for species-level systematics in the Sordariomycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64: 500-512.
- Wet, J. D., Slippers, B., Preisig, O., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. (2008): Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 116-126.
- Wetzel, T., and Krczal, G. (2007): Molecular Biology of Raspberry ringspot nepovirus. *Plant Viruses*, 1: 45-51.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., and Damm, U. (2012): The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 115-180.
- White, T. J., Bruns, S. L.T., Taylor, J. W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.

- Williamson, B., and Hargreaves, A. J. (1978): Cane Blight (*Leptosphaeria coniothyrium*) in mechanically harvested red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Annals of Applied Biology*, 88: 37-43.
- Williamson, B. (1980): *Sydowiella depressula* on red raspberry. *Transactions of the British Mycological Society*, 74: 647-649.
- Williamson, B., Bristow, P. R., and Seemüller, E. (1986): Factors affecting the development of cane blight (*Leptosphaeria coniothyrium*) on red raspberries in Washington, Scotland, and Germany. *Annals of Applied Biology*, 108: 33-42.
- Williamson, B. (2017a): Spur blight. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 15-17.
- Williamson, B. (2017b): Purple Blotch. In Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 19-20.
- Williamson, B. (2017c): *Sydowiella* and *Gnomonia* Cane Cancers. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 32-33.
- Williamson, B. (2017d): Minor Rust Diseases. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 51-52.
- Williamson, B. (2017e): Cane Blight. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 11-13.
- Williamson, B. (2017f): Cane Botrytis. In: Martin RR, Ellis MA, Williamson B, Williams RN eds. *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. Second edition. St Paul, MN, USA: APS Press, 17-19.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J. A. L. (2007): *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8: 561-580.
- Wright, E. R., Mandolesi, A., Rivera, M. C., Perez, B. A. (2012): *Neofusicoccum parvum*, blueberry pathogen in Argentina. *Acta horticulturae*, 926.
- Zdravković, J., Ugrinović, M., Zdravković, M., Đorđević, S., Pavlović, S., Jošić, D. (2015): *In vitro* i *in vivo* efekti *Pseudomonas* spp. i *Bacillus* sp. na *Fusarium acuminatum*, *Botrytis cinerea* i *Aspergillus niger* na krastavcu. *Pesticidi i fitomedicina*, 30: 169-178.
- Zhongdong, Y., Guanghui, T., Shaobin, P., Hui, C., Meizhi, Z. (2015): *Neofusicoccum parvum* causing canker of seedlings of *Juglans regia* in China. *Journal of Forestry Research*, 26: 1019,6.
- Zhou, Y. P., Dou, Z. P., He, W., Zhang, X. D., Zhang, Y. (2016): *Botryosphaeria sinensia* sp. nov., a new species from China. *Phytotaxa*, 245: 043-050.
- Zlatković, M. P. (2016): Botryosphaeriaceae kompleks na različitim vrstama drveća u Srbiji. Doktorska disertacija, Šumarski fakultet, Beograd.

- Živković, S., Stojanović, S., Gavrilović, V., Ivanović, Ž., Balaž, J. (2008a): Antraknoza ploda kruške. XIII Kongres voćara i vinogradara Srbije sa međunarodnim učešćem, Novi Sad 27-30.10.2008. Knjiga abstrakta: 148.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Balaž, J. (2008b): *Colletotrichum acutatum* – prouzrokovatelj antraknoze paradajza. IX Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24-28.11.2008. Zbornik rezimea, 85-86.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Balaž, J. (2009): Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum* species from pear. IV Congress of the Serbian Genetic Society, Tara, June 1-5, 2009, Book of Abstracts, 251.
- Živković, S., Gavrilović, V., Oro, V., Dolovac-Pfaf, E., Stošić, S., Kuzmanović, S., Ivanović, Ž. (2012b): Identifikacija *Colletotrichum acutatum* sa ploda nektarine. *Zaštita bilja*, 63: 130-138.

BIOGRAFIJA

Miloš Stevanović rođen je 29.08.1984. godine u Kragujevcu, Republika Srbija. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, završio je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,50 (devet 50/100). Diplomski rad pod nazivom: „Efikasnost preparata Affirm 095SG (Emamektin) u suzbijanju *Cydia pomonella*“ odbranio je sa ocenom 10 (deset). Dobitnik je nagrade Zadužbine Nikole Spasića za najboljeg diplomiranog studenta Poljoprivrednog fakulteta u 2008. godini.

Doktorske akademske studije upisao je školske 2009/10. godine, na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 2010. godine kao stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije angažovan je u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, na projektima „Optimizacija primene hemijskih sredstava u zaštiti bilja povećanjem efikasnosti dijagnostičkih metoda i procene rizika pojave bolesti, štetočina i korova“ – TR 20051 i „Razrada integrisanog upravljanja i primene savremenih principa suzbijanja štetnih organizama u zaštiti bilja“ – TR 31018. Od 01.03.2012. godine zaposlen je u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odsek za bolesti bilja.

Do sada je objavio i saopštio ukupno 35 naučnih radova.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora _____ Miloš Stevanović _____

Broj indeksa _____ FM 160051 _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

_____ Identifikacija i karakterizacija fitopatogenih gljiva _____
_____ prouzrokovača bolesti stabla kupine u Srbiji _____

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Miloš Stevanović

Broj indeksa FM 160051

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Identifikacija i karakterizacija fitopatogenih gljiva prouzrokovaca bolesti stabla kupine u Srbiji

Mentor dr Aleksandra Bulajić, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

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

Identifikacija i karakterizacija fitopatogenih gljiva

prouzrokovala bolesti stabla kupine u Srbiji

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____
