

Универзитет у Београду
Шумарски факултет

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Извештај Комисије о оцени израђене докторске дисертације дипл.инж.

Милице Златковић

На основу Члана 154. Статута Универзитета у Београду Шумарског факултета, поднетог рукописа израђене докторске дисертације, дипл. инж. Милице Златковић, истраживача сарадника на Шумарском факултету Универзитета у Београду, под насловом „*Botryosphaeriaceae* комплекс на различитим врстама дрвећа у Србији “ и одлуке Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Шумарског факултета (број одлуке 01-2/86 од 27.04.2016. године) као чланови Комисије, Наставно-научном већу Шумарског факултета Универзитета у Београду подносимо следећи **Извештај**.

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

1. Орган који је именовao (изабрао) комисију и датум:

Одлуком Наставно-научног већа Шумарског факултета у Београду, број одлуке 01-2/86, од 27.04.2016. године, образована је Комисија за оцену израђене докторске дисертације кандидата дипл.инж. Милице Златковић.

2. Састав комисије:

1. др **Ненад Кеча**, ванредни професор
Универзитет у Београду – Шумарски факултет
2. Dr. **Bernard Slippers**, full professor
University of Pretoria- FABI, Pretoria, South Africa
3. др **Весна Голубовић Ђургуз**, доцент
Универзитет у Београду – Шумарски факултет

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Милица, Петар, Златковић
2. 22. марта 1982., Пирот, Република Србија
3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе/мастер рада: –
4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука/мастера: –

[На основу члана 86. став 2., члана 99. став 6. и члана 100. став 7. Статута Универзитета у Београду и члана 51., члана 92. став 2. и члана 154., Статута Универзитета у Београду - Шумарског факултета, Наставно-научно веће Факултета, на седници одржаној 17.01.2008. године, усвојило је Правилник о докторским студијама на основу члана 4., докторске студије може уписати лице које је завршило основне студије и стекло звање дипломираног инжењера (VII-1 степен) према прописима који су важили до ступања на снагу Закона о високом образовању (Сл. гласник РС 76/05), са најмање просечном оценом 8 (осам) и познавањем најмање једног светског језика у мери да се може користити страном литературом.]

III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

„*Botryosphaeriaceae* комплекс на различитим врстама дрвећа у Србији“

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација под насловом: „*Botryosphaeriaceae* комплекс на различитим врстама дрвећа у Србији“ обухвата 203 страна, од чега 171 страна текста и 32 страна прилога. Рад има девет (9) поглавља и литературу, 23 табеле и 35 графика (Фигуре). Прилози се састоје од осам табела. Списак релевантне стране и домаће литературе, везане за област истраживања обухвата 267 библиографских јединица. На почетку рада су дате информације о ментору, коментору и члановима комисије, резиме, основни подаци о докторској дисертацији на српском и енглеском језику и кључне речи. Поглавља су структурирана тако да представљају посебне и логички повезане целине:

1. Општи увод: 1-11. стр.
 2. Општи циљеви истраживања: 13. стр.
 3. *Botryosphaeriaceae* на болесном дрвећу у урбаним срединама Западног Балкана: 15-47. стр.
 4. Нови и неочекивани домаћини гљиве *Diplodia sapinea* на подручју Западног Балкана: 48-71. стр.
 5. Први налаз гљиве *Neofusicoccum parvum* узročника рупичавости лишћа ловорвишње (*Prunus laurocerasus* L.) у Србији: 72-75. стр.
 6. Нови домаћини ко-инфицирајућих *Botryosphaeriaceae* на украсном и шумском дрвећу на подручју Западног Балкана: 76-117 стр.
 7. Генетичка униформност карактеристике инвазивно ширење гљива *Neofusicoccum parvum* и *Diplodia sapinea* на подручју Западног Балкана: 118-143 стр.
 8. Генерални закључци: 144-145. стр.
 9. Литература: 146-170. стр.
- Прилози 171-203. стр.

Иза поглавља које се односи на табеларне прилоге, дате су потребне изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и дигиталне верзије рада, као и овлашћење о начину коришћења.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. ОПШТИ УВОД: 1-11

У уводном делу кандидат указује на значај врста рода *Botryosphaeriaceae*, представља њихове главне таксономске, филогенетске и разматра специфичности идентификације за поједине врсте. Кандидат је поделио ово поглавље на три дела, од којих се прво односи на таксономију, филогентику и идентификацију представника родова и фамилије. У овом поглављу дате су карактеристике сексуалних и асексуалних облика, као и методи молекуларне идентификације.

Друго потпоглавље приказује *Botryosphaeriaceae* као ендофите и патогене дрвећа наводећи њихову инфекциону биологију, симптоме обољења,

епидемиологију, као и најважније биљке домаћине. Кандидат разматра и могућности контроле представника рода и фамилије *Botryosphaeriaceae*.

Треће потпоглавље даје преглед инвазивности гљива из проучаваног *Botryosphaeriaceae* комплекса и разматра популациону биологију врста које се могу окарактерисати као инвазивне.

2. ОПШТИ ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА (12-13)

Кандидат износи проблематику гљива из рода *Botryosphaeria* као патогена шумског и дрвећа у урбаним срединама и поставља себи следеће циљеве:

1. утврдити врсте из фамилије *Botryosphaeriaceae* које су изоловане из стабала са различитим симптомима (суховрхост, рак ране, изливи смоле и др.). За идентификацију су коришћена четири региона ДНК и то ITS и LSU региони рибозомалне ДНК, а затим још и Tef 1- α и β -tubulin 2 (BT2) гени.
2. утврдити спектар домаћина и дистрибуцију *Botryosphaeriaceae* врста на подручју Србије и Западног Балкана. Такође, током истраживања утврђено је преклапање *Botryosphaeriaceae* врста на различитим голосеменицама и скривеносеменицама у Континенталном и Медитеранском региону.
3. утврдити путеве уношења и ширења *Neofusicoccum parvum* и *Diplodia sapinea* у Србији. Циљ овог дела истраживања био је да се утврди генетички диверзитет и диференцијација између различитих популација ова два патогена. Такође, су разматрани односи између изолата из Континенталног и Медитеранског региона, као и оних из урбаних средина, шумских плантажа и састојина.

3. *BOTRYOSPHERIACEAE* НА БОЛЕСНОМ ДРВЕЋУ У УРБАНИМ СРЕДИНАМА ЗАПАДНОГ БАЛКАНА (15-47)

У овом поглављу кандидат наводи методе које је користио, резултате до којих је дошао и закључке које је донео после рада на сакупљању узорака, изолацији, молекулагој и морфолошкој идентификацији врста.

Узорци су сакупљани од фебруара 2009- децембра 2014. године у Србији, Црној Гори и Босни и Херцеговини. Сакупљено је 306 *Botryosphaeriaceae* –сличних изолата од којих 285 са украсног дрвећа и 14 из шумских састојина.

Идентификација изолата урађена је на 4 региона: ITS, прајмерима ITS1 и ITS4 (White et al. 1990); Tef 1- α прајмерима EF1-728F и EF1-986R (Carbone & Kohn 1999) β -tubulin гена са прајмерима Bt2a и Bt2b (Glass & Donalds 1995) и дела LSU помоћу LR0 и LR5 (Vilgalys & Hester 1990). PCR производи су раздвојени на 1,5% агарозном гелу и визуализовани под UV светлом.

Поравнавање секвенци и филогенетске анализе урађене су одговарајућим софтвером. Прегледање секвенци обављено је помоћу CLC Main Workbench 6.6.1, а затим су оне упоређене са осталим секвенцама *Botryosphaeriaceae* фамилије депонованим у GenBank-у помоћу BLAST метода. Поравнавање секвенци је урађено „online“ помоћу MAFFT ver. 7, а провера је извршена у MEGA ver.6. Филогенетске анализе урађене су помоћу Jmodeltest ver 0.1 за метод максималне вероватноће (Maximum likelihood) и помоћу RAUP ver. 4.0b10 код метода максималне штедљивости (Maximum parsimony). Филогенетска стабла су

визуализована у програму MEGA ver. 6. Стабла добијена током анализе су депонована у TreeBase под бројем S18025.

Истраживање морфолошких карактеристика идентификованих изолата на микроскопском нивоу урађено је помоћу Carl Zeiss светлосног микроскопа опремљеног са HRC Axiosam и Axiovision 3.1 softverom за обраду слика.

Пораст изолата/врста проучаван је у распону од 5-40°C у интервалима од по 5°C.

Статистичке анализе обављене су помоћу софтвера Statistica ver 8.0 и IBM-овог SPSS ver. 20.

Резултати: Током истраживања идентификовано је 8 раније познатих врста укључујући: *Dothiorella sarmentorum*, *Neofusicoccum parvum*, *Bothriosphaeria dothidea*, *Phaeobotryon cupressi*, *Sphaeropsis visci*, *Diplodia seriata*, *D. sapinea*, *D. mutila* и две врсте које нису могле бити идентификоване, а припадају роду *Dothiorella*.

Филогенетске анализе показале су да постоји 6 главних и веома подржаних грана/„clade“—ова од којих сваки представља један од наведених родова, а високе вредности боотстрапа (98-100) показују јасну подршку за издвајање појединих врста.

У делу морфолошке карактеристике детаљно су описане све примећене структуре за 8 идентификованих врста. Дате су димензије и описана плодносна тела, конидиофори, конидије, сперматогене ћелије, спемације, хламидоспоре и др. Наведено је да ли су пронађени сексуални облици и домаћини на којима је врста регистрована током ових истраживања. Описан је и изглед колонија свих врста, а дате су и кардиналне и оптимална температура пораста за сваку од врста.

За врсте које нису могле бити идентификоване као једна од до сада познатих, а таква је *Dothiorella* sp. 1 дат је опис и приложене су секвенце (у Gen Bank - NCBI), како би се у будућности тестирани изолати могли евентуално приписати некој врсти или описати као засебна врста. Сексуални стадијум код ових изолата није уочен. За *Dothiorella* sp. 2 кандидат наводи како због стерилности изолата није могла бити детаљно описана, али да молекуларне идентификације указују да се ради о новој врсти које проучавају Abdollahzadeh и сар. (2014).

Идентификоване *Botryosphaeriaceae* врсте су расле у интервалу од 5-40°C, а оптималне температуре биле су између 20-25°C односно 30°C за *D. sapinea*. На наведеним температурама пораст је износио од 21 mm/dan за *N. parvum* до 2,3 mm/dan за *S. visci*.

Дискусијом је обухваћена најновија литература и истраживања других аутора која су упоређена са резултатима до којих је дошао кандидат.

На основу истраживања кандидат констатује да постоји велики диверзитет *Botryosphaeriaceae* врста у Србији и Западном Балкану и да оне због свог доприноса одумирању дрвећа у урбаним срединама и шумским екосистемима заслужују додатну пажњу нарочито у светлу будућих климатских промена.

4. НОВИ И НЕОЧЕКИАНИ ДОМАЋИНИ ГЉИВЕ *DIPLODIA SAPINEA* НА ПОДРУЧЈУ ЗАПАДНОГ БАЛКАНА (48-71)

Циљ овог поглавља је био да се утврди спектар домаћина гљиве *Diplodia sapinea* у

Србији и додатно на простору Западног Балкана. Кандидат је узорке сакупљао у периоду 2009-2014. на простору Србије и Црне Горе, али и у плантажама *Pinus radiata* на подручју северне Грчке.

Молекуларне анализе урађене су помоћу ITS региона рибозомалне ДНК (прајмери ITS 1 и ITS4) и TEF 1 α гена (прајмерских парова EF1-728F и EF1-986R и EF-1F и EF2-R). Филогенетске анализе урађене су помоћу метода Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) и Bayesian анализе (BI). Филогенетска стабла су визуализована помоћу MEGA 6 софтвера. Све секвенце добијене у овим истраживањима депоноване су у NCBI банку гена.

Тестови инокулације рађени током вегетација 2014. и 2015. године у расаднику Шумарског факултета-Универзитета у Београду. Инокулисани су следећи домаћини: *Cedrus atlantica*, *C. deodara*, *Picea pungens*, *P. omorika*, *Abies concolor*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus nigra*, *P. sylvestris*, *Juniperus horizontalis*, *Chamaecyparis lawsoniana*, *Picea abies*, *Thuja occidentalis* и *Prunus laurocerasus*. Инокулисане саднице биле су старости 2 или 3 године, а коришћено је 5 изолата са различитих домаћина. Додатно су урађене инокулације избојака на 30-40 cm дугим избојцима букве (*Fagus sylvatica*) са четири изолата пореклом из *C. atlantica*, *P. nigra*, *P. sylvestris* и *F. sylvatica*. Након три недеље избојци су сечени вертикално и мерена је дужина дисколорованог ткива.

У стакленику у FABI –ју извршена је инокулација на *Eucalyptus grandis* (3 године старости) и 5 година старим стаблима *Pinus patula* са два изолата *D. sapinea*. Након 6 недеља извршено је мерење дужине некроза и реизолација гљиве.

Статистичке анализе урађене су помоћу Studentovog t-теста, ANOVA, Kruskal-Wallis непараметријског теста и теста Најмање значајних разлика (LSD).

У анализи је учествовало 82 изолата са 16 домаћина (15 четинара и 1 лишћар), од чега 42 са *C. atlantica*, 10 са црног бора, 9 са белог бора, 4 изолата из бодљиве смрче, 3 излата из дуглазије и са по једним или два изолата из осталих 10 домаћина.

Филогенетске анализе показале су да сви добијени изолати припадају гљиви *D. sapinea*, као и да има 163 парсимони информативних карактера у секвенцама.

Изолати са *C. atlantica* могу инфицирати и убити саднице *Picea abies*, *P. pungens*, *P. omorika*, *Abies concolor* и *Pseudotsuga menziesii*. Примећени су симптоми увенућа и жутила почевши од прве недеље – *P. morika*, затим друге недеље након инокулације (прво *A. concolor*) и даље 3 и 4 недеље код нешто отпорнијих врста (смрча и дуглазија).

Прве мртве саднице кандидат је констатовао након 4 недеље код *P. omorika*, *P. abies*, *P. menziesii*, док контролне биљке нису показивале знаке болести. Подручје испод криве напретка болести (AUDPC) било је статистички значајно веће у случају *P. pungens*, док није било значајних разлика за AUDPC вредности између *D. sapinea* инокулисаних у друге домаћине ($p < 0,05$). Изолати из *C. atlantica* могу инфицирати *J. horizontalis*, а дужине некроза износиле су 1-2,3 cm.

Изолати пореклом из *C. atlantica*, *P. nigra* и *P. sylvestris* могу инфицирати саднице белог и црног бора. Први симптоми јављају се 3-4 недеље након инокулације, а пропадање садница се јавља након 5 недеља. Насупрот наведеном, изолати из кедра нису могли остварити инфекције на *T. occidentalis*, *C. lawsoniana*,

C. atlantica, *C. deodara* и *P. laurocerasus*.

Инокулације избојака букве произвеле су некрозе, тамно браон боје, димензија од 0,9-1,3 cm.

Инокулације у стакленику су привеле некрозе на садницама *P. patula* и *E. grandis*. Некрозе на *P. patula* биле су знатно веће него на еукалиптусу, а констатована је и статистички значајна разлика у патогености између појединих изолата.

Тестови патогености показали су да *D. sapinea* може да изазове болест на врстама из родова *Picea* и *Abies*, као и да је јако агресивна према оморици.

D. sapinea је по први пут изолована из букве, тј. из некротираних ткива једне лишћарске врсте. До сада је ова гљива била позната као ендофит и патоген изкључиво четинара. Тестови патогености на избојцима су показали да *D. sapinea* не производи карактеристичне симптоме на букви (*F. sylvatica*).

Реципрочне инокулације на већем броју домаћина показале су да *D. sapinea* није селективна према домаћинима, али није се могло закључити ни тзв. генералиста. Кандидат на крају наводи да неки други фактори, као што су климатски екстреми, стрес, итд., могу утицати на подложност домаћина инфекцији гљивом *D. sapinea*.

5. ПРВИ НАЛАЗ ГЉИВЕ *NEOFUSICOCUM PARVUM* УЗРОЧНИКА РУПИЧАВОСТИ ЛИШЋА ЛОВОРВИШЊЕ (*PRUNUS LAUROCERASUS*L.) У СРБИЈИ (72-75)

У овом поглављу кандидат наводи резултате истраживања појаве рупичавости лишћа на *Prunus laurocerasus* у Србији. Током вегетација 2010-2014. године примећена је појава рупичавости лишћа на више од 30 жбунова ловор вишње на 7 локалитета у Србији.

Симптоматични листови сакупљени су и извршена је изолација гљиве. Након излације ДНК умножени су ITS регион, Tef 1- α ген, β -tubulin ген и део велике подјединице РНК полимеразе II гена (RPB2). Секвенце добијене за умножене регионе депоноване су у NCBI банци гена и коришћене су у филогенетским анализама (Maximum Parsimony и Maximum Likelihood).

Тестови патогености кандидат је обавио са два изолата у по два понављања на 10 биљака. На листовима је направљена мала рана и мицелијским исечком урађена инфекција.

Контролисани изолати идентификовани су примењеним молекуларним и филогенетским методама као *Neofusicoccum parvum*.

Кандидат је тестовима инокулације показао да се на свим инокулисаним биљкама јављају некрозе сличне оним из којих је *N. parvum* изолован. Две недеље након инокулације, формиран су пикниди унутар некроза, а три недеље након инокулације некрозе су се сасушиле и испале, остављајући карактеристични симптом рупичавости лишћа.

Кандидат у дискусији наводи да *N. parvum* није редак у Србији, као и да је он генералист који је изолован са различитих врста. Током израде ове тезе *N. parvum* је констатован на *Chamaecyparis lawsoniana* и *Aesculus hippocastanum* у Србији, као и на *P. laurocerasus* у Црној Гори.

Пошто је *P. laurocerasus* реликт са ограниченом распрострањеношћу, кандидат наводи да је неопходно детаљније проучити ову појаву у шумским екосистемима где се домаћин јавља од природе.

6. НОВИ ДОМАЋИНИ КО-ИНФИЦИРАЈУЋИХ *BOTRYOSPHAERIACEAE* НА УКРАСНОМ И ШУМСКОМ ДРВЕЋУ НА ПОДРУЧЈУ ЗАПАДНОГ БАЛКАНА (76-117)

Кандидат је у овом поглављу поставио себи задатак да размотри спектар домаћина *Botryosphaeriaceae* врста на подручју Србије и Западног Балкана. Узорци су сакупљани са 219 стабала (40 врста), 15 жбунова (5 врста) и још три украсне врсте у периоду 2009-2014. година у 15 градова, три сеоска насеља, осам шумских састојина, три плантаже и два расадника у Србији, Црној Гори, Босни и Херцеговини и Грчкој. Укупно је анализирано 308 *Botryosphaeriaceae* сличних изолата. Сакупљени узорци најчешће су добијени из некроза и рак рана (45,4% узорака), затим из смолавих лезија и ткива (22%), док су знатно ређе изоловане из здравих ткива (1,3%), дисколорованог дрвета (4,9%) и прелазних делова здравог и некротичног ткива (5,2%).

Идентификације изолата је обављена молекуларним методама употребом четири региона: ITS регион, Tef 1- α ген, β -tubulin ген и део РНК полимеразе II гена (RPB2).

Кандидат наводи да су идентификоване следеће врсте: *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella sermentorum*, *Dothiorella* sp. 2 и *N. parvum*, а из претходних истраживања (Поглавља 3, 4) укључене су *Dothiorella* sp. 1, *S. visci*, *P. cupressi* и *D. sapinea*.

Примењене филогенетске анализе и добијена стабла MP и ML методама јасно су издвојиле различите врсте у засебне гране („clade“) у 99-100% тестираних стабала.

Најчешће изолована врста била је *B. dothidea* (32,1%), затим следе *D. sapinea* (28,2%) и *N. parvum* (18,2%). Остале врсте биле су заступљене у интервалу од 0,3-1,9%. Неке врсте кандидат је изоловао само из једног домаћина, нпр. *P. cupressi*, *S. visci* и *Dothiorella* sp. 1, док су се друге јављале на више домаћина. Највећи диверзитет *Botryosphaeriaceae* по Shannon Weiner индексу показала је *Thuja occidentalis*, затим *T. plicata*, док је на осталих 27 домаћина констатована по 1 врста из фамилије *Botryosphaeriaceae*. Истовремено није било разлика у погледу диверзитета *Botryosphaeriaceae* изолованих са голосеменица и скривеносеменица. Такође, кандидат није пронашао разлике између диверзитета *Botryosphaeriaceae* врста Континенталног и Медитеранског региона. На једном домаћину констатован је у највећем броју случајева већи број *Botryosphaeriaceae* врста, а број се кретао од 2-5 врста из истог или различитих родова.

У мега тесту патогености који је изведен на 26 дрвенастих и жбунастих врста које се јављају у урбаним срединама, шумским екосистемима и културама извршене су инфекције са 10 различитих врста из *Botryosphaeriaceae* комплекса. Највећи број инфекција на 12 различитих домаћина остварила је *B. dothidea*. Она је изазвала болест на врстама из родова *Chamaecyparis*, *Sequoiadendron*, *Abies*, *Juniperus*, *Cupressus*, *Liriodendron*, *Magnolia*, *Aesculus*, *Pinus*, *Picea* и *Eucalyptus*.

Следећа по броју домаћина била је *Neofusicoccum parvum* са 10 домаћина, затим следе *D. sapinea* са 9 домаћина, *D. seriata* са 4, док преосталих 6 врста инфицирају 2 или по једног од испитиваних домаћина. Тестиране *Botryosphaeriaceae* врсте показале су различиту патогеност на биљкама, а требало им је од 6 (*P. omorika*, *C. sempervirens*), 13 (*Sequoiadendron giganteum*), 17 (*Thuja occidentalis*) до 20 (*Abies concolor*) недеља да убију 100% испитиваних биљака.

Након спроведених истраживања кандидат закључује да је диверзитет *Botryosphaeriaceae* врста на подручју Западног Балкана велик, осим на неким од испитиваних одмаћина, као на пример *Viscum album*-имели. Исто тако неке од *Botryosphaeriaceae* врста јављају се преодминантно на одређеним домаћинима, што наводи да ове врсте имају неке повољне карактеристике за развој ових патогена, али да постоји и утицај других фактора који у одређеним нишама делују на структуру заједница *Botryosphaeriaceae*. Чињеница да *Botryosphaeriaceae* могу да реципрочно инфицирају таксономски далеке домаћине и убију их истиче потребу за бољим познавањем њихове екологије и патогености појединих врста или чак популација.

7. ГЕНЕТИЧКА УНИФОРМНОСТ КАРАКТЕРИШЕ ИНВАЗИВНО ШИРЕЊЕ ГЉИВА *NEOFUSICOCCUM PARVUM* И *DIPLODIA SAPINEA* НА ПОДРУЧЈУ ЗАПАДНОГ БАЛКАНА (118-143)

У уводном делу кандидат износи хиптезу да су две гљиве *N. parvum* и *D. sapinea* одговорне за појаву пропадања стабала различитих врста на простору Србије и Западног Балкана. Међутим, он поставља себи за циљ да утврди генетички диверзитет и диференцијацију различитих популација наведених врста. Као део истраживања утврђује се веза између изолата добијених из Континенталног (Србија) и Медитеранског региона (Црна Гора).

Материјал је сакупљан у периоду 2009-2014, како је то описано у Поглављу 3. Идентификација врста извршена је помоћу секвенци четири региона ДНК (ITS, Tef-1- α , β -tubulina и RNK polimeraze II гена (PRB2)). Пет флуоресцентних парова прајмера је амплификовало изолате *N. parvum* (Slippers et al. 2014), док је 10 микросателитских локуса гљиве *D. sapinea* амплифицирано користећи прајмере дизајниране од Burgess et al. (2001) и Bihon et al. (2011). За сваку популацију одређен је број алела, број јединствених алела, број мултилокусних генотипова (MLG), као и проценат полиморфних локуса (P). Генетички диверзитет процењен је израчунавањем Nei диверзитета гена (Hnb). Диверзитет популације је одређен Shannon-овим индексом диверзитета (H). Израчунати су још и Simpson-ов (D), Genotipski (G), Максимални генотипски диверзитет (\hat{G}) и Генотипска једнакост (E_5).

Хаплоидне мреже урађене су за секвенце 56 изолата *N. parvum* (регионе ITS, Tef-1- α , β -tubulina и PRB2), као и за 87 изолата *D. sapinea* за ITS регион и Tef-1- α ген. Хаплотипови су одређени из поравнатог сета података у програму DnaSP 5.10.1, а затим су спојени са јединственим хаплотиповима *N. parvum* и *D. sapinea* из NCBI банке гена, тако да се покрије велики део географског ареала врсте. Везе између хаплотипова сваког региона појединачно и за комбиновани сет података добијене су у програму NETWORK 4.6.1.2.

Кандидат је констатовао да је свих 5 микросателитских локуса мономорфно

за *N. parvum* популацију из Континенталног, док су 3 локуса полиморфна за Медитеранску популацију. Цео сет изолата *N. parvum* имао је 11 алела од којих је 5 детектовано за континенталне и свих 11 за медитеранске популације. Мали генетички диверзитет констатован је за све изолате *N. parvum* ($H_{nb}=0,083$), док је континентална популација била потпуно клонална.

Генетички диверзитет *D. sapinea* је био нешто другачији. Два локуса у медитеранској популацији била су полиморфна, а 3 локуса су били полиморфни у преосталим популацијама. За цео сет изолата (85) констатовано је 23 алела, од чега је 16 детектовано у континенталним, затим *Cedrus* spp. и целом сету популација. Петност алела идентификовано је у популацијама *Pinus* врста, а 12 у Медитеранским популацијама. Кандидат закључује да је генетички диверзитет исто веома низак за *D. sapinea* ($H_{nb}=0,081$). Генетички диверзитет је нешто мањи код континенталних у односу на медитеранске, као и код популација са борова у односу на популације са кедрова.

Конструирајући хапloidне мреже кандидат је констатовао 5 мултилокусних генотипова у популацијама *N. parvum*. Најчешћи је био хаплотип H1, тј. био је присутан у 52 од 56 изолата. H1 је такође био једини хаплотип детектован у континенталном региону, док је свих 5 хаплотипова нађено у медитеранском региону. Три од пет хаплотипова из медитеранског региона било је одвојено једном тачкастом мутацијом. H1 је дељен између највећег броја домаћина у оба региона, док су 4 остала хаплотипа нађена на по једном домаћину.

Пет мултилокусних генотипова констатовано је и у популацији *D. sapinea*. Између ових пет хаплотипова 3 је констатовано у Медитеранском, а 4 у континенталном региону. H1 је био најчешћи и нађен је код 76 од 87 изолата, истовремено овај хаплотип је дељен између највећег броја домаћина, 14 од 16.

Хапloidне мреже *N. parvum* имале су облик звезде са 1-3 диманантна хаплотипа и више, мање честих, хаплотипова са више кратких грана и једном дужом граном. Ни за *D. sapinea* није било уочљиве географске структуре хаплотипова. Хапloidне мреже *D. sapinea* имале су облик звезде са бројним рођачким хаплотиповима, који су у вези са једним доминантним хаплотипом.

На основу својих резултата кандидат потврђује раније изнете теорије да трговина садницама украсних биљака може бити значајан извор ширења *Botryosphaeriaceae* врста. Повећана размена егзота, посебно великих стабала, нарочито четинара и повећање увоза након Евроатланских интеграција Србије, омогућиле су размену велике количине садног материјала, али и, како то кандидат каже, латентних патогена из *Botryosphaeriaceae* фамилије. Мултилокусне анализе секвенци и микросателитских маркера показале су да су ове гљиве интродуковане и да се прилично успешно шире на простору Србије, али и Западног Балкана.

Коначно кандидат наводи да је неопходно повећати мере опреза током међународне трговине украсним биљем, што је у складу са „Montesclaros declaration“ декларацијом и тежњама научне јавности да се ограничи трговина садним материјалом.

8. ГЕНЕРАЛНИ ЗАКЉУЧЦИ (144-145)

У овом поглављу кандидат таксативно наводи најважније закључке до којих је дошао током истраживања.

Истраживањем је показано да *Botryosphaeriaceae* комплекс у Србији садржи бар 10 врста, које су изоловане из 42 врсте дрвећа и 5 жбунастих врста у урбаним срединама, шумама и културама, као и расадницима. Највећи број изолата добијен је за три врсте и то: *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia sapinea* и *Neofusicoccum parvum*. По први пут су на простору Србије регистроване *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Dothiorella sarmentorum*, *Phaeobotryon cupressi*.

Даље кандидат наводи да *Botryosphaeriaceae* врсте могу да производе велики број симптома, али и убију тест биљке (старости 2 или 3 године) *Sequoiadendron giganteum*, *Thuja occidentalis*, *Abies concolor*, *Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus sylvestris*, *P. nigra*, *Cupressus sempervirens* и *Quercus robur*. Велики број тестираних врста (26) омогућио је да кандидат донесе закључак да су *Botryosphaeriaceae* генералисти, који могу да оствре инфекцију и убију велики број домаћина. Реципрочне инокулације *D. sapinea* показале су да она није специфични патоген и изазива болест и на врстама из којих није изолована, али да је ипак најагресивнија према врстама из фамилије *Pinaceae*.

Резултати ове тезе показују да су диверзитет, дистрибуција и ко-инфективност *Botryosphaeriaceae* врста условљене домаћином и условима средине. Мали генетички диверзитет и доминација *Neofusicoccum parvum* и *Diplodia sapinea* на алохтоним врстама наговештава да су ове врсте унете у Србију. *N. parvum* популације су највероватније настале недавном колонизацијом из непознате популације, док су *D. sapinea* популације настале ранијом колонизацијом индивидуама из Централне Европе или Северне Америке. Постоји добра потпора да је патоген највероватније прешао са асимптоматичних стабала *C. atlantica*, на аутохтони *P. nigra* након уношења од стране човека.

Истраживања кандидата су на молекуларном, еколошком и тестовима патогености показала да трговина садницама украсног материјала представља велику опасност за уношење *Botryosphaeriaceae*, али и многих других врста патогена у неку земљу.

9. ЛИТЕРАТУРА (146-170)

Наведено поглавље садржи 267 библиографских јединица. Коришћена литература је мултидисциплинарна, правилно одабрана како за теоријску основу ове докторске дисертације, тако и за поређење са резултатима истраживања сличне тематике. Увидом у коришћену литературу може се закључити да кандидат поседује шире познавање области, као и да је свеобухватно проучио проблематику истраживања.

ПРИЛОЗИ (171-203)

У оквиру овог поглавља кандидат приказује табеларне прилоге који су усклађени са структуром претходно наведених поглавља.

VI ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Комисија констатује да је Милица Златковић, дипл. инж., у потпуности испунио план предвиђен пријавом докторске дисертације. Добијени резултати истраживања

су систематично и прегледно приказани, а дискусија заснована на добром познавању проучаване научне области и на најновијим научним сазнањима приказаним у референтним радовима и књигама. Закључци прате структуру истраживања и прецизно и исправно су формулисани. Имајући у виду да се као услов за одбрану докторске дисертације поставља објављен рад у часопису међународног значаја, комисија констатује да је кандидат први аутор једног рада у часопису категорије М23.

Zlatković, M., Keča, N., Wiengfield, M., Fahimeh, J., Slippers, B., 2016. *Botryosphaeriaceae* associated with the die-back of ornamental trees in the Western Balkans. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 109(4):543-64, DOI 10.1007/s10482-016-0659-8.

VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Имајући у виду одабрани предмет истраживања, као и постављене циљеве од којих се у истраживању пошло, комисија сматра да је кандидат резултате базирао на добро утемељеној теоријској основи, до њих дошао квалитетном применом одговарајућих и предходно добро описаних метода, везаних за изолацију, морфолошку и молекуларну идентификацију, еколошке карактеристике и патогеност врста из фамилије *Botryosphaeriuaceae*, доказујући или оповргавајући дефинисане хипотезе и успешно остварујући постављене циљеве истраживања. Комисија констатује да су резултати истраживања јасно и прегледно изложени, методолошки исправно анализирани и тумачени и илустровани релевантним табеларним, сликовним и илустративним приказима.

VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Комисија констатује да је докторска дисертација дипл. инж. Милице Златковић написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме за коју је, одлуком бр. 61206-1109/2-14 од 18.03.2014. године, Веће Научних области Биотехничких наука Универзитета у Београду дало сагласност.

2. Комисија такође констатује да дисертација садржи све непходне елементе: насловну страну на српском и енглеском језику, информације о ментору и члановима комисије, кључну информациону документацију, резиме на српском и abstract на енглеском језику, садржај, текст рада по поглављима, списак литературе, прилоге, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјаву о коришћењу.

3. Докторска дисертација дипл. инж. Милице Златковић под насловом: „*Botryosphaeriuaceae* комплекс на различитим врстама дрвећа у Србији“ представља оригиналан допринос науци. Оригиналноост докторске дисертације огледа се, пре свега, у идентификовању истраживачког проблема, приступу и његовој обради, од сакупљања и идентификације врста фамилије *Botryosphaeriaceae* у природним и

вештачким екосистемима у којима до сада нису спровођена слична истраживања, затим у проучавању еколошких карактеристика врста и испитивању патогености добијених врста, при чему је кандидат дошао до потпуно оргиналних и нових научно заснованих резултата. Кандидат је у свом раду знатно проширио постојећа знања о диверзитету представника *Botryosphaeriaceae* комплекса, по први пут је забележио 4 врста на простору Србије и утврдио патогеност у огледима са вештачким инфекцијама. Такође је доказао клоналност појединих популација и дао поставке о начину уношена и ширења појединих представника овог комплекса. Проширио је спектар познатих домаћина и доказао могућност остваривања заразе и ток развоја болести, као и настанак симптома након инфекције. Добијени резултати представљају веома значајне информације о распрострањењу и домаћинима појединих врста из фамилије *Botryosphaeriaceae* у Србији и указују на неопходност посвећивања веће пажње улози ових организама у комплексу фактора пропадања стабала у урбаним и шумским екосистемима.

4. Комисија није уочила недостатке који би евентуално могли утицати на резултате истраживања у току израде докторске дисертације.

IX ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене докторске дисертације, комисија предлаже Наставно-научном већу Шумарског факултета – Универзитета у Београду, да докторску дисертацију кандидата дипл. инж. Милице Златковић под насловом „*Botryosphaeriaceae* комплекс на различитим врстама дрвећа у Србији“ прихвати за јавну одбрану. Предлаже се да комисија за јавну одбрану буде у истом саставу као и комисија која је ценила PhD тезу.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ:

ментор
др **Ненад Кеча**, ванр. проф.
Универзитет у Београду-Шумарски факултет

ментор
Dr. **Bernard Slippers**, full prof.
University of Pretoria, FABI, Pretoria, South
Africa

члан комисије
др **Весна Голубовић Ђургуз**, доцент
Универзитет у Београду-Шумарски факултет