



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Studijski program Agronomija

Mila Grahovac, dipl.ing-master

**Biološko suzbijanje *Colletotrichum* spp. parazita
uskladištenih plodova jabuke**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Jelica Balaž

Novi Sad, 2014. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Mila Grahovac
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. Dr Jelica Balaž, profesor u penziji
Naslov rada: NR	Biološko suzbijanje <i>Colletotrichum</i> spp. parazita uskladištenih plodova jabuke
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje:	AP Vojvodina

UGP	
Godina: GO	2014.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8
Fizički opis rada: FO	9 poglavlja /171 stranica / 54 tabele/ 10 grafikona / 36 slika / 226 referenci / 1 prilog
Naučna oblast: NO	Biotehničke nauke
Naučna disciplina: ND	Fitopatologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Plodovi jabuke, <i>Colletotrichum</i> spp., identifikacija, biološko suzbijanje, mikroorganizmi, optimizacija, etarska ulja
UDK	57.081:591.69:582.711.714
Čuva se: ČU	Biblioteci Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p><i>Colletotrichum</i> spp. su značajni prouzrokovajući bolesti biljaka u svetu i u našoj zemlji, u polju i u skladištu. Na plodovima jabuke prisutne su dve vrste ovog roda, <i>C. acutatum</i> i <i>C. gloeosporioides</i>. Pomenute vrste uzrokuju ekonomski značajne gubitke posle berbe plodova jabuke, tokom skladištenja, transporta i plasmana na tržište. Nedoumice sa kojima se naučna javnost suočava kada je u pitanju ovaj rod jeste precizno utvrđivanje sistematske pozicije i definisanje vrsta i nižih kategorija. Klasične fitopatološke metode ne omogućavaju preciznu</p>

identifikaciju do nivoa vrste. Otuda su molekularni pristupi sve zastupljeniji u identifikaciji *Colletotrichum* spp. U suzbijanju skladišnih patogena pretežno se primenjuju hemijski fungicidi. Zbog nepovoljnih toksikoloških svojstava i pojave rezistentnosti, primena hemijskih fungicida se sve više redukuje, a njihova upotreba posle berbe plodova zabranjena je u većini zemalja. Stoga, za održivi razvoj poljoprivredne proizvodnje neophodna su istraživanja usmerena ka otkrivanju mikroorganizama i prirodno sintetisanih materija koje imaju potencijala za primenu u biološkoj zaštiti.

Cilj ovog rada je da se utvrdi zastupljenost *Colletotrichum* spp. na uskladištenim plodovima jabuke u R. Srbiji, kao i pouzdanost klasičnih i molekularnih metoda za njihovu identifikaciju do nivoa vrste i nižih kategorija. Utvrđivanje filogenetske pozicije i genetičke udaljenosti izolata je takođe svrstano u ciljeve istraživanja. Nadalje, cilj je i da se izdvoje mikroorganizami i etarska ulja koja ispoljavaju antifungalno delovanje na *Colletotrichum* spp. Zatim, da se za mikroorganizam sa najizraženijim antifungalnim delovanjem definišu uslovi kultivacije (sastav hranljive podloge i trajanje) koji maksimizuju njegovu antifungalnu aktivnost i utvrdi način njegovog delovanja.

Utvrđeno je da su *Colletotrichum* spp. redovno prisutni na uskladištenim plodovima jabuke u Vojvodini i delovima zapadne, centralne i jugoistočne Srbije i da je njihova zastupljenost u odnosu na druge fitopatogene gljive 7,8-10%. Zbog osetljivosti *C. gloeosporioides* na niske temperature, *C. acutatum* postaje sve dominantnija vrsta ovog roda na uskladištenim plodovima jabuke. Razlikovanje *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* je moguće na osnovu fenotipskih karakteristika kolonija (u slučaju hromogenih izolata *C. acutatum*), dužine konidija, rasta kolonija na 5 i 35°C i brzine rasta kolonija na različitim podlogama. Oblik i širina konidija i optimalna temperatura rasta su nedovoljno pouzdani kriterijumi za identifikaciju do nivoa vrste. PCR metodom uz primenu prajmera specifičnih za vrstu uspešno se identifikuju *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Primenom univerzalnih prajmera ITS1 i ITS4 amplifikuju se rDNK-ITS sekvence ovih izolata. Analizom sekvenci izrađuju se filogenetska stabla visoke stabilnosti i jasno razdvajaju *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, a u okviru *C. acutatum* se odvajaju nehromogeni i hromogeni izolati. *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* i *B. subtilis* sojevi N146, ST 1/III, Č13 i QST 713 ispoljavaju antifungalnu aktivnost na *Colletotrichum* spp. *in vitro* i *in vivo*. *S. hygroscopicus* obezbeđuje zaštitu plodova na nivou sa hemijskim fungicidima (trifloksistrobin, boskalid+piraklostrobin, pirimetanil+flukvinkonazol, kaptan). Kultivacijom *S. hygroscopicus* u podlozi sa 15,07 g/l glicerola, 5,28 g/l ekstrakta kvasca i 0,81 g/l fosfata, u

<p>trajanju 3-4 dana, postiže se maksimalno antifungalno delovanje na <i>Colletotrichum</i> spp. Antifungalno delovanje <i>S. hygroscopicus</i> zasnovano je na produkciji ekstracelularnih, termostabilnih metabolita. Dvomesečno skladištenje trtiranih plodova na $2\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ne slabi antifungalno delovanje <i>S. hygroscopicus</i>. Etarska ulja origana i timijana ispoljavaju snažno inhibitorno delovanje na <i>Colletotrichum</i> spp.</p>	
<p>Datum prihvatanja teme od strane NN veća:</p> <p>DP</p>	<p>Sednica Nastavno-naučnog veća održana 10.05.2013.</p>
<p>Datum odbrane:</p> <p>DO</p>	
<p>Članovi komisije:</p> <p>(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)</p> <p>KO</p>	<p>Predsednik: Prof. dr Stevan Maširević, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet</p> <p>Član, mentor: Prof. dr Jelica Balaž, profesor u penziji, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet</p> <p>Član: Prof. dr Dušanka Indić, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet</p> <p>Član: Prof. dr Zoran Keserović, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet</p> <p>Član: Prof. dr Jelena Dodić, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Mila Grahovac
Mentor: MN	Dr Jelica Balaž
Title: TI	Biological control of <i>Colletotrichum</i> spp. pathogens of stored apple fruits
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication:	Autonomous Province of Vojvodina

LP	
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad
Physical description: PD	9 chapters /171 pages / 54 tables/ 10 graphs / 36 images / 226 references / 1 appendix
Scientific field SF	Biotechnical sciences
Scientific discipline SD	Phytopathology
Subject, Key words SKW	Apple fruits, <i>Colletotrichum</i> spp., identification, biological control, microorganisms, optimization, essential oils
UC	57.081:591.69:582.711.714
Holding data: HD	Library of University of Novi Sad, Faculty of Agriculture
Note: N	None
Abstract: AB	<p><i>Colletotrichum</i> spp. are significant plant pathogens worldwide in field, as well as on stored fruits. Two species of this genera, <i>C. acutatum</i> and <i>C. gloeosporioides</i>, can occur on apple fruits. The species cause significant economic losses on apple fruits after harvest, during storage, transport and marketing. Scientific community faces confusion in defining precise systematic position of this genera, as well as in identification to the species level and lower categories. Conventional</p>

phytopathological methods do not provide precise identification to the species level. Thus, molecular approaches are taking the lead in *Colletotrichum* spp. identification. Post-harvest pathogens are mainly managed by chemical fungicides. Due to adverse toxicological properties and resistance occurrence, use of chemical fungicides is being reduced, and their application after harvest is prohibited in most countries. Therefore, studies regarding detection of microorganisms and naturally synthesized substances with a potential for application in biological control are necessary for sustainable development of agriculture.

The aim of this study was to determine frequency of *Colletotrichum* spp. on stored apple fruits in the Republic of Serbia as well as reliability of conventional and molecular methods in their identification to the species level and lower categories. Determination of phylogenetic position and molecular distance of the isolates were also set as investigation goals. The aim was also to determine microorganisms and essential oils with antifungal activity against *Colletotrichum* spp. Defining of cultivation conditions (nutrient medium composition and duration) for the microorganism with the most pronounced antifungal activity which maximize its activity and defining its mode of action were also set as goals.

It was found that *Colletotrichum* spp. are commonly present on stored apple fruits in Vojvodina Province and in western, central and southeastern parts of Serbia with a share of 7.8-10% among other phytopathogenic fungi. Due to susceptibility of *C. gloeosporioides* to low temperatures, *C. acutatum* is becoming dominant species of this genus on stored apple fruits. Discrimination between *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* is possible on the basis of phenotypic characteristics of colony (in the case of chromogenum isolates of *C. acutatum*), conidium length, colony growth at 5 and 35°C and colony growth rate on different media. Conidium shape and width and optimal growth temperature are insufficient criteria for identification to the species level. PCR method using species-specific primers is reliable for identification of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*. rDNK-ITS sequences of the isolates can be successfully amplified with universal primers, ITS1 and ITS4. Analyses of the sequences allow construction of highly stable phylogenetic trees with distinctively separated *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* clades, and also additional clades of non-chromogenum and chromogenum *C. acutatum* isolates. *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis* strains N146, ST 1/III, Č13 and QST

<p>713 exhibit antifungal activity against <i>Colletotrichum</i> spp. <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>. <i>S. hygroscopicus</i> ensures fruit protection at the same level as chemical fungicides (trifloxistrobin, boscalid+pyraclostrobine, pyrimethanil+flukvinconazol, captan). Cultivation of <i>S. hygroscopicus</i> in the medium with 15.07 g/l glycerol, 5.28 g/l yeast extract and 0.81 g/l phosphates, for 3-4 days, ensures maximal antifungal activity against <i>Colletotrichum</i> spp. Antifungal activity of <i>S. hygroscopicus</i> is based on production of extracellular, thermostable metabolites. Two-month storage of treated apple fruits at 2±0.5°C does not reduce antifungal activity of <i>S. hygroscopicus</i>. Oregano and thyme essential oils exhibit strong inhibitory effects on <i>Colletotrichum</i> spp.</p>	
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	<p>10th of May 2013</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: Prof. dr Stevan Maširević, full professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>member, mentor: Prof. dr Jelica Balaž, retired professor of University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>member: Prof. dr Dušanka Indić, full professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>member: Prof. dr Zoran Keserović, full professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>member: Prof. dr Jelena Dodić, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology</p>

*„Pre uspeha, bogovi odrediše da se čovek oznoji...“
Hesoid*

Beskrajno hvala svima koji su pomogli da ovaj rad bude uspešno priveden kraju.

Hvala mojim dragim kolegama i prijateljima, a najviše predivnoj porodici.

Moji roditelji, sestra, sinovi Andrej i Luka i suprug Peđa moja su večna snaga i radost.

Mila Grahovac

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. PREGLED LITERATURE	6
2.1. Glijive roda <i>Colletotrichum</i> na jabukama i njihov ekonomski značaj	6
2.2. Istorijat klasifikacije roda <i>Colletotrichum</i>	7
2.3. Filogenetsko mesto roda <i>Colletotrichum</i>	9
2.4. Najznačajnije kategorije roda <i>Colletotrichum</i>	11
2.4.1. Acutatum kategorija	11
2.4.2. Gloeosporioides kategorija	11
2.5. Simptomi antraknoze na plodovima jabuke	12
2.6. Epidemiologija <i>Colletotrichum</i> spp. na jabuci	13
2.7. Identifikacija <i>Colletotrichum</i> spp.	14
2.8. Suzbijanje <i>Colletotrichum</i> spp.	16
2.8.1. Primena bakterija iz roda <i>Streptomyces</i> u biološkoj zaštiti	20
2.8.2. Primena bakterija iz roda <i>Bacillus</i> u biološkoj zaštiti	21
2.8.3. Primena etarskih ulja u biološkoj zaštiti	22
2.8.4. Optimizacija proizvodnje agenasa za primenu u biološkoj zaštiti	23
3. ZADACI I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
4. RADNE HIPOTEZE	26
5. MATERIJAL I METODE	27
5.1. Prikupljanje uzoraka, izolacija patogena, izdvajanje monosporijalnih izolata	27
5.2. Provera patogenosti i formiranje kolekcije <i>Colletotrichum</i> spp.	30
5.2.1. Uticaj uslova skladištenja plodova jabuke na patogenost <i>Colletotrichum</i> spp.	31
5.3. Morfološke i fiziološke osobine izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	32
5.3.1. Morfologija vegetativnih organa <i>Colletotrichum</i> spp.	32
5.3.2. Morfologija konidija <i>Colletotrichum</i> spp.	32
5.3.3. Obrazovanje teleomorfnoog stadijuma <i>Colletotrichum</i> spp.	32
5.3.4. Uticaj hranljivih podloga na rast izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	33
5.3.5. Uticaj temperature i svetlosti na rast izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	33
5.4. Molekularna identifikacija izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	34
5.4.1. Izolacija DNK	34
5.4.2. Identifikacija primenom prajmera specifičnih za vrstu	34
5.4.3. Kloniranje sekvenci rDNK-ITS regiona	35
5.4.4. Filogenetska analiza	36
5.5. Biološka zaštita plodova jabuke od <i>Colletotrichum</i> spp.	37
5.5.1. Priprema mikroorganizama i radnih tečnosti fungicida za <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> oglede	38
5.5.2. <i>In vitro</i> ispitivanje aktivnosti mikroorganizama na izolate <i>Colletotrichum</i> spp.	41
5.5.3. <i>In vivo</i> ispitivanje aktivnosti mikroorganizama na izolate <i>Colletotrichum</i> spp.	42
5.5.4. Optimizacija uslova kultivacije <i>S. hygroscopicus</i> u cilju postizanja maksimalne antifungalne aktivnosti na <i>Colletotrichum</i> spp.	43
5.5.5. Uticaj niskih temperatura na aktivnost kultivacionih tečnosti mikroorganizama i formulisanih biopreparata na <i>Colletotrichum</i> spp. <i>in vivo</i>	47
5.5.6. Delovanje isparljive faze etarskih ulja na izolate <i>Colletotrichum</i> spp.	48
5.6. Statistička obrada podataka	49
6. REZULTATI	50
6.1. Simptomi antraknoze, izolacija patogena, izdvajanje monosporijalnih izolata	50
6.2. Patogenost izolata i formiranje kolekcije <i>Colletotrichum</i> spp.	53
6.2.1. Uticaj uslova skladištenja plodova jabuke na patogenost <i>Colletotrichum</i> spp.	58
6.3. Morfološke i fiziološke osobine izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	62
6.3.1. Morfologija vegetativnih organa	62
6.3.2. Morfologija konidija	68
6.3.3. Obrazovanje teleomorfnoog stadijuma	72
6.3.4. Uticaj hranljivih podloga na rast izolata	72
6.3.5. Uticaj temperature i svetlosti na rast izolata	77
6.4. Molekularna identifikacija izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	81
6.4.1. Identifikacija primenom prajmera specifičnih za vrstu	81

6.4.2.	Kloniranje sekvenci rDNK-ITS regiona	84
6.4.3.	Filogenetska analiza	84
6.5.	Biološka zaštita plodova jabuke od <i>Colletotrichum</i> spp.	87
6.5.1.	Antifungalno delovanje <i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> i <i>L. mesenteroides</i> na <i>C. acutatum</i> i <i>C. gloeosporioides in vitro</i>	87
6.5.2.	Antifungalno delovanje <i>B. subtilis</i> (sojevi N 146, ST 1/III, Č13 i QST 713) na <i>C. acutatum</i> i <i>C. gloeosporioides in vitro</i>	90
6.5.3.	Antifungalno delovanje <i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> i <i>P. aeruginosa</i> na <i>C. acutatum</i> i <i>C. gloeosporioides in vivo</i>	92
6.5.4.	Antifungalno delovanje <i>B. subtilis</i> (sojevi N 146, ST 1/III, Č13 i QST 713) na <i>C. acutatum</i> i <i>C. gloeosporioides in vivo</i>	95
6.5.5.	Optimizacija uslova kultivacije <i>S. hygroscopicus</i> u cilju ostvarenja maksimalne antifungalne aktivnosti na <i>Colletotrichum</i> spp.	98
6.5.6.	Uticaj niskih temperatura na aktivnost kultivacionih tečnosti mikroorganizama i formulisanih biopreparata na <i>Colletotrichum</i> spp. <i>in vivo</i>	114
6.5.7.	Aktivnost isparljive faze etarskih ulja na izolate <i>Colletotrichum</i> spp.	121
7.	DISKUSIJA	124
7.1.	Prikupljanje uzoraka, izolacija patogena, izdvajanje monosporijalnih izolata	124
7.2.	Patogenost izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	124
7.2.1.	Uticaj uslova skladištenja plodova jabuke na patogenost <i>Colletotrichum</i> spp.	125
7.3.	Morfološke i fiziološke osobine izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	127
7.3.1.	Morfologija vegetativnih organa	127
7.3.2.	Morfologija konidija	129
7.3.3.	Obrazovanje teleomorfno stadijuma	130
7.3.4.	Uticaj hranljivih podloga na rast izolata	132
7.3.5.	Uticaj temperature i svetlosti na rast izolata	132
7.4.	Molekularna identifikacija izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	133
7.4.1.	Identifikacija primenom prajmera specifičnih za vrstu	133
7.4.2.	Kloniranje sekvenci rDNK-ITS regiona	134
7.4.3.	Filogenetska analiza	134
7.5.	Biološka zaštita plodova jabuke od <i>Colletotrichum</i> spp.	136
7.5.1.	Antifungalno delovanje <i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> i <i>L. mesenteroides</i> na <i>C. acutatum</i> i <i>C. gloeosporioides in vitro</i>	136
7.5.2.	Antifungalno delovanje <i>B. subtilis</i> (sojevi N 146, ST 1/III, Č13 i QST 713) na <i>C. acutatum</i> i <i>C. gloeosporioides in vitro</i>	137
7.5.3.	Antifungalno delovanje <i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> i <i>P. aeruginosa</i> na <i>C. acutatum</i> i <i>C. gloeosporioides in vivo</i>	138
7.5.4.	Antifungalno delovanje <i>B. subtilis</i> (sojevi N 146, ST 1/III, Č13 i QST 713) na <i>C. acutatum</i> i <i>C. gloeosporioides in vivo</i>	139
7.5.5.	Optimizacija sastava hranjive podloge za kultivaciju <i>S. hygroscopicus</i>	140
7.5.6.	Utvrđivanje načina delovanja i optimizacija trajanja kultivacije	143
7.5.7.	Uticaj niskih temperatura na aktivnost kultivacionih tečnosti mikroorganizama i formulisanih biopreparata na <i>Colletotrichum</i> spp. <i>in vivo</i>	145
7.5.8.	Aktivnost isparljive faze etarskih ulja na izolate <i>Colletotrichum</i> spp.	147
8.	ZAKLJUČAK	149
9.	LITERATURA	151
10.	PRILOG	164

1. UVOD

Plodovi jabuke su tokom čitave godine prisutni u ishrani dece u razvoju i odraslih ljudi kako u svežem stanju, tako i u obliku prerađevina, te je kvalitet i zdravstvena bezbednost ovih namirnica od izuzetnog značaja za ljudsku populaciju.

Na kvalitet plodova jabuke pored tehnoloških postupaka koji se primenjuju do berbe, značajno utiču vreme i način berbe, tretmani za prevenciju neparazitarnih oboljenja, režim čuvanja plodova u hladnjači i nakon skladištenja, način sortiranja i pakovanja plodova (Gvozdenović i Davidović, 1990; Gvozdenović i Keserović, 2002). Pored navedenih izazova u očuvanju kvaliteta plodova posle berbe, fitopatogene gljive takođe značajno ugrožavaju kvalitet istih.

Gljive roda *Colletotrichum* i njihovi teleomorfni stadijumi *Glomerella* spp. predstavljaju značajne biljne patogene širom sveta, na jabuci i mnogim drugim biljnim vrstama. *Colletotrichum* spp. su prouzrokovaci karakterističnih oboljenja poznatih kao antraknoze. Prouzrokuju ekonomski značajne gubitke u umerenim, suptropskim i tropskim pojasevima na velikom broju vrsta žitarica, povrća, leguminoza i voća (Freeman i sar., 1998; Peres i sar., 2002; Lewis Ivey, 2004; Gregori i sar., 2010). Takođe su značajni prouzrokovaci bolesti biljaka i u našoj zemlji, kako u polju, tako i u skladištu (Ivanović i Ivanović, 1992, 2001; Trkulja 2000a, 2000b, 2003; Ivanović i sar., 2005; Grahovac i sar., 2010; Živković, 2011).

Od voćnih vrsta, kao domaćini *Colletotrichum* spp. navode se jabuka, kruška, breskva, višnja, badem, vinova loza, jagoda, borovnica, ribizla, dud, smokva, citrusi, banana, avokado, mango, kivi, guava i papaja (von Rapp i Richter, 1990; Johnson i Jones, 1997; Peres i sar., 2002; Trkulja, 2003; Wharton i Dieguez-Uribeondo, 2004; Agrios, 2005; Ivanović i sar., 2005; Živković i sar., 2010; Gregori i sar., 2010). Kao najznačajnije vrste koje se javljaju na voću navode se: *C. acutatum* J. H. Simmonds, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc., *C. fragariae* Brooks i *C. musae* (Berk. et M.A. Curtis) Arx. (Freeman i sar., 1998; Freeman i sar., 2002; Lewis Ivey i sar., 2004). Na teritoriji bivše Jugoslavije do 1995. godine registrovano je preko 19 vrsta ovog roda (Arsenijević i sar., 1996). U svetu i kod nas, primarni prouzrokovaci antraknoze jabučastog i koštičavog voća su vrste *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* (Arsenijević, 1984; Babović i sar., 1984; Ivanović i Ivanović, 1992; Stojanović i sar., 2002).

Iako *Colletotrichum* vrste inficiraju veliki broj biljnih vrsta pre berbe, ekonomski najznačajniji gubici se javljaju posle berbe plodova. Mnoge vrste izazivaju latentne infekcije na domaćinima. Sa sazrevanjem plodova, patogen prelazi iz latentne faze u fazu nekrotrofa pri čemu dolazi do ispoljavanja tipičnih simptoma oboljenja. Pored ekonomskih šteta koje patogeni prouzrokuju u uslovima skladištenja, u trgovinskoj razmeni, zaraženi plodovi predstavljaju jedan od značajnih puteva introdukcije patogena u različite delove sveta (Freeman i sar., 1998).

Smanjenje prinosa plodova jabuke kao posledica napada *Colletotrichum* spp. kreće se u opsegu 30-80% po Zhang i sar. (2008), ili >40% prema Crusius i sar. (2002).

Zbog uticaja spoljašnjih faktora na stabilnost i morfološke karakteristike, kao i zbog prisustva prelaznih formi, polifagnosti i izrazite genetičke varijabilnosti, konvencionalne metode identifikacije nisu uvek pouzdane (Freeman i sar., 2001; Peres i sar., 2005; Živković, 2011). Molekularni pristupi su sve više zastupljeni u identifikaciji fitopatogenih gljiva. Razvijeno je nekoliko molekularnih tehnika za karakterizaciju populacija i identifikaciju različitih *Colletotrichum* vrsta (Johnston i Jones, 1997; Lardner i sar., 1999; Crouch i sar., 2009; Munda i Gerič-Stare, 2011).

Najznačajniji region DNK gljiva za molekularnu identifikaciju je region ribozomalne DNK (rDNK) – ITS (Internal Transcribe Spacer) (Korabecna, 2007). Poređenje sekvenci ITS regiona se koristi u taksonomiji i molekularnoj filogeniji jer ga je moguće amplifikovati iz male količine DNK i zbog velike varijabilnosti ovog regiona između bliskih vrsta kao što su *C. gloeosporioides* i *C. acutatum*, i u okviru vrste (Giaretta i sar., 2010). Na osnovu razlika u sekvenci ITS regiona sintetisani su i prajmeri specifični za vrstu. Molekularna identifikacija pomoću prajmera specifičnih za vrstu pokazala se pouzdanom za identifikaciju i razlikovanje vrsta *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* (Screenivasaprasad i sar., 1996; Harp i sar., 2008; Živković, 2011; Grahovac i sar. 2012).

Za suzbijanje skladišnih patogena u primeni su najzastupljeniji sintetički fungicidi (Eckert, 1990). Ipak, njihova primena se sve više ograničava zbog rizika po životnu sredinu i toksikoloških svojstava, kao i sve češće pojave rezistentnosti, te je primena fungicida posle berbe zabranjena u mnogim zemljama (Janisiewicz, 2002; Nunes, 2012). Prema Štokholmskoj konvenciji o zagađivačima životne sredine, od ukupno 12 najopasnijih i najperzistentnijih zagađivača 10 su pesticidi (Gilden i sar., 2010). Stoga, neophodan je razvoj alternativnih mera zaštite od skladišnih patogena u što skorije vreme (Janisiewicz, 2002; Nunes, 2012). Konvencionalni pesticidi polako gube na značaju od 2000. godine, sa

godišnjim padom od 1,5% (Thakore, 2006). Interesovanje za biološko suzbijanje zemljišnih patogena je već duže vreme prisutno, dok su istraživanja bioloških mera suzbijanja skladišnih patogena tek u povoju (Janisiewicz, 2002). Činjenice da posle berbe plodovi gube otpornost koja ih je donekle štitila od napada patogena, te da se plodovi peru, što smanjuje mogućnost kompeticije već prisutnih korisnih mikroorganizama sa patogenima na plodu, visoka vrednost robe na tržištu nakon skladištenja u hladnjači, kao i mogućnost kontrolisanja uslova sredine tokom skladištenja plodova, idu u prilog uspešnoj primeni bioagensa u zaštiti uskladištenih plodova (Janisiewicz, 2002).

Mnogi rodovi bakterija se već duže vreme u literaturi spominju kao perspektivni za suzbijanje prouzrokovala biljnih bolesti, kao što su: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* (Dombou i sar., 2001). Takođe, poznato je da prirodne komponente pojedinih biljnih vrsta kao što su etarska ulja ispoljavaju antimikrobno i fungicidno delovanje (Zambonelli i sar., 1996; Oxenham i sar., 2005).

Precizna identifikacija *Colletotrichum* spp. primenom molekularnih metoda je preduslov za njihovo uspešno suzbijanje. Imajući u vidu održivi razvoj poljoprivrede i značaj kvaliteta plodova jabuke tokom skladištenja, neophodno je da se strategije zaštite plodova jabuke od pomenutih patogena razvijaju u pravcu primene alternativnih, bioloških mera. Istraživanja usmerena ka otkrivanju mikroorganizama i prirodno sintetisanih materija koje imaju potencijala za primenu u biološkoj zaštiti biljaka od velikog su značaja za održivi razvoj savremene poljoprivredne proizvodnje.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Gljive roda *Colletotrichum* na jabukama i njihov ekonomski značaj

Rod *Colletotrichum* predstavlja jedan od najčešćih i najznačajnijih rodova fitopatogenih gljiva. Gotovo svaki usev ili zasad širom sveta je osetljiv na jednu ili više vrsta iz ovog roda. Pomenuti patogeni prouzrokuju trulež plodova posle berbe, kao i antraknozne pege na nadzemnim, a neretko i podzemnim biljnim organima (Broad, 2010). U svetskoj bazi *Index Fungorum* (www.indexfungorum.com) trenutno (2013. godina) su dostupni podaci za 193 vrste ovog roda, dok su samo dve godine ranije podaci bili dostupni za 702 vrste. Navedeno govori u prilog činjenici da je teško utvrditi tačan broj predstavnika roda zbog postojanja ogromnog broja sinonima sumnjive taksonomske ispravnosti (Živković, 2011). Na teritoriji bivše Jugoslavije do 1995. godine registrovano je preko 19 vrsta ovog roda (Arsenijević i sar., 1996). Ove polifagne i ubikvitarne vrste su značajni prouzrokovatori bolesti biljaka i u našoj zemlji gde su im, među voćnim vrstama, najznačajniji domaćini višnja, jabuka, jagoda i kruška (Ivanović i Ivanović, 1992, 2001; Trkulja 2003; Ivanović i sar., 2005; Grahovac i sar., 2010; Živković, 2011). U svetu i kod nas, primarni prouzrokovatori antraknoze jabučastog i koštičavog voća su vrste *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* (Arsenijević, 1984; Babović i sar., 1984; Ivanović i Ivanović, 1992; Stojanović i sar., 2002). Pojavu antraknoze tj. gorke truleži na plodovima jabuke posle berbe, na teritoriji R. Srbije prvi put pominju Vojvodić i sar. (1975), ali su vrste *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* kao uzročnici ove pojave eksperimentalno potvrđeni na jabuci tek 2000. godine od strane Trkulje (2000a, 2000b).

Prouzrokovatori antraknoze jabuke (*C. acutatum* i *C. gloeosporioides*) širom sveta uzrokuju značajne gubitke u proizvodnji iste kako pre, tako i posle berbe plodova. Gubici pre berbe su veliki u zapadnim oblastima SAD-a (Sutton, 1990), na Novom Zelandu (Everett i sar., 2006) i u Brazilu (Crusius i sar., 2002). Značajni gubici posle berbe učestaliji su u Švedskoj (Olsson, 1965), Norveškoj (Borve, 2005) i Srbiji (Ivanović i Ivanović, 1992; Trkulja 2000a, 2000b; Trkulja, 2003; Ivanović, i sar., 2005; Živković i sar., 2010; Grahovac, 2010; Živković, 2011). Smanjenje prinosa plodova jabuke kao posledica napada *Colletotrichum* spp. kreće se u opsegu 30-80% (Zhang i sar., 2008), odnosno >40% (Crusius i sar., 2002). U slučaju zaraze jagoda u rasadniku moguća je šteta i do 80% propalih biljaka, dok u proizvodnji gubici prinosa plodova iznose 50% (Sreenivasaprasad i Talhinhos, 2005). Na bademu gubici premašuju one uzrokovane

patogenima iz rodova *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus* itd. (Terabe i sar., 2008). Kod borovnice gubici su 10 - 20% (Gillet i Schilder, 2009).

Pored ekonomskih šteta koje patogeni prouzrokuju u uslovima skladištenja, zaraženi plodovi predstavljaju jedan od značajnih puteva introdukcije patogena u različite delove sveta (Freeman i sar., 1998). Uz veliki ekonomski značaj, vrste roda *Colletotrichum* su značajne i kao eksperimentalni modeli (test organizmi) u izučavanjima raznih aspekata razvoja gljiva, infektivnog procesa, otpornosti domaćina na patogene, prenosa signala i interakcije biljka-patogen na molekularnom nivou. Na desetine laboratorija širom sveta bavi se izučavanjem biologije i patogenosti različitih *Colletotrichum* vrsta (Broad, 2010).

2.2. Istorijat klasifikacije roda *Colletotrichum*

Generički naziv roda *Colletotrichum* u primenu je uveo Corda 1831. godine (*loc. cit.* Cannon i sar., 2012). Prema Nomenklaturnom kodu za alge, gljive i biljke raniji naziv ovog roda bio je *Vermicularia*. Detaljnu nomenklaturu roda prema tada (1928. godina) važećim pravilima navodi Duke (*loc.cit.* Cannon i sar., 2012), a kasnije Sutton (1990) i Damm i sar. (2009). Bilo kakav pokušaj da se naziv *Vermicularia* postavi kao zamena za naziv *Colletotrichum* imao bi katastrofalne posledice po naučnu komunikaciju. Rod *Gloeosporium* je takođe vrlo često mešan sa rodom *Colletotrichum* krajem XIX i početkom XX veka. Korišćen je za taksone roda *Colletotrichum* bez prisutnih seta u konidiomatama (budući da je njihov razvoj varijabilan kod većine vrsta), ali je takođe obuhvatao i razne gljive koje nisu u vezi sa pripadnicima roda *Colletotrichum* (Cannon i sar., 2012). Sutton (1980) navodi još deset generičkih sinonima za *Colletotrichum* od kojih ni jedan danas nije u upotrebi.

U godinama posle objavljivanja naziva *Colletotrichum*, Corda je dodao još dve vrste ovom rodu (čiji se nazivi i danas koriste sa nesigurnošću). Pedeset novih taksona na nivou vrste ili niže je opisano u periodu 1880. - 1900. godine, i ovakav trend otkrivanja i uvođenja novih vrsta se nastavio i u XX veku. U prvoj von Arx-ovoj monografskoj obradi roda *Colletotrichum* iz 1957. godine postojalo je oko 750 naziva. Ova „eksplozija“ naziva se danas može smatrati uzaludnim bavljenjem taksonomijom vođenom pretežno nekritičnim pretpostavkama da su vrste roda *Colletotrichum* specifične za domaćina. Rezultat ovakvog tumačenja bio je da se svaki put kada se pripadnik roda *Colletotrichum* ustanovi na novom domaćinu, definiše novi takson, čak i u slučaju nepostojanja jedinstvenih morfoloških, dijagnostičkih svojstava patogena. Uticaj von Arx-ove monografije bio je prilično snažan i doveo je do nove ere u taksonomiji roda *Colletotrichum*. Njegov pristup bio je zasnovan na

morfološkim karakteristikama, bez ili sa vrlo malo osvrtnja na patogena svojstva, što je dovelo do smanjenja od oko 750 na 11 vrsta. Mnogi taksoni definisani su na osnovu literaturnih opisa. Ovako drastično smanjenje broja taksona obezbedilo je osnovu za dalji razvoj sistematike, ali ostalo je nejasno da li je i sam von Arx 11 prihvaćenih vrsta posmatrao kao zbirno opisane agregate ili pojedinačne taksone. Ovo se posebno odnosi na vrstu *C. gloeosporioides* (koja ima oko 600 sinonima) koja sadrži seriju od devet “abweichende Formen“ različitih formi, uključujući i pet taksona koje je von Arx ukombinovao u okviru roda *Colletotrichum* u prvoj monografiji. Pomenute različite forme smatrale su se specifičnim za domaćina koje se po morfološkim karakteristikama nisu mogle razlikovati od osnovne grupe *C. gloeosporioides*. Uključeni taksoni bile su vrste koje su danas u okviru *C. orbiculare*, *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* agregata, kao i drugi taksoni danas nepoznate pripadnosti (Cannon i sar., 2012). Kako navode Sutton (1992) i Cannon i sar. (2000) von Arx-ov pristup klasifikaciji se danas smatra krutim čak i u čisto morfološkom smislu. Ipak, von Arx-ovo delo je temelj za sva buduća morfološko-taksonomska istraživanja roda *Colletotrichum*.

Dalja taksonomska istraživanja bazirala su se na definisanju zbirnih vrsta ili drugih taksona specifičnih za određenog domaćina. Taksonomiji roda *Colletotrichum* 1960-tih godina značajno je doprineo Simmonds koji je 1965. godine definisao vrstu *C. acutatum*. Sutton je 1966. i 1968. godine ukazao na taksonomski značaj morfologije apresorija (Cannon i sar., 2012). Sutton (1980) je izvršio je definisao 22 vrste u okviru roda.

Prva Međunarodna radionica na temu *Colletotrichum* održana je 1990. godine na Univerzitetu Bath, u Ujedinjenom Kraljevstvu (Bailey i Jegger, 1992). Okupljeni su stručnjaci taksonomije, molekularne biologije, interakcija domaćin/parazit i patologije. Na skupu je istaknut značaj široke primene molekularnih metoda u izučavanju roda *Colletotrichum* koje su doprinele revolucionarnim istraživanjima u okviru ovog, kao i mnogih drugih rodova fitopatogenih gljiva. Mills i sar. (1992) i Screenivasaprasad i sar. (1992) prvi su objavili primenu DNK sekvenci za razlikovanje *Colletotrichum* vrsta na osnovu variranja sekvence u ITS1 regionu rDNK kod šest *Colletotrichum* vrsta, kao i na osnovu polimorfizama u istom regionu kod *C. gloeosporioides* poreklom iz različitih domaćina. Broj radova u kojima su primenjivane molekularne metode u ispitivanjima roda *Colletotrichum* naglo je porastao posle 1990. godine.

Dalja značajna otkrića u sistematici roda postignuta su posebnim izdanjem časopisa *Fungal Diversity* krajem 2009. godine koji je sadržao niz radova na temu revizije

taksonomije i preglednih radova vezanih za ovaj rod. Ovo uključuje uvodni rad o značaju precizne identifikacije ovog roda (Hyde i sar., 2009a), kao i završni rad o *Colletotrichum* nazivima koji su trenutno u upotrebi (Hyde i sar., 2009b) i preporukama za polifazne metode (Cai i sar., 2009). Spisak *Colletotrichum* naziva koji su danas u upotrebi obuhvatio je ukupno 66 vrsta i još dodatnih 20 nedavno korišćenih naziva, ali se oni smataju nepouzdanim (Hyde i sar., 2009b). Ovo je značajan porast u broju prepoznatih vrsta u odnosu na 23 taksona na koje je ukazao von Arx (Cannon i sar., 2012) i 39 vrsta koje je definisao Sutton (1992), što ukazuje na sve veću pouzdanost molekularnih metoda u definisanju vrsta. Prema izdanju *Studies in Mycolgy* iz 2012. godine, Cannon i sar. (2012) prepoznali su još 41 vrstu, te je broj vrsta roda *Colletotrichum* porastao na preko 100. U svetskoj bazi *Index Fungorum* (www.indexfungorum.com) trenutno su dostupni podaci za 193 vrste ovog roda.

Prema *Index Fungorum* (2013) trenutna pozicija vrsta *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* u klasifikaciji je:

Carstvo: Fungi

Razdeo: Ascomycota

Klasa: Sordariomycetes

Podklasa: Sordariomycetidae

„Incertae sedis“ – nepoznata taksonomska grupa

Familija: Glomerellaceae.

2.3. Filogenetsko mesto roda *Colletotrichum*

Colletotrichum je uključen u morfološku klasifikaciju *Ascomycota* kao polni stadijum *Glomerella*. Kako navode Cannon i sar. (2012) u hronološkim izdanjima *Dictionary of Fungi* do šestog izdanja (Ainsworth, 1971), *Glomerella* je član *Phyllachoraceae*, red *Sphaeriales*. Theissen i Sydow (1915) su opisali *Phyllachoraceae* kao pripadnike reda *Dothideales*, a Petrak (1924) je utvrdio da *Phyllachora*, *Polystigma* i *Physalosporina* ne pripadaju redu *Dothideales*. Chadefaud (1960) je uveo naziv reda *Glomerellales* (nije zvanično objavljen), uključujući rodove *Glomerella*, *Phyllachora* i još dva roda u okviru grupe „Eu-Glomerellales“. Barr (1976) je uveo naziv reda *Phyllachorales* (mada nije zvanično objavio) u koji je uključio različite grupe familija zajedno sa familijom *Phyllachoraceae* koja je podvedena pod familiju *Melogrammataceae*. Kao deo ove grupe prihvaćen je i rod *Glomerella*. Sedam godina kasnije, Barr (1983) je zvanično potvrdio naziv

reda *Phyllachorales* ali nije značajno menjao njegov sadržaj. Hawksworth i sar. (1983) su iste godine postavili rod *Glomerella* na njegovu tradicionalnu poziciju u familiju *Phyllachoraceae*, ali su ovu familiju tretirali kao jedinog predstavnika reda *Polystigmatales*, još jedan naziv za koji se smatra da nije zvanično objavljen (*loc.cit.* Cannon i sar., 2012). U osmom izdanju *Dictionary of Fungi* (Hawksworth i sar., 1995) usvojena je slična klasifikacija, s tim što je umesto reda *Polystigmatales* uveden red *Phyllachorales*.

S obzirom da pripadnici ovog roda ne fromiraju strome, *Glomerella* je dugo smatran graničnim pripadnikom familije *Phyllachoraceae* (Cannon, 1991). Naziv familije *Glomerellaceae* je prvi put objavljen (nepravilno) od strane Locquin (1984) u okviru opšte klasifikacije gljiva u kojoj je uvedeno preko 278 novih familija. Locquin-ov potez je generalno bio ignorisan sve dok prva ispitivanja sekvenci zajedno sa ontogenetičkim istraživanjima (Uecker, 1994) nisu potvrdila da *Glomerella* i *Phyllachora* ne pripadaju istom redu gljiva. Naziv *Glomerellaceae* je usvojen u devetom izdanju *Dictionary of Fungi* sa nesigurnom pozicijom u okviru *Sordariomycetidae* (Kirk i sar., 2001), a u desetom izdanju kao nesvrstani takson u okviru *Hypocreomycetidae* (Kirk i sar., 2008).

Prve pokušaje da se *Glomerella/Colletotrichum* smeste u molekularni filogenetski sistem objavili su Illingworth i sar. (1991) i Berbee i Taylor (1992) koristeći 18S rDNK sekvence. Iako je broj uzoraka bio nedovoljan da se obezbedi pouzdano pozicioniranje, uzorci *C. gloeosporioides* su pokazali da su pripadnici *Hypocreales*. Većina kasnijih filogenetskih istraživanja uključivalo je *Glomerella/Colletotrichum* samo kao outgrupe ili da bi se obezbedio generalni okvir za filogeniju nesrodnih grupa (Zhang i Blackwell, 2002; Castlebury i sar., 2004; Huhndorf i sar., 2004).

Jako je malo podataka o sekvencama *Phyllochoraceae sensu stricto*. Winka i Eriksson (2000) su pronašli sekvence 18S rDNK dve *Phylachorraceae* vrste koje spadaju u *Sordariomycetidae*, dok se za *Glomerella cingulata* smatralo da je u bližoj vezi sa *Hypocreomycetidae*. Wanderlei-Silva i sar. (2003) su takođe objavili istraživanja 18S rDNK prema kojima je *Phyllochoraceae* polifiletska (višerasna). U ovim istraživanjima, najvažniji taksoni su grupisani u okviru *Sordariales*, *Ophiodothella vaccinii* je grupisana u okviru *Xylariales* a *Glomerella/Colletotrichum* kao sestrinska grupa grupe *Hypocreales*.

Zhang i sar. (2006) su potvrdili filogenetsku poziciju *Glomerella* u okviru *Hypocreomycetidae*. Sestrinska taksonomska veza sa *Verticillium*-om je obnovljena (Zhang i sar., 2006), ali je ovakvo grupisanje posledica ograničenog broja uzorkovanih taksona. Kasnija istraživanja su *Verticillium* svrstala u okviru *Plectosphaerellaceae* (Zare i sar., 2007;

Cannon i sar., 2012a). Reblova i sar. (2011) su nastavili razjašnjavanje filogenetske pozicije *Glomerellaceae* na osnovu ITS, LSU, SSU i rpb2 gena. U ovom istraživanju *Glomerellaceae* je svrstana u uobičajene kategorije, a uočene su dve nove familije *Australiascaceae* i *Reticulascaceae*. Na osnovu ovih rezultata potvrđen je red *Glomerellales* za ove tri familije. Ovo verovatno ne predstavlja konačno razjašnjenje filogenetske pozicije roda *Colletotrichum*, ali je *Glomerellales* kategorija čvrsto definisana, bez obzira na izražene morfološke razlike između tri pomenute familije.

2.4. Najznačajnije kategorije roda *Colletotrichum*

Filogenetskom analizom utvrđeno je da se rod *Colletotrichum* sastoji iz devet kategorija: *Acutatum*, *Boninense*, *Dematium*, *Destructivum*, *Gloeosporioides*, *Graminicola*, *Orbiculare*, *Spaethianum* i *Truncatum*. Još uvek ne postoji univerzalno prihvaćen postupak nazivanja ovih kategorija i njihovog usklađivanja sa tradicionalnim taksonomskim kategorijama Međunarodnog koda za nomenklaturu algi, gljiva i biljaka (International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants - ICNAFP), iako nacrt *PhyloCode* predstavlja značajan korak u ovom pravcu (www.ohio.edu/phylocode/). Formalno razlikovanje kategorija u okviru roda *Colletotrichum* je veoma poželjno, iz filogenetskih razloga, budući da rod sadrži puno monofiletskih podjedinica sa zajedničkim karakteristikama (pogotovo u morfologiji spora) (Cannon i sar., 2012).

2.4.1. *Acutatum* kategorija

Acutatum kategorija je definisana kao kolektivna za *C. acutatum* i još 29 blisko povezanih vrsta i *C. orchidophilum* kao sestrinskim taksonom. U okviru kategorije razlikuju se dve podkategorije, dok je *C. acutatum sensu stricto* granična vrsta podkategorije sa većim brojem vrsta. *Acutatum* kategorija se efikasno razdvaja primenom podataka ITS sekvence, kao i osnovne podkategorije, ali za utvrđivanje strukture podkategorija ova sekvenca nije u potpunosti pouzdana (Cannon i sar., 2012). Detaljan prikaz vrsta ove kategorije dali su Damm i sar. (2012a).

2.4.2. *Gloeosporioides* kategorija

Vrste *C. gloeosporioides* detaljno su prikazali Weir i sar. (2012). Ovo je stabilna kategorija na veoma dugoj grani sa samo par razlika na lokusima gena. Ipak, ovo je raznovrsna kategorija u smislu morfologije i uključuje veliki broj značajnih biljnih patogena (Cannon i sar., 2012). Weir i sar. (2012) ustanovili su dve podkategorije na osnovu analize osam lokusa. Podkategorije su nazvane *kahawae* i *musae*.

2.5. Simptomi antraknoze na plodovima jabuke

Pojava antraknoznih oboljenja može biti nagla i veoma intenzivna, naročito u uslovima dugog toplog i vlažnog perioda (Biggs and Miller, 2001). Mogu se ispoljavati u dva različita oblika: oboljenje koje se javlja u voćnjaku i oboljenje koje se javlja na zrelim plodovima posle berbe u skladištima i nakon iznošenja plodova iz skladišta. Oboljenja se javljaju pre svega na nadzemnim delovima biljaka, listovima, stablu, i plodovima pre i posle berbe (Freeman et.al, 1998; Lewis Ivey, 2004).

Prema Sutton-u (1990), u voćnjaku, ovi patogeni mogu ispoljiti simptome antraknoze na mladim plodovima, listu jabuke, a takođe i pojavu rak-rana na granama. Pojava simptoma kako na mladim plodovima, tako i na listovima i na granama zabeležena je i u zemljama SAD-a. Kako navodi Anonimus (2005), simptomi koje prouzrokuju *Colletotrichum* spp. se razlikuju u zavisnosti da li je infekcija ostvarena sporama koje su nastale iz peritecija tj. peritecijskog tipa, koje produkuju askospore, ili je infekcija konidijskog tipa, koja produkuje samo konidije. Početni simptomi ova dva tipa infekcije su slični. Infekcija može da se ostvari tokom cvetanja, a simptomi na plodovima se vide kao malene sivkasto-braon tačke koje se dalje ne šire sve dok plod ne počne da sazreva. Infekcija ploda nastupa mesec dana nakon opadanja latica u vidu sitnih, ulegnutih svetlo do tamno braon lezija koje mogu biti oivičene crvenim oreolom na zrelim plodovima. Lezije koje su poreklom od konidijskih infekcija obično ostaju kružnog oblika i uležu tokom sazrevanja ploda. Nakon što lezije dostignu veličinu od 1,2 do 2,4 cm u prečniku, oko mesta infekcije u koncentričnim krugovima formiraju se acervule. Na nekim lezijama acervuli su retki, na drugim gusti. U acervulima na površini ploda se obilno formiraju konidije. U suvim uslovima konidije su kristalnog izgleda, dok su u vlažnim uslovima mase konidija kremaste, losos crvene do roze boje. Lezije koje su nastale od spora peritecijskog tipa obično nisu ulegnute i obično su tamnije braon boje od onih nastalih od konidijskog tipa. Acervuli su široko razbacani u tamno braon do crnim gomilicama po površini ploda. Masa konidija peritecijskog tipa je narandžaste, a na starijim lezijama tamne do crne boje. Obe vrste lezija se konusno šire prema jezgru ploda. Na prelasku zdravog u obolelo tkivo lezije su u obliku slova V. Neki inficirani plodovi opadaju, dok drugi postaju mumificirani i ostaju na granama tokom zime. Faza pegavosti lista koju prouzrokuje peritecijski tip je ređa i javlja se u toplim i vlažnim uslovima a jako zaraženo lišće opada. Simptomi u vidu rak rana na granama se takođe ređe javljaju, rak rane su ovalne, ulegnute sa koncentričnim krugovima (Anonimus, 2005).

Na našim prostorima nije zabeležena pojava simptoma na granama (Živković, 2011), što je pre svega posledica neodgovarajućih temperatura za razvoj patogena početkom sezone. Mnogo značajnije ekonomske štete nastaju usled latentnih infekcija, koje dovode do masovne pojave antraknoze i to tek nakon berbe plodova, sa ostvarivanjem povoljnih ekoloških uslova (Živković, 2011).

Prema Sutton-u (1990), antraknoza ploda jabuke prisutna je u gotovo svim zemljama gde se ova voćna vrsta komercijalno gaji. Pojava karakterističnih simptoma zabeležena je u toku vegetacije, za vreme skladištenja u neadekvatnim prostorima, kao i po iznošenju plodova iz skladišta i pri plasmanu na tržište (Agrios, 2005). Prema Borve i Stensvand (2007) antraknoza na plodovima jabuke se uglavnom intenzivno razvija posle skladištenja na niskim temperaturama. Simptomi u hladnim skladištima mogu biti različiti i teško se razlikuju od truleži “bikovo oko” (prouzrokovatelj *Peizicula malicorticis*, anamorf *Cryptosporiopsis curvispora*) i lenticelne truleži (prouzrokovatelj *Peizicula alba*, anamorf *Phlyctaena vagabunda*).

Tipični simptomi na plodovima se uočavaju u vidu ulegnutih lezija u okviru kojih se formiraju ružičaste do narandžaste mase konidija. U slučaju jakih infekcija, lezije se spajaju. Masa konidija se javlja ili nepravilno raspoređena, ili u koncentričnim krugovima u okviru lezija (Freeman et.al, 1998; Lewis Ivey, 2004). Nekroza je progresivna i u većini slučajeva dovodi brzo do truleži ploda (Kim and Hong, 2008).

2.6. Epidemiologija *Colletotrichum* spp. na jabuci

Epidemiologija nekoliko prouzrokovatelja antraknoza ispitivana je u različitim fazama razvoja useva. Kod većine antarknozih oboljenja konidije se prenose kapima vode i dovode do pojave latentnih (mirujućih) infekcija koje su najintenzivnije tokom najvlažnijih perioda vegetacije. Infekcija vrstama roda *Colletotrichum* moguća je u svim fazama razvoja domaćina (Wharton and Dieguez-Uribeondo, 2004).

Izvori inokuluma vrsta *C. gloeosporioides* i *G. cingulata* na jabukama su: rak rane (samo *G. cingulata*), mumificirani plodovi, stare peteljke plodova, micelija, peritecije i acervuli na osušenom drvetu (Sutton, 1990; Borve and Stensvand, 2007). Izvori inokuluma vrste *C. acutatum* na jabuci nisu detaljno proučeni (Peres i sar., 2005). U Brazilu, *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* su pronađeni u cvetnim pupoljcima tokom zime (Bernandi i sar., 1983; Crusius i sar., 2002). *C. acutatum* je takođe pronađen u cvetovima jabuke na Novom Zelandu, ali u manjoj količini, i u mirujućim pupoljcima (Everett i sar., 2006). Iako je

u istraživanjima Borve i Stensvand (2007) broj inficiranih pupoljaka vrstom *C. acutatum* bio vrlo nizak, oni bi ipak mogli predstavljati izvor inokuluma u proleće kao što je utvrđeno za borovnicu (De Marsay, 2005; Verma i sar., 2006) i trešnju (Borve and Stensvand, 2006). Dalja istraživanja su neophodna kako bi se utvrdilo kada se ostvaruju infekcije ploda i da li je ili ne *C. acutatum* bez simptoma prisutan na cvetovima i listovima u toku vegetacije kao što je to slučaj kod jagode i citrusa (Zulfiquar i sar., 1996; Leandro i sar., 2001).

2.7. Identifikacija *Colletotrichum* spp.

Karakterizacija roda *Colletotrichum* oslanja se na veliki broj kriterijuma kao što su morfologija (Freeman i sar., 1998; Dong i sar., 2007; Živković, 2011), optimalna temperatura za porast (Bernstein i sar., 1995; Wasantha Kumara i Rawal, 2008; Grahovac i sar., 2012), osetljivost na benomil (Liynage i sar., 1992; Shabi i sar., 1994; 1996;), specifičnost prema domaćinu (Bernstein i sar., 1995; Freeman i Shabi, 1996), vegetativna kompatibilnost izolata (Shabi i sar., 1996; Katan i Shabi, 1996; Freeman i Katan, 1997) i molekularne metode (Screenivasaprasad i sar., 1992; Afanador-Kafuri i sar., 2003; Dong i sar., 2007; Crouch i sar., 2009; Giaretta i sar., 2010; Faedda i sar., 2011; Grahovac i sar., 2012; Cannon i sar., 2012).

Klasične fitopatološke metode identifikacije vrsta roda *Colletotrichum* se pretežno baziraju na morfološkim razlikama kao što su oblik i boja kolonija, veličina i oblik konidija, prisustvo ili odsustvo seta u acervulama, kao i na razlikama u optimalnoj temperaturi rasta i postojanju teleomornog stadijuma *Glomerella* (Sutton, 1992).

Smith i Black (1990) su prikazali klasične fitopatološke kriterijume koji omogućavaju razlikovanje *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Za *C. acutatum* navode da formira spororastuću miceliju, bele, bež, narandžaste, ružičaste ili svetlo roze boje i fuziformne konidije. Isti autori opisuju kolonije *C. gloeosporioides* kao brzorastuće, tamno sive micelije koje formiraju cilindrične konidije, zaobljenih vrhova. Sonoda i Pelosi (1988) su utvrdili prisustvo dve morfološke grupe *Colletotrichum* na cvetovima citrusa: jedna grupa izolata je brzorastuća sive boje sa konidijama prosečne dužine 14,8 µm, a druga spororastuća narandžaste boje sa prosečnom dužinom konidija 13,3 µm. Izolati sa micelijom sive boje su visoko osetljivi na benomil dok je kod izolata narandžaste boje utvrđena niža osetljivost. Xie i sar. (2010) navode da na KDA podlozi *C. acutatum* formiraju u početku beličaste a kasnije sive kolonije, dok su kolonije *C. gloeosporioides* bele, a kasnije maslinaste boje.

Prema Freeman i sar. (1998) boja kolonije nije dovoljno pouzdan pokazatelj za diferencijaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Međutim, u slučaju hromogenih tipova, tj. ružičaste boje kolonija, isti autori, kao i mnogi drugi (Trkulja, 2004; Gonzales i Sutton, 2004; Peres i sar., 2005, Živković, 2011), ukazuju da se sa priličnom sigurnošću može tvrditi da se radi o hromogenim vrstama *C. acutatum*. Puno autora navodi brži rast *C. gloeosporioides* u odnosu na *C. acutatum*, kao karakteristiku taksonomskog značaja (Smith i Black, 1990; Bernstein i sar., 1995; Shi i sar., 1996; McKay i sar., 2009). Takođe, česti su navodi da je prosečna dužina konidija vrste *C. acutatum* manja od prosečne dužine *C. gloeosporioides* (Sutton, 1980; Baxter i sar., 1983; Trkulja, 2004; Živković, 2011). Međutim, u istraživanjima Xie i sar. (2010), dužina konidija *C. acutatum* bila je veća od *C. gloeosporioides*. Kada je u pitanju osetljivost na benomil, Peres i sar. (2005) navode da *C. acutatum* nije ni visoko osetljiv ni visoko tolerantan na benomil. Naime, količine primene benomila (0,1 – 1 µl/ml) koje prouzrokuju 20-50% inhibicije rasta micelije ove vrste najčešće uzrokuju 100% inhibiciju *C. gloeosporioides*. Međutim, *C. acutatum* je osetljiviji na benomil od rezistentnih sojeva *C. gloeosporioides*, te ovaj kriterijum za razlikovanje vrsta može biti nepouzdan.

U ispitivanjima Xie i sar. (2010), na KDA podlozi izolati *C. gloeosporioides* brzo su formirali peritecije sa askusima i askosporama dok ni jedan izolat *C. acutatum* nije formirao polni stadijum. Međutim, u istraživanjima Guerber i Correll (2001) u veštačkoj kulturi na podlozi „Minimal Salts Medium“ *C. acutatum* je formirao teleomorf *G. acutata*. U istim istraživanjima je utvrđeno da su izolati vrste *C. acutatum* poreklom iz istih domaćina autosterilni, međutim oplodnja sa izolatima *C. acutatum* iz drugih domaćina vrlo brzo dovodi do pojave teleomorfa *G. acutata*. Kako navode Wharton i Dieguez-Urbeondo (2004) polna rekombinacija kod većine *Colletotrichum* vrsta je retka u prirodi. Polni stadijum vrste *C. acutatum* nije nikada pronađen u prirodi (Johnston i Jones, 1997; Freeman i sar., 2001). Međutim, postojanje polnog stadijuma *C. gloeosporioides* (*G. cingulata*) utvrđeno je u prirodi na plodovima jabuke (Latham i Williams 1983; Camilo i sar., 1988; Sutton, 1990; Borge i Stensvand, 2007), kao i u veštačkoj kulturi ovih gljiva (Shi i sar., 1996; Xie i sar., 2010). Wasantha Kumara i Rawal (2008) navode da zbog uticaja sredine na stabilnost gore navedenih karakteristika kao i prisustva prelaznih formi, pomenuti kriterijumi nisu uvek dovoljni za preciznu identifikaciju vrsta roda *Colletotrichum*.

Kako bi se sistematski okarakterisale *Colletotrichum* vrste, primenjuju se molekularne metode. Počevši od primene metodologije zasnovane na molekularnim markerima koja je u

primeni od 1980-ih godina, zatim analize rDNK, ITS sekvence, izrade specifičnih prajmera na osnovu razlika u sekvenci ITS regiona (Brown i sar., 1996; Johnston and Jones, 1997) i izrada stabala analizom sekvence ITS regiona od početka 1990-ih godina (Sreenivasaprasad i sar., 1996a), sve do skorijeg vremena kada otpočinje molekularna filogenija na osnovu dva ili više lokusa (Du i sar., 2005; Crouch i sar., 2009). Uz nekoliko izuzetaka, primena ITS sekvence dominira u savremenim molekularnim sistematskim istraživanjima *Colletotrichum* spp. (Crouch i sar., 2009).

U velikom broju istraživanja, primenom PCR metode i specifičnih prajmera CaInt2 i CgInt u kombinaciji sa univerzalnim prajmerom ITS4 pozdano su identifikovane vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* (Screenivasaprasad i sar., 1996; Lewis Ivey i sar., 2004; Martinez i sar., 2009; Živković, 2011; Liu i sar., 2012). Međutim, Anrade i sar. (2007) navode da su pomenuti prajmeri omogućili identifikaciju svega šest od ukupno 29 izolata sa papaje, dok je razlikovanje vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* među preostala 23 izolata bilo moguće RFLP analizom ITS regiona.

PCR metodom, primenom univerzalnih prajmera ITS1 i ITS4 amplifikuju se produkti rDNK-ITS regiona *Colletotrichum* spp. veličine oko 600 bp (Freeman i sar., 2001; Culebras i sar., 2003). Analizom dobijenih ITS sekvenci, moguće je razlikovati vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* (Crouch i sar., 2009). Međutim, isti autori ukazuju na nedostatak analize rDNK-ITS i tvrde da razlikovanje manjih podgrupa samo na osnovu ITS sekvence nije dovoljno pouzdano i da su bootstrap vednosti obično ispod 50%.

Može se konstatovati da je identifikacija *Colletotrichum* vrsta primenom klasičnih fitopatoloških metoda veoma zahtevna i duga, a nedovoljno precizna. Iz ovog razloga, u savremenim istraživanjima neophodna je implementacija molekularnih metoda. Međutim, i prilikom molekularne identifikacije, potrebno je primeniti više od jedne metode. Otuda, za preciznu identifikaciju do nivoa vrste i nižih kategorija, neophodna je kombinacija klasičnih fitopatoloških metoda i više od jedne molekularne metode.

2.8. Suzbijanje *Colletotrichum* spp.

Kako navodi Nunes (2012), ukoliko manipulacija plodovima tokom i posle berbe, kao i uslovi skladištenja nisu odgovarajući, gubici plodova voća i povrća posle berbe mogu iznositi od 25% (razvijene zemlje) do oko 50% (zemlje u razvoju). Kada je u pitanju voće, najveći deo gubitaka uzrokovan je fitopatogenim gljivama (Nunes, 2012). Uprkos razvoju novih fungicida i unapređenih tehnologija skladištenja 1960-ih i 1970-ih godina koji su

značajno produžili period čuvanja plodova posle berbe, gubici su i dalje visoki (Janisiewicz, 2002). Oni se smanjuju pretežno primenom fungicida (Eckert, 1990), merama zaštite posle berbe kojima se smanjuje količina prisutnog inokuluma i čuvanjem plodova u namenskim skladištima (niske temperature snažno inhibiraju razvoj patogena od berbe do iznošenja na tržište).

U R. Srbiji nema registrovanih preparata za tertiranje plodova jabuke posle berbe. Za primenu tokom tehnološke zrelosti plodova a najkasnije 15 dana pre berbe za suzbijanje prouzrokovala truleži registrovani su preparati: Zato 50 WG (a.m. trifloksistrobin – hemijska grupa strobilurina), Galofungin (a.m. karbendazim – hemijska grupa benzimidazola), Geoxe 50 WG (a.m. fludioksonil – hemijska grupa fenil pirola), Switch 62,5 WG (a.m. ciprodinil + fludioksonil - hemijska grupa anilin pirimidina i fenil pirola), Funomil (a.m. tiofanat-metil – hemijska grupa karbamata) i Bellis (boskalid+piraklostrobin – piridin-karboksamidi i metoksi-karbamati). Od bioloških preparata registrovan je samo jedan na bazi bakterije *Bacillus subtilis* soj ST 1/III (F-Stop, formulisan kao SC, 15x10¹⁰ CFU/ml) (Sekulić i Jeličić, 2013).

Prema bazi podataka pesticida Evropske Unije od 2014. godine (http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event), ni jedna od aktivnih supstanci registrovanih za suzbijanje truleži plodova jabuke u R. Srbiji ne nalazi se na spisku od 55 fungicida čija primena nije odobrena direktivom 67/548/EEC. Odsustvo registrovanih preparata za primenu posle berbe jabuke u R. Srbiji, u skladu je sa preporukama radne grupe južnog Tirola za integralnu proizvodnju jabučastog voća (Agrios, 2013). Primena fungicida koji su registrovani za suzbijanje prouzrokovala truleži u R. Srbiji, osim karbendazima i tiofanat-metila, predviđena je i smernicama za integralnu proizvodnju jabučastog voća (Agrios, 2013). Karbendazim je u grupi fungicida čija je primena dozvoljena direktivom Evropske Unije 67/548/EEC. Ova aktivna materija je manje toksičan metabolit benomila. Primena benomila je zabranjena kako pretpostavkama Agrios-a i direktive 67/548/EEC, tako i Pravilnikom o ograničenjima i zabranama proizvodnje, stavljanja u promet i korišćenja hemikalija (Sl. glasnik RS", br. 90/2013I). U konsolidovanoj verziji od 09.08.2009. Regulative Evropske Unije (EC) broj 889/2008 koja prikazuje detaljna pravila za implementaciju Regulative (EC) 834/2007 o organskoj proizvodnji i obeležavanju organskih proizvoda, u Aneksu II se navode materije čija je primena u svojstvu fungicida dozvoljena u organskoj proizvodnji. U pitanju su lecitin, etarska ulja, mikroorganizmi, bakar, kalcijum polisulfid, natrijum permanganat, sumpor, kalcijum hidroksid i natrijum bikarbonat

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32008R0889:en:NOT>).

Dakle, od preparata registrovanih za suzbijanje prouzrokovala truleži u R. Srbiji, postoji samo jedan preparat (F-Stop) čija bi primena u organskoj proizvodnji bila u skladu sa regulativama Evropske Unije.

Iako se sintetički fungicidi najčešće primenjuju u suzbijanju oboljenja uskladištenih plodova voća, sve veća briga oko toksičnosti ovih supstanci, razvoja rezistentnosti patogena na fungicide, i štetnih efekata na životnu sredinu i zdravlje ljudi, doveli su do potrebe za pronalaženjem alternative hemijskoj zaštiti. Primena fungicida posle berbe je zabranjena u mnogim evropskim zemljama (Adaskaveg i Forster, 2010). Kao alternativne metode zaštite navode se: primena biofungicida, skladištenje voća u kontrolisanoj atmosferi, primena ozona, snažnog oksidansa, koji je efikasan protiv raznih mikroorganizama na plodovima voća, zagrevanje plodova posle berbe, modifikacija agrotehničkih mera i genetska modifikacija (GMO) (Tian, 2007; Cawoy i sar., 2011). Jedan od problema sa kojim se susrećemo u R. Srbiji jeste starost hladnjača i nedostatak istih sa uslovima kontrolisane atmosfere (Gvozdenović i Keserović, 2002).

Biopesticidi su proizvodi za zaštitu bilja na bazi živih organizama ili proizvoda koje sintetišu živi organizmi. Mogu se podeliti u četiri osnovne grupe: mikroorganizmi (mikrobni pesticidi), drugi organizmi koji se primenjuju u zaštiti bilja (nematode, insekti itd.), prirodne materije dobijene od živih organizama (biohemijski pesticidi) i primena genetički modifikovanih biljaka (Thakore, 2006; EPA, 2011).

Biopesticidi imaju nekoliko prednosti nad sintetičkim pesticidima: brže se razgrađuju u životnoj sredini i manje su toksični za neciljane organizme (Thakore, 2006). Njihovi mehanizmi delovanja su obično drugačiji od mehanizma delovanja konvencionalnih pesticida. Zbog toga, oni mogu pomoći u suzbijanju rezistentnih populacija i mogu se primenjivati u kombinaciji sa konvencionalnim pesticidima kako bi se izbegao razvoj rezistentnosti (Cawoy i sar., 2011).

Među biopesticidima, proizvodi na bazi mikroorganizama čine oko 30% ukupne prodaje i imaju široku primenu. Jedna od prednosti biopesticida na bazi mikroorganizama jeste njihov mehanizam delovanja koji je generalno zasnovan na borbi za prostor i hranu, direktnom antagonizmu u odnosu na rast fitopatogenog organizma i imunizaciji biljke domaćina. U poređenju sa primenom genetski modifikovanih biljaka, pesticidi na bazi mikroorganizama uživaju veće poverenje potrošača. U Evropi postoje razne pravne barijere u korišćenju genetski modifikovanih organizama. Mikroorganizmi su u prednosti i u odnosu na

primenu prirodnih ekstrakata (biohemijskih pesticida). Naime, oni se mogu nastaniti u fitosferi i konstantno proizvoditi bioaktivne supstance *in situ*. Budući da se aktivni molekuli proizvode ili prilikom direktnog kontakta sa ciljanim organizmom ili samo u njegovoj blizini, a za postizanje visoke efikasnosti potrebne su vrlo male količine biopesticida (Cawoy i sar., 2011). Pored sposobnosti da smanje intenzitet zaraze, neki biopesticidi na bazi mikroorganizama imaju i pozitivan efekat na samu biljku tako što utiču pozitivno na njen rast i ishranu (biođubriva i fitostimulatori) i na interakciju biljke domaćina i korisnih mikroorganizama (Antoun i Prevost, 2006). Uprkos prednostima, biopesticidi zauzimaju mali deo tržišta pesticida (2,5% u 2005. godini). Međutim, ovo je i dalje značajno budući da je u 2005. godini prodaja pesticida dostigla nivo od 26,7 milijarde dolara. Zainteresovanost za biopesticide na tržištu je sve veća te se očekuje porast prodaje za 15% na godišnjem nivou, dok je od 2000. godine za konvencionalne pesticide zabeležen pad prodaje od 1,5% godišnje (Thakore, 2006).

U poređenju sa interesovanjem za biološko suzbijanje zemljišnih patogena, istraživanja vezana za biološko suzbijanje prouzrokovaca truleži plodova u skladištima je tek u povoju (Janisiewicz, 2002). Sredina u kojoj se čuvaju plodovi posle berbe naročito je povoljna za primenu biopreparata, budući da se može podesiti favorizovanje razvoja antagonista; u većini slučajeva se plodovi posle berbe peru što onemogućava kompeticiju drugih mikroorganizama sa primenjenim agensom, kao i smetnje drugih faktora, na primer čestica prašine. Zbog visoke cene koštanja mikrobioloških preparata, njihova primena u skladištu je opravdana u odnosu na primenu u polju (Nunes, 2012). Iako sredina u skladištu obezbeđuje povoljne uslove za primenu mera biološke zaštite, Chalutz i Droby (1997) ukazuju na izvesne poteškoće na koje treba obratiti pažnju. To je, pre svega, visok nivo ostvarene zaštite plodova od fitopatogenih gljiva koji se zahteva u skladištima (95-98%). Zatim, pitanje zdravstvene bezbednosti hrane budući da biološka zaštita primenom mikroorganizama podrazumeva njihovo prisustvo u hrani, i na kraju, malo potencijalno tržište za biofungicide koji bi se primenjivali isključivo u skladištima (Nunes, 2010).

U literaturi se već dugo vremena navode i neki rodovi bakterija kao perspektivni bioagensi: *Bacillus* (Anwar, 1949; Burr i sar., 1978), *Streptomyces* (Tahvonen, 1982), *Enterobacter* (Hadar i sar., 1983), *Pseudomonas* (Caesar i Burr, 1987).

2.8.1. Primena bakterija iz roda *Streptomyces* u biološkoj zaštiti

Istraživanja prirodnih proizvoda za zaštitu bilja koji bi se mogli plasirati na svetsko tržište su značajno napredovala i aktinomicete, naročito iz roda *Streptomyces*, pokazale su se kao dobri kandidati za pronalaženje novih pristupa u suzbijanju biljnih bolesti (Behal, 2000; Hassan i sar., 2011). Aktinomicete pripadaju redu *Actinomycetales*, odeljak (division) Gram pozitivnih bakterija. Ovo su dobro poznate saprofitne bakterije koje razgrađuju organsku materiju, naročito biopolimere kao što su lignoceluloza, skrob i hitin u zemljištu (Crawford i sar., 1993). One takođe sintetišu i širok dijapazon antibiotika kao produkte sekundarnog metabolizma. Agroindustrija je veoma zainteresovana za ovu grupu organizama kao izvore materija za pospešivanje rasta biljaka i supstanci koje bi se mogle koristiti u biološkoj zaštiti bilja (Doubou i sar., 2001)

Prvi primer bakterije iz roda *Streptomyces* kao agensa biološke zaštite je *Streptomyces griseoviridis* Anderson i sar. soj K61. Ovaj soj je izolovan iz treseta (Tahvonen, 1982) i aktivan je u odnosu na niz fitopatogenih gljiva kao što su *Alternaria brassicola* (Schw.) Wiltsh., *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., *Fusarium avenaceum* (Fr. Fr.) Sacc., *F. culmorum* (Wm. G. Smith) Sacc., *F. oxysporum* Schlechtend.: Fr. F.sp. *dianthi* (Prill. and Delac.) W.C. Snyder and H.N. Hans, *Pythium debaryanum* Hesse sensu Middleton, *Phomopsis sclerotioides* Kesterens, *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Tahvonen, 1982). Posle *S. griseoviridis*, identifikovano je još streptomiceta koje ispoljavaju aktivnost na biljne patogene: *S. hygroscopicus* (Rothrock i Gottlieb, 1984), *S. violaceusniger* (Crawford i sar., 1993), *S. lydicus* (Yuan i Crawford, 1995), *S. diastatochromogenes* (Liu i sar., 1995).

Delovanje aktinomiceta kao bioagensa može se objasniti njihovom sposobnošću kolonizacije biljne površine, antibioze sa biljnim patogenima, sinteze ekstracelularnih proteina i razgradnje fitotoksina (Doubou i sar., 2001). Antagonistička aktivnost roda *Streptomyces* prema biljnim patogenima se najčešće vezuje za njihovu sposobnost sinteze antifungalnih materija i ekstracelularnih hidrolitičkih enzima. Među enzimima koje sintetišu ovi mikroorganizmi, hitinaza i β -1,3-glukanaza se smatraju značajnim za hidrolizu ćelijskog zida fitopatogenih gljiva (Prapagdee i sar., 2008).

Identifikacija aktinomiceta koje imaju sposobnost kolonizacije biljnog tkiva i ispoljavaju antagonističko delovanje na biljne patogene su od izuzetnog značaja (Doubou, 2001). Podataka o antagonističkom delovanju ovih mikroorganizama na *Colletotrichum* spp. je malo (Prapagdee i sar. 2008a; Shimizu i sar., 2009; Živković i sar., 2010; Ismet i sar., 2012), jer su pretežno izučavani kao antagonisti zemljišnih patogena. Jedna od vrsta roda

Streptomyces koja ispoljava snažan antagonizam prema *Colletotrichum* spp. je *S. hygroscopicus* (Prapagdee i sar., 2008; 2008a).

U svetu postoje komercijalno dostupni biofungicidi na bazi dve vrste ovog roda *S. lydicus* i *S. griseoviridis* (Cawoy i sar., 2011).

2.8.2. Primena bakterija iz roda *Bacillus* u biološkoj zaštiti

Oko polovine komercijalno dostupnih bakterijskih preparata je na bazi bakterija iz roda *Bacillus*. Ovaj rod je genetički veoma raznovrstan i prisutan u različitim sredinama, od morske vode do zemljišta, pa čak i na izvorištima vrele vode (Hoch i sar., 1993). Ove bakterije su najznačajniji izvor potencijalnih mikrobnih pesticida zahvaljujući nekoliko svojstava. Pripadnici roda *Bacillus*, kao što je na primer *B. subtilis*, su dobro izučeni organizmi što omogućava njihovu racionalnu primenu kao biopesticida. Zatim, Administracija za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država (US Food and Drug Administration - USFDA) odobrila je status „generalno bezbedni“ (Generally regarded as safe - GRAS), nepatogeni mikroorganizmi za *B. subtilis* (Cawoy i sar., 2011). Ova činjenica je najznačajnija za njihovu primenu u biološkoj zaštiti. Vrste roda *Bacillus* imaju sposobnost da stvaraju spore – izuzetno otporne dormantne forme koje mogu da prežive visoke temperature, nepovojne pH vrednosti, nedostatak hrane, vode itd. (Piggot i Hilbert, 2004). Ova sposobnost može da se iskoristi prilikom proizvodnje biopesticida, indukovanjem sporulacije na kraju proizvodnog procesa što produžava rok trajanja i ne zahteva posebne uslove skladištenja biopesticida (Lolloo i sar., 2010).

Postoji više vrsta ovog roda (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* i *B. cereus*) za koje je utvrđena antifungalna aktivnost i na bazi kojih su formulisani komercijalno dostupni preparati (Cawoy i sar., 2011).

Vrsta *B. subtilis* je fakultativni anaerob (Nakano i Hulett, 1997), što je značajno svojstvo za zemljišne biopesticide budući da količina kiseonika u zemljištu može varirati, kao i za biofungicide koji se koriste za zaštitu u skladištima zbog veoma niskog sadržaja kiseonika u savremenim hladnjačama (ULO - Ultra Low Oxygen). *B. subtilis* su pokretne i mogu brzo da kolonizuju nove ekološke niše, imaju raznovrsne mehanizme delovanja na patogene organizme i vrlo često jedan soj deluje pomoću nekoliko mehanizama. Spektar delovanja ovih bakterija na fitopatogene gljive je izuzetno širok (Cawoy, 2011). Aktivnost *B. subtilis* na različite vrste iz roda *Colletotrichum* navode brojni autori (Havenga i sar.,

1999; Collins i Jacobsen, 2003; Ongena i sar., 2005; Demoz i Korsten, 2006; Kupper, 2009; Živković i sar., 2010; Fu i sar., 2010; Cawoy i sar., 2011).

2.8.3. Primena etarskih ulja u biološkoj zaštiti

Istraživanja fungicida dobijenih ekstrakcijom iz biljaka postaju sve intenzivnija budući da je očigledno da ove materije mogu značajno unaprediti agrohemijsku tehnologiju. Pretpostavke da se proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka prirodno javljaju kako bi aktivno štitili biljke od napada patogena su utemeljene na činjenicama (Kim i sar., 2003). Sekundarni biljni metaboliti su često aktivni protiv malog broja ciljanih vrsta mikroorganizama. Razlažu se u prirodi do netoksičnih materija i mogu biti veoma korisni u programima integralne zaštite bilja. Zbog toga, postoje nastojanja da se preparati na bazi sekundarnih biljnih metabolita uvedu u primenu kao komercijalni biofungicidi (Lee i sar., 2001). Među sekundarne biljne metabolite koji ispoljavaju snažno antimikrobno i fungicidno dejstvo (Oxenham i sar., 2005) svrstana su i etarska ulja (Isman, 2000). Visok potencijal etarskih ulja u suzbijanju biljnih patogena ogleda se u njihovom prirodnom poreklu koje ih čini manje štetnim za životnu sredinu i čoveka, kao i malom riziku za razvoj rezistentnosti patogena, jer po svom sastavu predstavljaju kompleks jedinjenja sa različitim mehanizmima delovanja (Daferera i sar., 2003).

Antifungalna aktivnost etarskih ulja je tesno povezana sa sadržajem monoterpenskih fenola, naročito timola, karvakrola i eugenola (Barrera-Necha i sar., 2008). Etarska ulja mnogih biljaka poznata su po različitom spektru antimikrobnog delovanja (Wilson i sar., 1997; Suhr and Nielsen, 2003; Tanović i sar. 2004). Slično, utvrđene su značajne razlike u osetljivosti različitih fitopatogenih gljiva na iste vrste etarskih ulja (Muller Riebau i sar., 1995; Soković i sar., 2009). Ove materije mogu inhibirati rast patogena privremeno (fungistatično delovanje) ili trajno (fungicidno delovanje) (Abd-Alla i Haggag, 2013). Efekti etarskih ulja na *C. gloeosporioides*, a naročito na *C. acutatum* ispitivani su u značajno manjoj meri u odnosu na druge vrste fitopatogenih gljiva (Bosquez-Molina i sar., 2010; Duduk i sar., 2010; Padman i Janardhana, 2011).

2.8.4. Optimizacija proizvodnje agenasa za primenu u biološkoj zaštiti

Prva faza otkrivanja agensa za biološku zaštitu je izolacija i ispitivanje njegove efikasnosti *in vitro* i *in vivo*. Preduslov za komercijalni razvoj je optimizovanje uslova koje mikroorganizam zahteva za maksimalnu produkciju metabolita antagonističke aktivnosti (Priya i sar., 2011; Nunes, 2012). Najznačajniji faktori u procesu gajenja mikroorganizma koji direktno utiču na produkciju antifungalnih supstanci su: sastav podloge (izvori ugljenika, azota i fosfora) kao i trajanje kultivacije, budući da ove komponente u najvećem broju slučajeva predstavljaju sekundarne proizvode metabolizma.

Optimizacija predstavlja postupak pronalaženja neophodnih uslova koje je potrebno ispuniti da bi se postigao najbolji rezultat u datoj situaciji (Popov, 2000). Veliki deo istraživanja u nauci i inženjerstvu, a pogotovo u industriji je empirijski. Upotreba statističkih metoda planiranja može znatno povećati efikasnost samog eksperimenta i dovesti do boljih i pouzdanijih zaključaka. Eksperiment ima veoma važnu ulogu pri razvoju novih proizvoda, kao i razvoju i poboljšanju procesa proizvodnje. Zbog toga, on zauzima centralno mesto u nauci, naročito danas, zbog kompleksnosti problema sa kojima se nauka suočava (Lazić, 2004).

U najčešće korišćene postupke za analizu procesa svrstava se metoda odzivne površine (*engl.*: Response Surface Methodology, RSM) (Myers i Montgomery, 2002; Khayet i sar., 2008). Metoda RSM je skup matematičkih i statističkih postupaka koji se koriste za formiranje empirijskih modela i analizu procesa. Cilj je da se na osnovu pažljivo odabranog eksperimentalnog plana optimizuju odzivi sistema koji zavise od više nezavisno promenljivih parametara (Montgomery, 2005).

Osnovna prednost RSM je u tome što je potreban manji broj eksperimentalnih podataka da bi se obezbedio dovoljan broj informacija za određivanje statistički validnih rezultata. RSM jednačine opisuju parametre sistema i njihov uticaj na posmatrane odzive sistema, određuju međuzavisnosti testiranih promenljivih, ispituju kombinovane efekte parametara procesa na posmatrane odzive i obezbeđuju efikasno istraživanje procesa (Mayers i Montgomery, 2002).

Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog plana ključan je korak u primeni postupka odzivne površine. Na raspolaganju su brojni eksperimentalni planovi koji se razlikuju pre svega po broju eksperimenata koji omogućavaju adekvatno predstavljanje eksperimentalnog

prostora, kao što su centralni kompozitni plan, Box-Behnkenov plan, Doehlertov plan i dr (Ferreira i sar., 2007). Optimizaciju pomoću RSM je moguće podeliti u tri faze:

- a. Određivanje nezavisnih parametara i njihovih nivoa.
- b. Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog plana, predviđanje i provera jednačine modela. Box-Behnkenov plan ima prednost nad ostalim u pogledu efikasnosti, odnosno odnosa između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broja eksperimenata koje je potrebno izvesti.
- c. Grafičko prikazivanje jednačine modela i određivanje optimalnih uslova proizvodnje.

Jednačina modela grafički može biti prikazana na dva načina, u dve ili tri dimenzije. Trodimenzionalni dijagram se naziva odzivna površina i on pokazuje povezanost odziva i nezavisno promenljivih. Dvodimenzionalni dijagram, u obliku kontura, daje dobru sliku oblika odzivne površine. Kada ovaj dijagram pokaže elipsu ili krug, centar sistema daje maksimum ili minimum odziva. Ukoliko dijagram pokaže hiperbolu ili parabolu, fiksna tačka se naziva prevojna tačka i ona nije ni minimum ni maksimum (Mayers i Montgomery, 2002).

3. ZADACI I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Zadaci istraživanja su:

- Prikupljanje plodova jabuke sa simptomima truleži iz skladišta na teritoriji R. Srbije, tokom tri uzastopne godine.
- Izolovanje prouzrokača truleži na hranljivu podlogu i dobijanje čistih kultura monosporijalnih izolata *Colletotrichum* spp.
- Provera patogenosti izolata, reizolacija i provera patogenosti reizolata. Formiranje trajne kolekcije patogenih, monosporijalnih izolata.
- Ispitivanje morfoloških, fizioloških i patogenih odlika, izolacija DNK i molekularna identifikacija izolata primenom prajmera specifičnih za vrstu, i amplifikovanje ITS regiona.
- Ispitivanje antifungalne aktivnosti nekoliko mikroorganizama i etarskih ulja na izolate *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*.

Ciljevi istraživanja su:

- Utvrđivanje zastupljenosti i frkventnosti *Colletotrichum* spp. na plodovima jabuke u skladištima na teritoriji R. Srbije.
- Identifikacije najzastupljenijih vrsta ovog roda kao prouzrokača truleži plodova jabuke kod nas.
- Ispitivanje pouzdanosti i specifičnosti identifikacije *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* primenom klasičnih i molekularnih metoda.
- Izrada filogenetskog stabla, utvrđivanje filogenetske pozicije i genetičke udaljenosti izolata.
- Utvrđivanje koji mikroorganizmi i etarska ulja ispoljavaju antifungalnu aktivnost na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*.
- Optimizacija uslova proizvodnje mikroorganizma koji ispolji najizraženije antifungalno delovanje i utvrđivanje načina njegovog delovanja.

4. RADNE HIPOTEZE

Na osnovu pregledane literature konstatovano je da su *Colletotrichum* spp. ekonomski značajni patogeni biljaka. Među brojnim bolestima koje ovi patogeni prouzrokuju, vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* imaju poseban značaj kao prouzrokovajući truleži plodova jabuke u skladištu, što su preliminarna ispitivanja u okviru ovog rada i potvrdila. Uzimajući u obzir da se u literaturi navodi nekoliko stotina vrsta ovog roda, kao prouzrokovaća raznih bolesti na biljkama, a među njima i truleži plodova jabuke, realna je pretpostavka da klasične fitopatološke metode nisu dovoljno pouzdane za identifikaciju ovih patogena do nivoa vrste. Pretpostavka je da se primenom molekularnih metoda zasnovanih na analizi DNK, metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) uz korišćenje prajmera specifičnih za vrstu mogu pouzdano razlikovati vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Ove vrste mogu se razdvojiti istom metodom i primenom univerzalnih prajmera, uz analizu replikovanih ITS sekvenci, a u okviru vrste *C. acutatum* izdvojiti genetičke grupe koje se i morfološki razlikuju.

Pretpostavlja se da pojedini mikroorganizmi i etarska ulja ispoljavaju antifungalno delovanje na *Colletotrichum* spp. Ispoljeno antifungalno delovanje zavisi od faktora kao što su vrsta mikroorganizma ili etarskog ulja; vrsta gljive na koju se aktivnost ispituje; uslovi u kojima se mikroorganizmi gaje; trajanje kultivacije mikroorganizama i koncentracija primene etarskih ulja, kao i trajanje ekspozicije fitopatogenih gljiva isparljivoj fazi istih. Smatra se da su komponente podloge za kultivaciju mikroorganizma koje, pojedinačno i u interakciji, najviše utiču na stepen antifungalne aktivnosti: izvori ugljenika, azota i fosfora. Primenom Box-Benkenovog eksperimentalnog plana, kvadratnog modela odzivne površine i metode željene funkcije može se optimizovati sastav podloge koji obezbeđuje maksimalnu antifungalnu aktivnost proizvodnog mikroorganizma.

5. MATERIJAL I METODE

Laboratorijska istraživanja izvedena su u laboratorijama Univerziteta u Novom Sadu, na Poljoprivrednom, Prirodno-matematičkom i Tehnološkom fakultetu, kao i u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd – Zemun.

Za potrebe skladištenja plodova pod određenim uslovima korišćene su hladnjače preduzeća „Atos Fructum“ u Maloj Remeti.

5.1. Prikupljanje uzoraka, izolacija patogena, izdvajanje monosporijalnih izolata

Uzorci plodova jabuke sa simptomima truleži sakupljeni su tokom četvorogodišnjeg perioda (2010-2013) na teritoriji R. Srbije u 18 objekata (Tabela 1). U slučaju hladnjača sa kontrolisanom atmosferom, plodovi su uzorkovani po iznošenju iz komore:

Tabela 1. Lokacije i tipovi objekata u kojima je vršeno uzorkovanje plodova jabuke u periodu 2010 – 2013. godine

Lokacija objekta	Tip objekta	Datum uzorkovanja
Šabac	pijačna tezga	mart, 2010
Uzići-Užice	pijačna tezga	april, 2010
Mirosaljci-Arilje	podrumsko skladište	maj, 2010
Radmilovac	improvizovano skladište	maj, 2010
Čelarevo	hladnjača sa vrlo malo kiseonika	mart, 2011; jun, 2012
Kukujevci	(ULO)	mart, 2011; jul, 2012
Banoštor	podrumsko skladište	maj, 2011; maj 2012; februar, 2013
Bački Vinogradi		jun, 2012
Hajdukovo		jun, 2012
Novi Sad „Merkator“	hladnjača sa normalnom atmosferom	jun, 2012
Novi Sad „Univerexport“		jun, 2012
Novi Sad „Idea“		jul, 2012
Kač		jul, 2012
Tavankut	hladnjača sa kontrolisanom atmosferom	jul, 2012
Mala Remeta	hladnjača sa vrlo malo kiseonika (ULO)	jul, 2012
Soko Banja	pijačna tezga	septembar 2012
Novi Sad („Tržnica“ Limanska pijaca)	pijačna tezga	mart, 2013
Novi Sad („Tržnica“ Futoška pijaca)	pijačna tezga	mart, 2013

Većina objekata u kojima je vršeno uzorkovanje nalaze se na teritoriji AP Vojvodine (14) dok je na teritoriji zapadne, centralne i jugoistočne Srbije uzorkovanje izvršeno u četiri objekta.

Plodovi su birani vizuelnim pregledom, na osnovu tipa simptoma truleži. Utvrđeno je četiri tipa simptoma. Prvi tip simptoma bile su pege karakteristične za prouzrokovaoče antraknoze (naborane, ulegle, braon, čvršće konzistencije, prečnika preko 1,5 cm) sa ili bez vidljive sporulacije patogena (krem do narandžaste mase konidija koja curi iz acervula formiranih na površini pega). Drugi tip simptoma ispoljen je u vidu sitnih, uleglih, svetlo i tamno mrkih pega prečnika oko 0,5 mm. Treći tip simptoma bio je u vidu svetlo mrkih, delimično ulegnutih pega, vodenastog izgleda, sa ili bez vidljive sporulacije plavo-zelene boje na površini, ustajalog mirisa. Obolelo tkivo se lako odvajalo od zdravog tkiva ploda. Četvrtom tipu simptoma odgovarale su tamno mrke do crne pege, različite veličine, sunderaste konzistencije. U laboratoriji je izvršen ponovni pregled i izolacije iz plodova koji su po simptomima odgovarali svim opisanim tipovima, s tim što su u slučaju odbacivanja uzoraka prednost imali plodovi sa simptomima trećeg i četvrtog tipa.

Za izolaciju su primenjene standardne fitopatološke metode. Plodovi jabuke su oprani i površinski sterilisani 3% natrijum-hipohloratom (NaOCl), a potom isprani sterilnom vodom. Na prelazu zdravog u obolelo tkivo aseptično su uzeti fragmenti ploda jabuke ispod kore i naneti na sterilnu podlogu od krompira, dekstroze i agara (KDA) (Dhingra i Sinclair, 1995). Inokulisane KDA podloge inkubirane su u termostatu na 25°C u trajanju od pet dana. Micelija formirana nakon inkubacije presejana je na sterilne KDA podloge radi dobijanja čistih kultura gljiva.

Iz kolekcije čistih kultura izbačene su one za koje se sa sigurnošću moglo vizuelno utvrditi da ne pripadaju rodu *Colletotrichum*. Od preostalih čistih kultura gljiva koje su po izgledu kolonija i morfologiji konidija odgovarale *Colletotrichum* spp., izabrano je 33 izolata od kojih su formirani monosporijalni izolati koji su, nakon dokazane patogenosti, uključeni u dalja ispitivanja (Tabela 2). Formiranje monosporijalnih kultura izvršeno je po metodi Burgess i sar. (1994). U epruvetu sa sterilnom vodom, iz kulture gljive je aseptično uneta jedna konidiomata pronađena pod binokularom. Sadržaj epruvete je izmešan na vrtložnoj mešalici (vortex) i 1000 µl ovako dobijene suspenzije su nanete na sterilnu podlogu od vode i agara (WA podloga) u Petri kutije prečnika 90 mm. Potresanjem kutije, uneta suspenzija je ravnomerno raspoređena po površini podloge. Petri kutije su potom postavljene u zakošeni položaj i kada se višak suspenzije slio na jednu stranu kutije, pod plamenom je aseptično

otrešen iz Petri kutije. Petri kutije su zatim u kosom položaju inkubirane 24 h u termostatu na 25°C. Potom je pod mikroskopom pronađena jedna proključala spora i aseptično preneti na KDA podlogu i inkubirana u termostatu na 25°C do formiranja kolonije.

Nazivi izolata formirani su tako da slova u nazivu označavaju lokalitet sa koga izolat potiče, a broj označava uzorak ploda jabuke iz koga je izolat izolovan.

Tabela 2. Izolati odabrani za formiranje kolekcije monosporijalnih izolata i dalja ispitivanja nakon dokazane patogenosti

Izolat	Lokalitet
BV-4	
BV-6	Bački Vinogradi
BV-11	
HA-3	Hajdukovo
TV-5	
TV-2	Tavankut
Š-1	Šabac
KU-1	
KU-14	Kukujevci
B-7	
B-4	Banoštor
MR-1	
MR-10	Mala Remeta
MR-317	
Č-2	
Č-3	
Č-31	Čelarevo
Č-30	
Č-13	
Č-14	
LP-8	Novi Sad („Tržnica“ Limanska pijaca)
LP-9	
ME-7	Novi Sad „Merkator“
UN-11	Novi Sad „Univerexport“
I-7	Novi Sad „Idea“
K-4	Kač
R-2	
R-1	Radmilovac
SB-1	
SB-12	Soko Banja
MI-23	
MI-21	Mirosaljci-Arilje
UZ-107	Uzići-Užice

5.2. Provera patogenosti i formiranje kolekcije *Colletotrichum* spp.

Patogenost svih dobijenih izolata proverena je inokulacijom ozleđenih plodova jabuke sorte zlatni delišes metodom Vignutelli i sar. (2002).

Za proveru patogenosti monosporijalnih izolata metoda Vignutelli i sar. (2002) je delimično modifikovana. Micelija monosporijalnih izolata gajena je sedam dana na KDA podlozi na 25°C. Plodovi jabuke su površinski sterilisani potapanjem u 70% etanol, isprani sterilnom, destilovanom vodom i prosušeni. Na plodovima su napravljeni ujednačeni kružni otvori prečnika 4 mm i dubine 3 mm. Fragmenti micelije izolata prečnika 3 mm uneti su u formirane otvore tako da micelija naleže na ozleđeno tkivo jabuke. Plodovi na koje su na isti način naneti fragmenti sterilne KDA podloge su predstavljali kontrolu. Patogenost svakog izolata je ispitana na dva ploda jabuke sa po dva kružna otvora. U ispitivanja je uključeno 33 odabrana monosporijalna izolata, kao i dva referentna izolata *C. acutatum* - TUT 137A (jagoda, Izrael) i *C. gloeosporioides* - AVO 374B (avokado, Izrael). Laboratorija za primenjenu fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd – Zemun obezbedila je referentne izolate.

Zaraženi plodovi su inkubirani 19 dana u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Posle sedam i 14 dana na plodovima je praćena pojava antraknoznih, nekrotičnih pega i obrazovanje reproduktivnih organa gljive. Prečnik nekroze (kolonizacija egzokarpa ploda) i dubina nekroze (kolonizacija mezokarpa ploda) (mm) mereni su nakon 19 dana inkubacije.

Sa inokulisanih plodova jabuke obavljene su reizolacije po istoj metodi kao i izolacija patogena. Kolonije dobijenih reizolata (izgled, boja, zoniranost) upoređene su sa kolonijama izolata. Patogenost dobijenih reizolata proverena je istom metodom kao i patogenost izolata.

Monosporijalni izolati dokazane patogenosti i morfološki reprezentativni reizolati prekultivisani su na kosu KDA podlogu i čuvani su u frižideru na 3-4°C.

Od ukupnog broja izolovanih fitopatogenih gljiva tokom svake godine uzorkovanja utvrđeno je koji procenat čine izolati *Colletotrichum* spp. na osnovu čega je utvrđena zastupljenost ovog roda među prouzrokovateljima truleži ploda jabuke.

5.2.1. Uticaj uslova skladištenja plodova jabuke na patogenost *Colletotrichum* spp.

Uticaj uslova skladištenja na ostvarenje i razvoj infekcije veštački inokulisanih plodova izolatima *Colletotrichum* spp. ispitan je na plodovima jabuke sorte zlatni delišes. Na površinski sterilisanim plodovima napravljeni su otvori prečnika 4 mm i dubine 3 mm. Fragmenti prečnika 3 mm, sedam dana stare micelije izolata uneti su u otvore tako da micelija naleže direktno na tkivo ploda. Kontrolu su činili plodovi inokulisani sa sterilnim fragmentima KDA podloge. Za sve uslove skladištenja, ogled je postavljen u pet ponavljanja, jabuka sa dva otvora predstavljala je jedno ponavljanje. Uticaj uslova skladištenja ispitan je za dva morfološki različita izolata *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i jedan izolat *C. gloeosporioides* (MR-1).

Inokulisani plodovi su u dezinfikovanim, plastičnim, zatvorenim komorama stavljeni na inkubaciju na temperature: $5\pm 1^{\circ}\text{C}$, $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ i $35\pm 1^{\circ}\text{C}$, u hladnjaču sa vrlo malo kiseonika (Ultra Low Oxygen, ULO) uz uslove: $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$, 0,8% O_2 i 1% CO_2 , i u hladnjaču sa normalnom atmosferom pri $2\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Plodovi skladišteni na $5\pm 1^{\circ}\text{C}$, $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ i $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ocenjivani su četvrtog, 14. i 21. dana posle inokulacije. Plodovi skladišteni na temperaturama $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ i $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ su dodatno inkubirani još tri nedelje na sobnoj temperaturi ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), a širenje truleži je ocenjeno četvrtog i 21. dana po iznošenju na sobnu temperaturu.

U ULO hladnjači plodovi su čuvani dva meseca, a ocena je vršena na dan iznošenja iz hladnjače, i posle četiri i 21 dan inkubacije na sobnoj temperaturi ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$).

U hladnjači sa normalnom atmosferom plodovi su čuvani šest meseci, a širenje nekroze je ocenjeno na dan iznošenja iz hladnjače, i posle četiri i 21 dan inkubacije na sobnoj temperaturi ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Pri ocenjivanju, obeležje posmatranja bio je prečnik nekroze izražen u mm. Utvrđeno je da li različiti uslovi skladištenja plodova utiču na brzinu razvoja nekroze nakon iznošenja plodova na sobnu temperaturu.

5.3. Morfološke i fiziološke osobine izolata *Colletotrichum* spp.

Morfološke i fiziološke osobine izolata ispitivane su *in vitro* i *in vivo* na veštački inokulisanim plodovima sorte zlatni delišes (Baxter i sar., 1983). Nativni mikrosopski preparati su posmatrani i fotografisani na svetlosnom mikroskopu sa integrisanom kamerom (BTC).

5.3.1. Morfologija vegetativnih organa *Colletotrichum* spp.

U okviru morfologije vegetativnih organa izučavane su fenotipske karakteristike - izgled, boja i zoniranost lica i naličja kulture (Hawksworth i sar. 1995) izolata *Colletotrichum* spp. na podlogama KDA, MPA (maltozni agar), V8 (podloga od soka povrća), SDA (Sabaraud's dekstrozni agar) i OA (ovseni agar) (Lević, 2005). U Petri kutije prečnika 85 mm razliveno je po 15 ml odgovarajuće sterilne hranljive podloge. Podloge su zasejane sa fragmentima prečnika 3 mm, sedam dana stare micelije gljive, gajene na 25°C na KDA podlozi i inkubirane sedam dana na 25°C.

5.3.2. Morfologija konidija *Colletotrichum* spp.

Morfološke karakteristike konidija utvrđene su mikroskopskim pregledom nativnih preparata. Posmatrani su oblik i veličina konidija. Odlike konidija utvrđene su za one iz kulture na KDA podlozi, starosti 15 dana kao i za konidije formirane *in vivo* na veštački inokulisanim plodovima jabuke posle istog vremenskog perioda.

Prema obliku konidija, izolati su svrstani u tri kategorije:

- (a) fusiformne, zaoštrene na oba kraja
- (b) cilindrične, zaoštrene na jednom kraju, na drugom oble i
- (c) cilindrične, zaobljene na oba kraja.

Dužina i širina konidija određeni su merenjem 50 slučajno odabranih konidija svakog izolata. Date su minimalne, srednje i maksimalne vrednosti, a izračunat je i odnos dužina/širina konidija.

5.3.3. Obrazovanje teleomorfog stadijuma *Colletotrichum* spp.

Pojava teleomorfog stadijuma praćena je na podlogama (KDA, MPA, V8, SDA i OA) korišćenim pri određivanju morfoloških i fizioloških odlika izolata *Colletotrichum* spp. (Lević, 2005), kao i zasejavanjem po dva morfološki različita izolata na podlogu sa minimalnim sadržajem nutrijenata (Minimal Salts Medium) (Guerber i Correll, 2001).

Kulture su gajene mesec dana u termostatu na 25°C i čuvane dve nedelje u frižideru na 4°C. Posmatrana je pojava peritecija – plodonosnog tela koje se formira u teleomorfnom stadijumu. Takođe, pojava polnog stadijuma je praćena i na veštački inokulisanim plodovima, do potpunog iscrpljivanja ploda.

5.3.4. Uticaj hranljivih podloga na rast izolata *Colletotrichum* spp.

Uticaj hranljivih podloga na rast izolata *Colletotrichum* spp. ispitan je na podlogama KDA, MPA, V8, SDA i OA (Lević, 2005). U Petri kutije prečnika 85 mm razlivano je po 15 ml odgovarajuće podloge. Na podloge su zasejani kružni fragmenti micelije (Ø 3 mm) starosti sedam dana gajene na KDA podlozi na 25°C. Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Jedna Petri kutija, zasejana sa jednim fragmentom predstavljala je jedno ponavljanje. Rast izolata *Colletotrichum* spp. prvi put je ocenjen posle četiri dana merenjem prečnika kolonija (mm) i dalje praćen do ispunjenja Petri kutija. Mikroskopiranjem nativnih preparata je utvrđeno prisustvo i intenzitet sporulacije posle 7 i 14 dana inkubacije na pomenutim podlogama.

5.3.5. Uticaj temperature i svetlosti na rast izolata *Colletotrichum* spp.

Među uslovima sredine koji utiču na rast gljiva, temperatura je izuzetno značajna. Ona utiče na skoro svaku aktivnost gljive (Agrios, 2005). Rast izolata *Colletotrichum* spp. ispitan je na sledećim temperaturama: 2, 4, 5, 6, 7, 10, 20, 25, 28, 30, 33 i 35°C. Fragmenti prečnika 3 mm, sedam dana stare micelije gajene na KDA podlozi zasejavani su na sterilnu KDA podlogu i inkubirani na gore navedenim temperaturama. Rast izolata je ocenjen posle četiri i sedam dana inkubacije, merenjem prečnika kolonije u dva pravca.

Uticaj svetlosti na rast izolata ispitan je zasejavanjem fragmenata micelije na KDA podlogu po istom principu kao i pri ispitivanju uticaja temperature. Izolati su inkubirani na sobnoj temperaturi uz smenu dana i noći, dok je uticaj tame ispitan uvijanjem zasejanih Petri kutija u aluminijumsku foliju. Rast izolata je ocenjen 10. dana merenjem prečnika kolonija u dva pravca. Mikroskopiranjem nativnih preparata je utvrđeno prisustvo/odsustvo sporulacije.

5.4. Molekularna identifikacija izolata *Colletotrichum* spp.

Ispitivani izolati *Colletotrichum* spp. molekularno su identifikovani primenom metode lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Elles and Mountford, 2003). Primenom prajmera specifičnih za vrstu, identifikovano je 33 izolata izolovana iz antraknoznih plodova jabuke, a u identifikaciju su uključena i dva referentna izolata. Takođe, izvršeno je kloniranje ITS sekvenci ribozomalne DNK pomoću univerzalnih prajmera dvanaest morfološki različitih izolata. ITS sekvenca je analizirana i na osnovu nje je izvršena filogenetska analiza izolata.

5.4.1. Izolacija DNK

Ukupna količina DNK je izolovana iz sedam dana stare micelije izolata gajenih na KDA podlozi prema metodi Harrington i Wingfield (1995). Kako bi se potvrdilo da je izolovana DNK odgovarajuća za analizu metodom PCR, testirana je u reakciji sa univerzalnim prajmerima ITS1 i ITS4, pri čemu je očekivano dobijanje fragmenata dužine oko 600 baznih parova (bp) (White i sar., 1990).

5.4.2. Identifikacija primenom prajmera specifičnih za vrstu

Za PCR identifikaciju pomoću prajmera specifičnih za vrstu, korišćen je univerzalni reverzni prajmer ITS4 u kombinaciji sa specifičnim forward prajmerima: CaInt2 u reakciji za *C. acutatum* i CgInt u reakciji za *C. gloeosporioides* (Tabela 3).

Tabela 3. Prajmeri korišćeni u PCR reakciji za identifiaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Vrsta prajmera	Naziv prajmera	Sekvenca 5' – 3'	Literaturni izvor
Forward prajmer za <i>C. acutatum</i>	CaInt2	GGGGAAGCCTCTCGCGG	Screenivasaprasad i sar. (1996)
Forward prajmer za <i>C. gloeosporioides</i>	CgInt	GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG	Mills i sar. (1992)
Reverzni univerzalni prajmer	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White i sar. (1990)

PCR amplifikacija urađena je prema modifikovanoj metodi Sreenivasaprasad i sar. (1996) i Lewis Ivey i sar. (2004). PCR reakciona smeša konačne zapremine 25 µl za svaki izolat sadržala je: oko 100 ng genomske DNK, 0,4 µM svakog prajmera, 200 µM svakog deoksinukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1,5U Taq polimeraze, 1X Taq pufera, 2,5 mM

MgCl₂, 0,5xQ-*solution*. Reakciona PCR smeša bez dodate DNK korišćena je kao negativna kontrola. Izolovana DNK referentnih izolata korišćena je kao pozitivna kontrola.

Kloniranje ciljanih fragmenata DNK izvedeno je u PCR aparatu (Eppendorf Master Cycler). Uslovi reakcije bili su sledeći:

- Početna denaturacija DNK: 5 minuta na 94°C
30 ciklusa:
 - Denaturacija: 1,5 minut na 94°C
 - Hibridizacija: 2 minuta na 55°C
 - Elongacija: 3 minuta na 72°C
- Finalna elongacija: 10 minuta na 72°C.

Dobijeni PCR produkti (6 µl + 1 µl boje (Loading dye, Fermentas, Litvanija)) razdvojeni su horizontalnom elektroforezom u 2% agaroznom gelu (sa 3 µl rastvora etidijum bromida koncentracije 2,5 mg/ml) u 0,5 x TBE puferu, pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 60 minuta.

Vizuelizacija amplifikovanih produkata vršena je na UV transiluminatoru. Približna veličina PCR produkata određena je na osnovu pozicije u odnosu na 1 kb DNK marker (Fermentas, Litvanija). Amplikoni veličine oko 490 bp smatrani su pozitivnom reakcijom za *C. acutatum*, a 450 bp za *C. gloeosporioides*.

5.4.3. Kloniranje sekvenci rDNK-ITS regiona

ITS region (ITS1-5.8S-ITS2) ribozomalne DNK deset reprezentativnih izolata i dva referentna izolata amplifikovan je primenom univerzalnih prajmera (Tabela 4) ITS1 i ITS4 (White i sar., 1990). PCR reakcija za svaki izolat je izvedena u konačnoj zapremini od 25 µl koja je sadržala 2 X Master mix (Fermentas, Litvanija) (0,625 U Taq polymerase, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM svakog dNTP-a), po 1 µl svakog prajmera (0,2 µM) i 1 µl izolovane DNK.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju ITS regiona izolata *Colletotrichum* spp.

Prajmer	Naziv prajmera	Sekvenca 5' – 3'	Literaturni izvor
Forward	ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White i sar. (1990)
Revers	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Kloniranje ITS regiona ribozomalne DNK izvedeno je u PCR aparatu (Eppendorf Master Cycler). Uslovi reakcije bili su sledeći:

- Početna denaturacija DNK: 1,5 minut na 94°C

29 ciklusa:

- Denaturacija: 30 sekundi na 94°C
- Hibridizacija: 30 sekundi na 55°C
- Elongacija: 30 sekundi na 72°C

- Finalna elongacija: 9,5 minuta na 72°C.

PCR produkti su razdvojeni horizontalnom elektroforezom na 1% agaroznom gelu u 1xTBE pufera. Gelovi su obojeni etidijum bromidom i fotografisani na UV iluminatoru. Amplifikovani fragmenti su prečišćeni pomoću kompleta za prečišćavanje: mi-PCR Purification Kit (Metabion International, Nemačka), prema uputstvu proizvođača. Sekvencioniranje dobijenih produkata je izvršeno u Finskoj, u laboratorijama Univerziteta u Helsinkiju, na Institutu za molekularnu medicinu, dvosmerno (3'-5' i 5'-3'), zbog veličine amplifikovanog produkta, kao i radi dobijanja što pouzdanijih analiza sekvenci.

5.4.4. Filogenetska analiza

Nakon provere kvaliteta svake sekvence, izvršeno je poravnavanje sekvenci korišćenjem ClustalW programa (Thompson i sar., 1997), u okviru programskog paketa BioEdit v7.0.5.3 (Hall 1999). U svim analizama sva mesta su se smatrala jednako informativnim. Pored novo dobijenih sekvenci, u analizu su uključene i sekvence preuzete iz Gen Banke i to *C. acutatum* (Broj u Gen Banci: AJ749688) i *C. gloeosporioides* (Broj u Gen Banci: KF053199) kao srodne vrste, kao i sekvenca vrste *Monilinia fructigena* (broj u Gen Banci: HF678389) koja je korišćena kao outgrupa (odstupajuća vrsta). U cilju određivanja filogenetičkih odnosa između analiziranih sekvenci konstruisana su filogenetička stabla korišćenjem metoda maksimalne sličnosti i maksimalne parasimonije, uz bootstrap analizu i konstruisanje konsenzus dendograma pomoću programskog paketa MEGA v5.2 (Tamura i sar. 2011) po modelu K2 (Kimura 2-parameter) bazne supstitucije. Dobijeni dendogrami ocenjeni su sa 1000 sopstvenih replikacija kako bi se testirala stabilnost grananja. Programski paket MEGA v5.2 je takođe korišćen za određivanje genetičke udaljenosti između grupa koje su definisane nakon konstruisanja dendograma.

5.5. Biološka zaštita plodova jabuke od *Colletotrichum* spp.

Mogućnosti biološke zaštite plodova jabuke od prouzrokovača antraknoze *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* ispitana je *in vitro* i *in vivo* na plodovima jabuke sorte zlatni delišes. U ispitivanja je uključeno 10 mikroorganizama (Tabela 5) i 56 komercijalno dostupnih etarskih ulja (Tabela 6). Za mikroorganizme koji su ispoljili visok antifungalni potencijal ispitana je i uticaj skladištenja plodova na niskoj temperaturi na njihovu antifungalnu aktivnost *in vivo*.

Tabela 5. Mikroorganizmi čije je delovanje na izolate *Colletotrichum* spp. ispitano

Mikroorganizam	Izvor
<i>Bacillus subtilis</i> soj N 146	Institut za mikrobiologiju, Nacionalna akademija nauka, Minsk, Belorusija
<i>Bacillus subtilis</i> soj ST 1/III	Komercijalni preparat F-Stop (Bio-ekološki centar, Srbija)
<i>Bacillus subtilis</i> soj QST 713	Komercijalni preparat Serenade (BASF)
<i>Bacillus subtilis</i> soj Č 13	Komercijalni preparat Extrasol (ARRIAM, St. Petersburg, Russia)
Izolati:	
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Katedra za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo
<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	

Tabela 6. Etarska ulja čije je delovanje na izolate *Colletotrichum* spp. ispitano

Etarsko ulje	Broj testiranih, formulisanih ulja*
<i>Lavandula officinalis</i>	6
<i>Matricaria chamomilla</i>	1
<i>Origanum vulgare</i>	5
<i>Salvia officinalis</i>	6
<i>Salvia sclarea</i>	1
<i>Pelargonium graveolens</i>	1
<i>Foeniculum vulgare</i>	5
<i>Pinus nigra</i>	2
<i>Ocimum basilicum</i>	1
<i>Mentha piperita</i>	1
<i>Geraniol</i>	1
<i>Pimpinella anisum</i>	2
<i>Cinnamomum verum</i>	2
<i>Cinnamomum camphora</i>	1
<i>Syzygium aromaticum</i>	1
<i>Thymus vulgaris</i>	1
<i>Juniperus communis</i>	2
<i>Citrus sinensis</i>	1
<i>Eucalyptus globulus</i>	1
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1
<i>Melaleuca alternifolia</i>	2
<i>Aethum graveolens</i>	4
<i>Ruta montana</i>	1
<i>Laurus nobilis</i>	1
<i>Lignum santali</i>	1
<i>Leptospermum scoparium</i>	1
<i>Cymbopogon citratus</i>	1
<i>Carum carvi</i>	1
<i>Coriandrum sativum</i>	1
<i>Helichrysum italicum</i>	1

*Ulja poreklom od iste biljne vrste razlikuju se po geografskom poreklu

5.5.1. Priprema mikroorganizama i radnih tečnosti fungicida za *in vitro* i *in vivo* oglede

U *in vitro* i *in vivo* oglecima primenjene su kultivacione tečnosti mikroorganizama i upoređene sa efektima fungicida Zato 50 WG.

U ogledu u kom je ispitan uticaj skladištenja plodova na niskoj temperaturi na antifungalnu aktivnost mikroorganizama *in vivo*, za sojeve *B. subtilis* ST 1/III, QST 713 i Č 13 primenjeni su komercijalni preparati. Za *B. subtilis* soj N146 za ovu namenu je razvijena probna formulacija u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd – Zemun, i primenjena paralelno sa kultivacionom tečnošću ovog mikroorganizma. Za *S. hygroscopicus* primenjena je kultivaciona tečnost mikroorganizma proizvedena pod optimalnim uslovima. U ovim oglecima, efekti mikroorganizama upoređeni su sa efektima četiri fungicida (Zato 50 WG, Bellis, Clarinet, Merpan 50 WP).

5.5.1.1. Priprema kultivacionih tečnosti izolata *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* i *L. mesenteroides*

Mikroorganizmi *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* i *L. mesenteroides* preuzeti su iz Zbirke mikrobioloških kultura Laboratorije za Biotehnologiju, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu.

Za osvežavanje i umnožavanje mikroorganizama korišćene su podloge čiji sastav je naveden u Tabeli 7.

Tabela 7. Sastav hranljivih podloga za osvežavanje i umnožavanje mikroorganizama

Sastojci podloge	Podloga za osvežavanje [g/l]	Podloga za umnožavanje [g/l]
Glukoza	15,0	15,0
Sojino odmašćeno brašno	10,0	10,0
CaCO ₃	3,0	3,0
NaCl	3,0	3,0
MgSO ₄	0,5	0,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0	1,0
Agar	20,0	-
pH	7,2±0,1	7,2±0,1

Kako bi se obezbedila dovoljna količina mikroorganizma za ispitivanje efekata na *Colletotrichum* spp., inokulum je pripremljen u dve faze:

1. Osvežavanje: trajna kultura je gajena na podlozi za osvežavanje na 27°C u trajanju od 48 h.

2. Nakon osvežavanja, željena količina inokuluma obezbeđena je dvostrukim pasažiranjem mikroorganizma u podlogu za umnožavanje. Druga pasaža zasejana je sa 10% inokuluma proizvedenog prvim pasažiranjem. Inkubacija svake pasaže trajala je 48 h, na 27°C u aerobnim uslovima. Za aeraciju i mešanje kultivacione tečnosti tokom pasažiranja korišćena je rotaciona tresilica pri 150 o/min.

Podloge korišćene za pripremu kultivacionih tečnosti mikroorganizama čiji se efekat ispitivao date su u Tabeli 8. Svaka podloga je zasejana sa 10% pripremljenog inokuluma odgovarajućeg mikroorganizma. Biotehološki proces je trajao 72 h pri temperaturi 26±1°C u aerobnim uslovima. Za aeraciju i mešanje kultivacione tečnosti korišćena je rotaciona tresilica pri 150 o/min.

Tabela 8. Podloge korišćene za pripremu kultivacionih tečnosti mikroorganizama

Mikroorganizam	Podloga
<i>S. hygroscopicus</i>	Hranljivi bujon (Torlak®)
<i>S. aureus</i>	Hranljivi bujon (Torlak®)
<i>S. cerevisiae</i>	Sabouraud maltozni bujon (Torlak®)
<i>B. cereus</i>	Mueller-Hinton bujon (Torlak®)
<i>P. aeruginosa</i>	Hranljivi bujon (Torlak®)
<i>L. mesenteroides</i>	MRS bujon (De Man i sar., 1960)

5.5.1.2. Priprema kultivacionih tečnosti *B. subtilis*, sojevi N 146, ST 1/III, QST 713 i Č 13

B. subtilis soj N 146 gajen je u submerznom kultivacijom u Erlenmeyer tikvicama na rotacionoj tresilici (150 o/min) četiri dana pri temperaturi 28°C u podlozi sledećeg sastava (g/l): melasa - 30, K₂HPO₄ x 3H₂O - 7, KH₂PO₄ - 3, MgSO₄ x 7H₂O - 0,1, (NH₄)₂SO₄ - 1,5, natrijum citrat - 0,5. Ovako pripremljena kultivaciona tečnost korišćena je u svim *in vitro* i *in vivo* ogledima.

Sojevi ST 1/III, QST 713 i Č 13 prekultivisani su iz komercijalnih preparata razređenjem preparata u sterilnoj, destilovanoj vodi i zasejavanjem na MPA (Meso Peptoni Agar) hranljivu podlogu i inkubacijom na 28°C u trajanju 72 h. Sojevi bakterija su još jednom prekultivisani na MPA podlogu i inkubirani pod istim uslovima. Po inkubaciji, sojevi su submerzno kultivisani u podlozi istog sastava kao i soj N 146 i inkubirani pod istim uslovima.

5.5.1.3. Razvoj formulacije *B. subtilis* N 146 za *in vivo* ogled u kome je ispitan uticaj skladištenja plodova na efekte mikroorganizama

B. subtilis N 146 formulisan u obliku suspo emulzije - SE obezbeđen je u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju, Intituta za pesticide i zaštitu životne sredine Beograd-Zemun na sledeći način: kultivaciona tečnost, čija je priprema već opisana, korišćena je kao aktivna materija za razvoj formulacije. Korišćeni su surfaktanti komercijalne čistoće (Ajinomoto OmniChem, Belgium) bez dodatnog prečišćavanja, sojino ulje (proizvođač: Uvita, Srbija) prehrambenog kvaliteta, glicerol (proizvođač: Centrohem, Srbija) i polietilen glikol (Acros Organics, US) čistoće p.a. Formulacija SE dobijena je mešanjem uljne faze (48%), kultivacione tečnosti *B. subtilis* N 146 (45%), glicerola (4,5%) i mešavine surfaktanata (2,5%). Za homogenizaciju je korišćena laboratorijska mešalica Ultra turex pri brzini 1700 o/min, u trajanju od 15 minuta. Razvijena formulacija primenjena je u 5% koncentraciji.

5.5.1.4. Priprema rastvora bioloških i hemijskih fungicida

Bioški preparati koji su korišćeni u *in vivo* ogledu u kojem je ispitan uticaj skladištenja plodova na niskoj temperaturi na antifungalnu aktivnost mikroorganizama prikazani su u Tabeli 9. Preparati su razređeni u sterilnoj, destilovanoj vodi do koncentracije od 1% i homogenizovani na magnetnoj mešalici.

Tabela 9. Biološki preparati korišćeni u *in vivo* ogledu pri ispitivanju uticaja skladištenja plodova na niskoj temperaturi na antifungalnu aktivnost mikroorganizama

Preparat	Aktivna materija	Koncentracija primene
F-Stop	<i>B. subtilis</i> soj ST 1/III	1%
Serenade	<i>B. subtilis</i> soj QST 713	1%
Extrasol	<i>B. subtilis</i> soj Č 13	1%

Hemijski fungicidi koji su korišćeni u *in vitro* i *in vivo* ogledima dati su u Tabeli 10. Fungicidi su primenjeni u koncentracijama preporučenim za praktičnu primenu, razređivanjem u sterilnoj vodi i homogenizovanjem na magnetnoj mešalici.

Tabela 10. Hemijski fungicidi primenjeni u *in vitro* i *in vivo* ogledima

Preparat	Proizvođač	Aktivna materija	Količina / Koncentracija primene
Zato 50 WG	Bayer CropScience	trifloksistrobin	150 g/ha*
Bellis	BASF	boskalid+piraklostrobin	0,8 kg/ha*
Clarinet	Bayer CropScience	pirimetanil+flukvinkonazol	0,15%
Merpan 50WP	Makhteshim Chemical Works Ltd	kaptan	0,3%

*Za proračun potrebne količine preparata propisana količina po hektaru računata je na 500 l vode

U *in vitro* i *in vivo* ogledima primenjen je fungicid Zato 50 WG, koji je registrovan za primenu protiv prouzrokovača truleži jabuke u R. Srbiji.

U *in vivo* ogledu u kojem je ispitivan uticaj skladištenja plodova na niskoj temperaturi na antifungalnu aktivnost mikroorganizama primenjena su četiri fungicida, od kojih su dva registrovana za primenu protiv prouzrokovača truleži jabuke (Zato 50 WG i Bellis). Fungicidi Clarinet i Merpan WP su neretko prisutni u programima zaštite jabuke tokom vegetacije.

5.5.2. *In vitro* ispitivanje aktivnosti mikroorganizama na izolate *Colletotrichum* spp.

Ispitivanja aktivnosti mikroorganizama (*B. subtilis* – sojevi N 146, ST 1/III, QST 713 i Č 13, *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *P. aeruginosa* i *L. mesenteroides*) na *Colletotrichum* spp. vršeno je modifikovanom metodom bunara (Segy, 1983).

U Petri kutije prečnika 85 mm razlivena su dva sloja. Donji sloj činila je 2% KDA podloga zapremine 15 ml. Gornji sloj činio je inokulum koji se sastojao od 1,2% KDA podloge i KDB podloge u kojoj je inkubirana kolonija izolata *Colletotrichum* spp. u trajanju od 48 h na rotacionoj tresilici (150 o/min) i temperaturi 25°C. KDA i KDB podloga su homogenizovane na magnetnoj mešalici (IKA, RH basic 2) u odnosu 65:35. Po 5 ml ovako pripremljenog inokuluma je razliveno u svaku Petri kutiju po očvršćavanju donjeg sloja. U svakoj Petri kutiji aseptično su napravljena tri bunara prečnika 10 mm. Kako bi se ispitali

efekti mikroorganizama ili fungicida (Zato 50 WG) na rast micelije patogena, u svaki bunar je unošeno po 100 µl pripremljene kultivacione tečnosti mikroorganizma ili hemijskog fungicida. U kontroli je u bunare unošena sterilna, destilovana voda.

Svi ogledi su izvedeni u tri ponavljanja (jedna Petri kutija sa tri bunara činila je jedno ponavljanje) i ponovljeni jednom. Aktivnost mikroorganizama testirana je na dva morfološki različita izolata *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i jedan izolat *C. gloeosporioides* (MR-1).

Ocena antifungalne aktivnosti mikroorganizma je vršena po inkubaciji od 72 h na 25°C, merenjem prečnika zone inhibicije rasta micelije (mm) oko bunara.

5.5.3. *In vivo* ispitivanje aktivnosti mikroorganizama na izolate *Colletotrichum* spp.

Antifungalna aktivnost na *Colletotrichum* spp. *in vivo* je ispitana za mikroorganizme koji su ispoljili antagonističko delovanje na izolate u ogedima *in vitro* (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. hygroscopicus*, *B. subtilis* sojevi N 146, ST 1/III, QST 713 i Č 13). Ogledi su izvedeni na plodovima jabuke sorte zlatni delišes, približno iste veličine.

Na površinski sterilisanim plodovima napravljeni su otvori prečnika 4 mm i dubine 3 mm. U otvore je unošeno po 10 µl pripremljene kultivacione tečnosti mikroorganizma ili fungicida. Odmah po tretiranju otvora, fragmenti prečnika 3 mm, sedam dana stare micelije izolata uneti su u otvore tako da micelija naleže direktno na tkivo ploda.

Kao kontrola služili su plodovi jabuke u koje je umesto kultivacionih tečnosti mikroorganizma tj. preparata uneto 10 µl sterilne vode a potom izvršena inokulacija patogenom. Plodovi jabuke u čije otvore su unete kultivacione tečnosti mikroorganizma tj. fungicida nakon čega nije izvršena inokulacija ispitivanim patogenima poslužili su za proveru da li neki od testiranih mikroorganizama ispoljava negativno delovanje na plodove jabuke.

Inokulisani plodovi smešteni su u vlažne komore na sobnu temperaturu.

Ogledi su postavljeni u tri ponavljanja, jedan plod je činio jedno ponavljanje, a na plodu je pravljeno po dva otvora. Ispitan je efekat na dva morfološki različita izolata *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i jedan izolat *C. gloeosporioides* (MR-1). Ogledi su jednom ponovljeni.

Ocena je vršena 14 dana po inokulaciji izolatima *Colletotrichum* spp. merenjem prečnika razvijene nekroze.

5.5.4. Optimizacija uslova kultivacije *S. hygroscopicus* u cilju postizanja maksimalne antifungalne aktivnosti na *Colletotrichum* spp.

Po utvrđivanju najizraženije antifungalne aktivnosti izolata *S. hygroscopicus* među testiranim mikroorganizmima na izolate *Colletotrichum* spp. *in vitro* i *in vivo*, optimizovani su sastav hranljive podloge i trajanje kultivacije kako bi se maksimizovalo antifungalno delovanje proizvodnog mikroorganizma. Ostali uslovi kultivacije *S. hygroscopicus* bili su konstantni (26±1°C; aerobni uslovi - aeracija i mešanje kultivacione tečnosti pri 150 o/min).

U oglecima u kojima je optimizovan sastav hranljive podloge i trajanje kultivacije, antifungalna aktivnost testirana je na dva izolata: *C. acutatum* (HA-3) i *C. gloeosporioides* (MR-1).

Ispitivanje antifungalne aktivnosti kultivacionih tečnosti *in vitro* vršeno je modifikovanom metodom bunara Segy (1983). Svi ogleci su izvedeni u tri ponavljanja. U svim oglecima u kontrolnoj varijanti je korišćena sterilna destilovana voda. *In vivo* potvrda antifungalne aktivnosti mikroorganizma proizvedenog pod utvrđenim, optimalnim uslovima vršena je tako što su na površinski sterilisanim plodovima napravljeni otvori prečnika 4 mm i dubine 3 mm. U otvore je unošeno po 10 µl pripremljene kultivacione tečnosti mikroorganizma, biološkog preparata ili fungicida. Odmah po tretiranju otvora, fragmenti prečnika 3 mm, sedam dana stare micelije izolata uneti su u otvore tako da micelija naleže direktno na tkivo ploda. U kontroli je pre inokulacije u otvore unošeno 10 µl sterilne, destilovane vode.

5.5.4.1. Optimizacija sastava hranljive podloge za kultivaciju *S. hygroscopicus*

Prvi korak optimizacije: variranje izvora ugljenika i azota. Nutrijenti u hranljivim podlogama služe za rast i održavanje života ćelija, kao i za sintezu željenog proizvoda i sporednih proizvoda metabolizma, te se variranjem sastava podloge može značajno uticati na tok kultivacije.

Ugljenik je potreban ćelijama mikroorganizama za sintezu delova ćelije, za sintezu metabolita i kao izvor energije. Brzina rasta mikroorganizama zavisi od izvora ugljenika. Posebna pažnja se poklanja izboru izvora ugljenika i zbog njihovog uticaja na brzinu i intenzitet biosinteze proizvoda metabolizma. Obično se preporučuje da se kao izvori ugljenika koriste različiti polisaharidi (skrob), polihidroksilni alkoholi (glicerol) ili

oligosaharidi (laktoza) koji daju znatno bolji prinos sekundarnih metabolita u odnosu na glukozu i njoj slične izvore ugljenika (Sanchez i Demain, 2002).

Azot je ćeliji mikroorganizma potreban za sintezu aminokiselina, proteina, purinskih i pirimidinskih nukleotida i određenih vitamina. Mikroorganizmi koriste organska jedinjenja sa azotom kao izvor azota samo ako imaju mogućnost da ih razgrade do amonijaka (Glišić, 1980). U podloge za biotehnošku proizvodnju u industrijskim razmerama azot se dodaje u obliku proteina, peptida, purina, pirimidina, amonijaka, uree i nitrata (Pejin, 2003).

Iz gorenavedenih razloga u cilju optimizovanja sastava hranljive podloge za kultivaciju *S. hygroscopicus*, u prvom koraku su simultano varirani izvori ugljenika i azota kako bi se utvrdila interakcija tj. optimalna kombinacija ovih izvora za maksimalnu antifungalnu aktivnost mikroorganizma.

Kao različiti izvori ugljenika u količinama istim kao glukozu (15 g/l) u standardnoj podlozi za umnožavanje, pored glukoze, korišćeni su maltoza i glicerol, dok su kao izvori azota, pored odmašćenog sojinog brašna koji se koristi u standardnoj podlozi za umnožavanje u istoj količini (10 g/l) ispitani i kukuruzno brašno, ekstrakt kvasca i amonijum sulfat.

Drugi korak optimizacije: variranje količina ugljenika, azota i fosfora. U prvom koraku optimizacije, glicerol se pokazao kao optimalan izvor ugljenika, a ekstrakt kvasca kao izvor azota te je optimizovana količina ovih sastojaka hranljive podloge u cilju maksimizacije antifungalne aktivnosti kultivacione tečnosti *S. hygroscopicus*.

Fosfor čini oko 3% suve materije ćelije i prisutan je u aminokiselinama i ćelijskom zidu Gram pozitivnih bakterija (Mojović, 2008). U ćelijama mikroorganizama nalazi se u obliku fosfata, koji najvećim delom ulaze u sastav nukleotida i nukleinskih kiselina, te je stoga prisustvo fosfata u podlozi neophodno za rast mikroorganizama. Fosfor je ključni element u regulaciji ćelijskog metabolizma. Za proizvodnju nekih sekundarnih metabolita, sadržaj fosfata u podlozi treba da bude manji od 1mM (Mojović, 2008) dok u nekim slučajevima produkcija ciljanih metabolita nije inhibirana većim količinama fosfata u hranljivoj podlozi. S obzirom na značaj fosfata, u drugom koraku optimizacije varirana je i njihova ukupna količina u podlozi.

Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog plana ključan je korak u procesu optimizacije. Za planiranje ogleđa korišćen je Box-Behnkenov eksperimentalni plan, a za optimizaciju sastava podloge softverski paket DESIGN-EXPERT 7.1.5. (Design-Expert 7.1.5, probna verzija, StatEase, Inc., USA). Box-Behnkenov plan ima prednost nad ostalim u pogledu

efikasnosti, odnosno odnosa između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broja eksperimenata koje potrebno izvesti. Kada se za modelovanje primenjuje kvadratni model odzivne površine, neophodno je odrediti deset koeficijenata. Za opis odzivnih funkcija Y_1 - poluprečnik inhibicije *C. acutatum*, mm i Y_2 - poluprečnik inhibicije *C. gloeosporioides*, mm, primenjen je polinom drugog reda:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

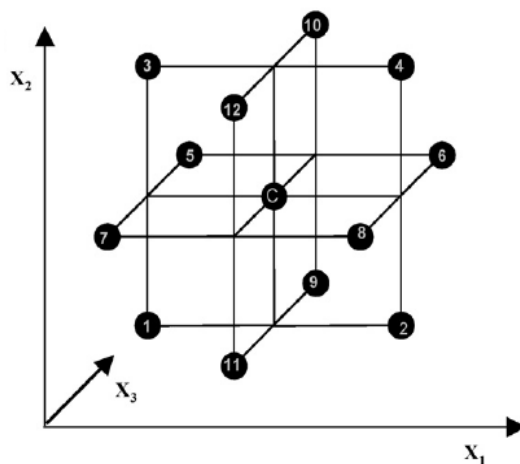
gde su:

- b_0 – odsečak,
- b_1, b_2, b_3 - linearni koeficijenti,
- b_{11}, b_{22}, b_{33} - kvadratni koeficijenti i
- b_{12}, b_{13}, b_{23} - koeficijenti interakcije.

Ispitivan je uticaj sledećih faktora pri navedenim nivoima:

- X_1 : sadržaj glicerola (g/l): 10; 15 i 20;
- X_2 : sadržaj ekstrakta kvasca (g/l): 5; 17,5 i 30;
- X_3 : sadržaj fosfata (g/l): 0,5; 1 i 1,5 (odnos $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4 : \text{K}_2\text{HPO}_4 = 1:2$).

Broj eksperimenata (n) za dobijanje kvadratnog modela dat je izrazom $n = 2 \cdot k \cdot (k - 1) + C$, gde su k broj eksperimentalnih faktora (promenljivih), a C je broj ponavljanja u centralnoj tački. $C=3$ (Slika 1).



Slika 1. Raspored tačaka Box-Behnkenovog eksperimentalnog plana

Statistička obrada eksperimentalnih podataka urađena je u programu STATISTICA 12.0. Značajnost uticaja svakog od faktora kao i njihovih interakcija određivana je poređenjem p -vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini. Površine odziva (RSM) crtane su tako što je jedan od parametara imao konstantnu vrednost iz centra plana, dok su preostala dva parametra varirana.

Nakon što je statističkom obradom eksperimentalnih rezultata utvrđeno koji sastav podloge obezbeđuje najveće zone inhibicije rasta (odzive) za izolat *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, pristupljeno je kompromisnoj optimizaciji, tj. definisanju sastava podloge pri kojem će zone inhibicije rasta tj. odzivi biti što veći za oba izolata, a ne pojedinačnoj optimizaciji sastava za svaki izolat. Kompromisna optimizacija izvršena je pomoću softverskog paketa DESIGN-EXPERT 7.1.5. (Design-Expert 7.1.5, probna verzija, StatEase, Inc., USA) metodom željene funkcije (D). Generalni pristup sastoji se u konvertovanju individualnih odziva, Y_1 i Y_2 , u individualne željene funkcije čije vrednosti se kreću od 0 do 1. Vrednost individualne željene funkcije "0" predstavlja najlošiju vrednost, dok vrednost "1" predstavlja najbolju vrednost posmatranog odziva. Ukupna željena funkcija (D) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija: d_1 – maksimalna zona inhibicije za izolat *C. acutatum* i d_2 – maksimalna zona inhibicije za izolat *C. gloeosporioides*. Optimalne vrednosti eksperimentalnih parametara određuju se iz vrednosti pojedinačnih željenih funkcija koje optimizuju ukupnu željenu funkciju. Programom definisan optimalni sastav podloge i predviđene vrednosti poluprečnika zone inhibicije rasta svakog izolata koje će se dobiti kultivacijom mikroorganizma u podlozi optimalnog sastava, eksperimentalno su proverene radi validacije dobijenih rezultata provere pouzdanosti predikcije inhibicije koja se može postići primenom podloge definisanog sastava. Takođe, uticaj kultivacije *S. hygroscopicus* u podlozi optimalnog sastava na inhibiciju *Colletotrichum* spp. proveren je *in vivo*. Efikasnost ovako proizvedenog agensa izračunata je po sledećoj formuli:

$$\text{Efikasnost} = \frac{K - T}{K} \times 100 (\%)$$

K – prečnik nekroze razvijene na netretiranim plodovima

T – prečnik nekroze razvijene na plodovima tretiranim sa *S. hygroscopicus*

5.5.4.2. Utvrđivanje načina delovanja i optimizacija trajanja kultivacije

Za potrebe ispitivanja načina delovanja i optimalnog trajanja kultivacije, za kultivaciju *S. hygroscopicus* korišćena je optimizovana podloga za koju je utvrđeno da obezbeđuje maksimalnu antifungalnu aktivnost.

Način delovanja utvrđen je u *in vitro* i *in vivo* ogledima poređenjem antifungalne aktivnosti kultivacione tečnosti koja je sadržala ćelije *S. hygroscopicus* i supernatanta kultivacione tečnosti, bez ćelija mikroorganizma. Odstranjivanje ćelija mikroorganizma (razdvajanje tečne i čvrste faze) postignuto je centrifugiranjem kultivacione tečnosti na ultracentrifugi (Eppendorf 5804) pri 10.000 G u trajanju od 10 min na 4°C.

Određivanje optimalnog trajanja kultivacije *S. hygrosopicus* kako bi se postigla maksimalna antifungalna aktivnost, vršeno je gajenjem mikroorganizma u trajanju od deset dana i testiranjem antifungalnih efekata termički tretiranog i netretiranog supernatanta kultivacione tečnosti *in vitro* svaki dan od nultog do 10. dana kultivacije. Termičko tretiranje dela supernatanta kultivacione tečnosti vršeno u vodenom kupatilu na 100°C u trajanju od 45 min, dok je drugi deo ostao netretiran. Na ovaj način je utvrđeno da li antifungalnu aktivnost pokazuje neki od termostabilnih ili termolabilnih metabolita mikroorganizma. Kultivaciona tečnost je uzorkovana svakodnevno, u isto vreme.

5.5.5. Uticaj niskih temperatura na aktivnost kultivacionih tečnosti mikroorganizama i formulisanih biopreparata na *Colletotrichum* spp. *in vivo*

Uticaj skladištenja plodova jabuke na niskoj temperaturi na antifungalnu aktivnost mikroorganizama *in vivo* ispitan je tako što su na površinski sterilisanim plodovima napravljeni otvori prečnika 4 mm i dubine 3 mm. U otvore je unošeno po 10 µl pripremljene kultivacione tečnosti mikroorganizma, biološkog preparata ili fungicida. Odmah po tretiranju otvora, fragmenti prečnika 3 mm, sedam dana stare micelije izolata uneti su u otvore tako da micelija naleže direktno na tkivo ploda. U kontroli je u otvore uneta sterilna, destilovana voda, a potom izvršena inokulacija. Plodovi jabuke u čije otvore su unete kultivacione tečnosti mikroorganizma, biološkog preparata ili fungicida nakon čega nije izvršena inokulacija ispitivanim patogenima, poslužili su da se utvrdi da li primenjeni tretmani imaju negativan efekat na plodove jabuka.

U slučaju mikroorganizma *S. hygrosopicus*, primenjena je kultivaciona tečnost iz koje su odstranjene ćelije proizvodnog mikroorganizma i koja je proizvedena pod prethodno utvrđenim optimalnim uslovima (sastav podloge, trajanje kultivacije). Za sojeve *B. subtilis* ST 1/III, QST 713 i Č 13 primenjeni su formulisani biološki preparati u koncentraciji od 1%. Za soj N 146 ispitano je delovanje kultivacione tečnosti mikroorganizma i razvijene formulacije ovog soja (SE) u koncentraciji od 5%.

Po tretiranju i inokulaciji patogenima, plodovi su smešteni u vlažnu komoru na sobnu temperaturu u trajanju od 14 dana i u hladnjaču sa normalnom atmosferom na 2±0,5°C u trajanju od dva meseca.

Ogled je izveden u tri ponavljanja. Jedan plod sa po dva otvora predstavljao je jedno ponavljanje. Ispitana je aktivnost na dva morfološki različita izolata *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i jedan izolat *C. gloeosporioides* (MR-1).

Ocena je vršena nakon 14 dana inkubacije plodova na sobnoj temperaturi. Plodovi iz hladnjače ocenjeni su po iznošenju iz hladnjače i nakon 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi.

5.5.6. Delovanje isparljive faze etarskih ulja na izolate *Colletotrichum* spp.

Antifungalna aktivnost etarskih ulja je ispitana na KDA podlozi u Petri kutijama prečnika 90 mm. Podloge su inokulisane zesejavanjem fragmenata micelije izolata uzetih sa ivice kulture starosti sedam dana. Ulja su primenjena u vidu kapi nanete na unutrašnju stranu poklopca Petri kutije u koncentracijama 0,16; 0,08; 0,04 i 0,02 $\mu\text{l/ml}$ vazduha. Odmah nakon nanošenja ulja Petri kutije su postavljene u obrnut položaj i zatvorene parafilmom kako bi se sprečio gubitak pare. Izlaganje izolata dejstvu para proučavanih ulja trajalo je sedam dana, pri temperaturi 23°C. Ogled je izveden u četiri ponavljanja, a kao kontrolna varijanta korišćeni su izolati gljiva gajeni u identičnim uslovima bez opisanog tretmana. Sedam dana nakon tretmana, procenjeno je da li su etarska ulja primenjena u određenoj koncentraciji potpuno inhibirala rast izolata. Najniža koncentracija sa efektom potpune inhibicije rasta izolata definisana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Nakon ocene, Petri kutije u kojima je rast izolata bio potpuno zaustavljen, otvarane su i provetravane pri struji vazduha u laminarnoj komori u trajanju od 30 minuta, radi uklanjanja gasovite faze ulja i određivanja letalnog efekta. Smatrano je da određena koncentracija ulja ispoljava letalan efekat ako sedam dana posle provetravanja nije zabeležen inicijalni rast izolata. Najniža koncentracija sa letalnim efektom definisana je kao minimalna letalna koncentracija (MLC).

Za etarska ulja za koja su utvrđene najniže vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne letalne koncentracije (MLC) određen je i minimalni period ekspozicije za datu koncentraciju ulja kojom se postiže letalan efekat. Dva izolata *C. acutatum* (MI-21 i Č-13) i jedan izolat *C. gloeosporioides* (AVO 374B) izlagana su parama etarskih ulja tokom perioda od jedan do sedam dana na prethodno opisan način. Najkraći period ekspozicije pri određenoj koncentraciji ulja na kojoj je zabeležen letalni efekat utvrđen je kao minimalni period ekspozicije.

MIC i MLC utvrđene su za 56 komercijalno dostupnih etarskih ulja. Dok je minimalni inhibicioni period utvrđen za četiri ulja koja su ispoljila najjaču efikasnost.

Ogledi su izvedeni u tri ponavljanja, jedna Petri kutija predstavljala je jedno ponavljanje. Svi ogledi su jednom ponovljeni.

5.6. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka vršena je u softverstom paketu *Statistica* 12.0 primenom Analize varijanse (ANOVA) i Dankanovim testom (u intervalu poverenja 95%).

Poravnavanje ITS sekvenci izvršeno je pomoću ClustalW programa, u okviru programskog paketa BioEdit. Statistička obrada ITS sekvenci izolata u cilju izrade filogenetskog stabla izvršena je metodom Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood Evolutionary Distance and Miximum Parsimony Methods u okviru softverskog paketa MEGA 5 (Tamura i sar., 2011). U istom programskom paketu izvršen je proračun genetičke udaljenosti klastera dobijenih izradom filogenetskih stabala.

Za planiranje optimizacionih ogleda korišćen je Box-Benkenov plana. Dobijeni rezultati obrađeni su primenom Metode odzivne površine (RSM, *engl*: Response Surface Methodology) u softverstom paketu *Statistica* 12.0. Za optimizaciju faktora, primenjena je metoda željene funkcije u softverskom paketu DESIGN-EXPERT 7.1.5. (Design-Expert 7.1.5, probna verzija, StatEase, Inc., USA).

6. REZULTATI

6.1. Simptomi antraknoze, izolacija patogena, izdvajanje monosporijalnih izolata

Uzorci jabuka sa simptomima truleži prikupljeni su iz 18 objekata. U svim objektima u kojima je vršeno uzorkovanje, utvrđeno je prisustvo plodova sa simptomima sva četiri tipa simptoma truleži ploda, kako unutar hladnog prostora, tako i među plodovima spremnim za iznošenje na tržište. Primećeno je da je u svim objektima dominirao treći tip simptoma (svetlo mrke, delimično ulegnute pege, vodenastog izgleda, obolelo tkivo se lako odvaja od zdravog tkiva ploda, sa ili bez vidljive sporulacije plavo-zelene boje, ustajalog mirisa, različite veličine), a zatim četvrti tip (tamno mrke do crne pege, različite veličine, sunderaste konzistencije). Prvi (naborane, ulegle, mrke pege, čvršće konzistencije, prečnika preko 1,5 cm) i drugi (sitne, svetlo i tamno mrke pege, čvrste konzistencije, prečnika oko 0,5 cm) tip simptoma bili su slabije zastupljeni.

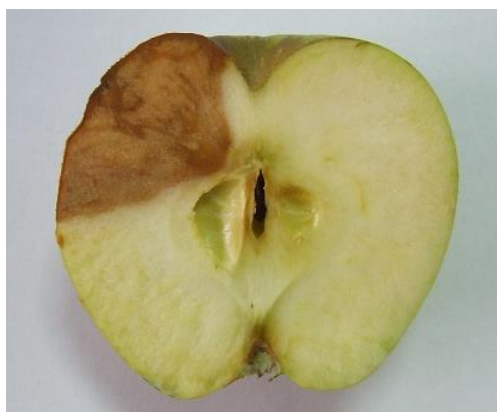
Praćenjem izgleda tipova simptoma koji su upućivali na prisustvo *Colletotrichum* spp. (prvi i drugi tip) ustanovljeno je da se početni simptomi antraknoze ispoljavaju u vidu sitnih, okruglastih, pretežno svetlo mrkih pega, ponekad sa vidljivim, tamnijim koncentričnim krugovima (Slika 2). Na plodovima sa zarazom u poodmaklom razvoju primećuju se velike pege sa ulegnutim tkivom koje poprima tamnu boju i naboran izgled. Na površini obolelog tkiva na nekim plodovima vidljiva su plodonosna tela – acervule (razbacane ili koncentrično raspoređene od centra ka obodu pege) i obilna sporulacija u vidu želatinoznog krem do narandžastog matriksa (Slika 3). Na preseku plodova, obolelo tkivo se širi u obliku latiničnog slova „V“ (Slika 4).



Slika 2. Početni simptom antraknoze na plodu jabuke sorte Modi i Jonagored (lokalitet: Čelarevo i Kać, 2012), iz plodova izolovani izolati Č-2 i K-4



Slika 3. Vidljiva sporulacija na ulegnutom tkivu koje poprima tamnu boju na plodu jabuke sorte Ajdared (Hajdukovo, 2012), iz ploda izolovan izolat HA-3



Slika 4. Poprečni presek ploda inficiranog sa *Colletotrichum* spp. širenje nekrotičnog tkiva u obliku latiničnog slova „V“

Iz uzorkovanih plodova tokom četiri godine dobijeno je 377 izolata fitopatogenih gljiva. Za veliki broj izolata se na osnovu izgleda kolonija i spora moglo sa sigurnošću zaključiti da nisu pripadnici roda *Colletotrichum* spp. Ipak, proverena je patogenost i ovih izolata kako bi se utvrdila zastupljenost *Colletotrichum* spp. među fitopatogenim gljivama, prouzrokovateljima truleži plodova jabuke.

Izolati su presejani na KDA podlogu i dobijene su čiste kulture. Među dobijenim čistim kulturama, vizuelnim pregledom i mikroskopiranjem izdvojeni su izolati koji su osnovnim karakteristikama odgovarali *Colletotrichum* spp. Od ovih izolata odabrani su reprezentativni, i od 33 izolata sačinjene su monosporijalne kulture. Monosporijalni izolati poreklom su iz 17 objekata (Tabela 11).

Tabela 11. Pregled formirane kolekcije monosporijalnih izolata

Izolat	Godina izolacije	Sorta jabuke	Lokalitet
BV-4	2012	Ajdared	Bački Vinogradi
BV-6		Jonagored	
BV-11		Ajdared	
HA-3	2012	Ajdared	Hajdukovo
TV-5	2012	Jonagored	Tavankut
TV-2		Jonagored	
Š-1	2010	Ajdared	Šabac
KU-1	2011	Ajdared	Kukujevci
KU-14	2012		
B-7	2012	Ajdared	Banoštor
B-4			
MR-1	2012	Crveni Delišeš	Mala Remeta
MR-10		Greni Smit	
MR-317			
Č-2	2012	Ajdared	Čelarevo
Č-3	2012		
Č-31	2011		
Č-30	2011		
Č-13	2011		
Č-14	2011		
LP-8	2013		
LP-9			
ME-7	2012	Ajdared	Novi Sad „Merkator“
UN-11	2012	Ajdared	Novi Sad „Univerexport“
I-7	2012	Zlatni delišeš	Novi Sad „Idea“
K-4	2012	Jonagored	Kač
R-2	2010	Ajdared	Radmilovac
R-1			
SB-1	2012	Greni Smit	Soko Banja
SB-12		Ajdared	
MI-23	2010	Ajdared	Mirosljci-Arilje
MI-21			
UZ-107	2010	Ajdared	Uzići-Užice

6.2. Patogenost izolata i formiranje kolekcije *Colletotrichum* spp.

Za sve izolate je proverena patogenost na plodovima jabuke, nakon čega su se izdvojili fitopatogeni izolati koji su na veštački inokulisanim plodovima prouzrokovali simptome koji odgovaraj simptomima na prirodno zaraženim plodovima.

Po proveru patogenosti utvrđeno je da je tokom 2010. godine od 146 uzorkovanih plodova, izolovano 90 fitopatogenih gljiva od kojih je 7,8% iz roda *Colletotrichum* spp. U 2011. godini sakupljeno je 92 ploda, iz 63 su izolovane fitopatogene gljive od kojih 7,9% pripada rodu *Colletotrichum*. Tokom 2012. godine od 307 plodova, iz 200 su izolovane fitopatogene gljive a 10% čini rod *Colletotrichum*. U 2013. godini uzorkovan je 31 plod, fitopatogene gljive su izolovane iz 24 ploda pri čemu je zastupljenost *Colletotrichum* spp. 8,3%. Najčešća sorta jabuke iz čijih plodova su izolovane *Colletotrichum* spp. je sorta ajdared.

Za odabrana 33 monosporijalna izolata koja vizuelno odgovaraju *Colletotrichum* spp. je ponovljena provera patogenosti, izvršena reizolacija i proverena patogenost reizolata. Utvrđeno je da izgledi kolonija dobijenih reizolata u potpunosti odgovaraju izgledu kolonija izvornih izolata. Takođe, uočeno je da simptomi razvijeni na plodovima veštački inokulisanim sa reizolatima odgovaraju simptomima dobijenim veštačkom inokulacijom plodova sa izvornim izolatima.

Prilikom provere patogenosti 33 monosporijalna izolata *Colletotrichum* spp., i dva referentna izolata, utvrđeno je da svi izolati sedam dana nakon inokulacije uzrokuju pojavu naboranih, uleglih, braon pega, čvršće konzistencije (Slika 5). U većini slučajeva 14. dana na svim plodovima dolazi do pojave acervula, s tim što je ova pojava mnogo slabije izražena kod izolata MR-1, BV-4, Č-2, SB-1, TV-2 kao i referentnih izolata TUT 137A i AVO 374B. Acervule su raspoređene ili u vidu koncentričnih krugova, ili razbacane, i nije utvrđena pravilnost rasporeda acervula za izolate. Iz acervula curi krem do narandžasti matriks sa konidijama gljive (Slika 6).

Na kontrolnim plodovima nije došlo do pojave simptoma bolesti.



Slika 5. Provera patogenosti dobijenih izolata na plodovima jabuke sorte zlatni delišes



Slika 6. Pojava želatinoznog, narandžastog matriksa sa konidijama gljive koji curi iz acervula

Po isteku 19 dana od inokulacije na plodovima su mereni prečnik nekroze (kolonizacija egzokarpa ploda) i dubina nekroze (kolonizacija mezokarpa ploda) (mm). Rezultati jednofaktorijske analize varijanse (Tabele 12 i 13) dobijenih vrednosti za ispitivane parametre grafički su prikazani (Grafikoni 1 i 2). Homogene grupe izolata i značajnost razlika utvrđeni su Dankanovim testom za interval poverenja 95% (Tabele 51 i 52 u Prilogu).

Tabela 12. Jednofaktorijska analiza varijanse prečnika nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke sa izolatima *Colletotrichum* spp.

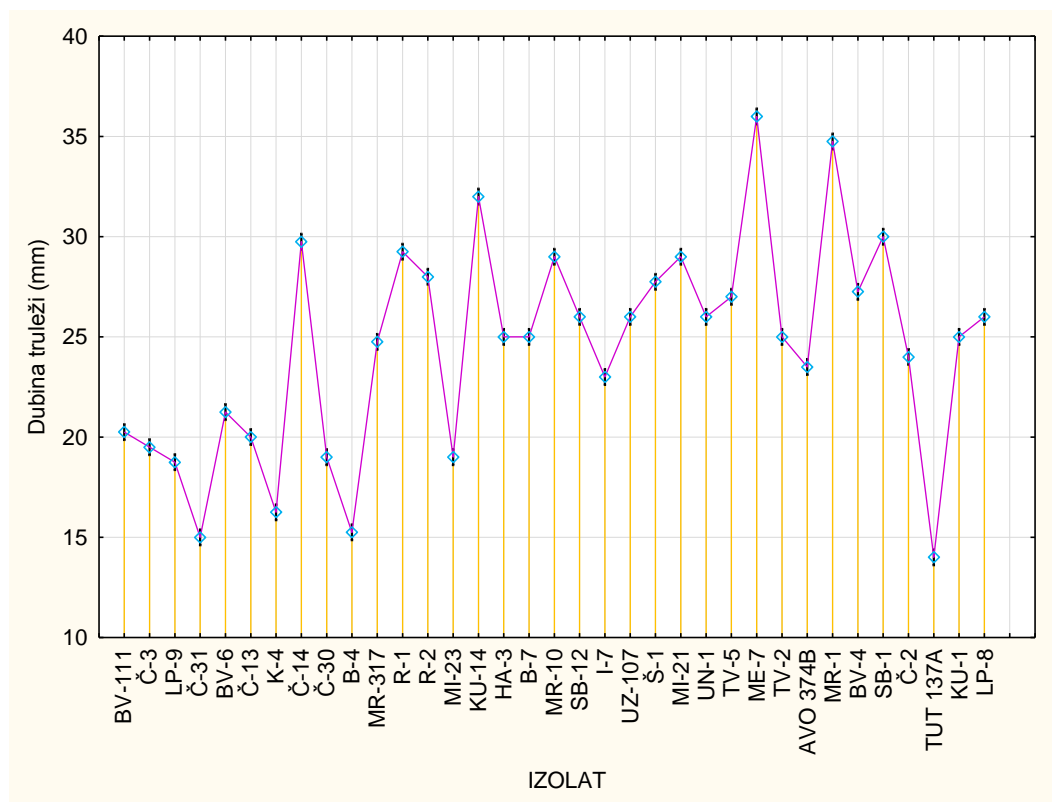
Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	p
Izolati	6069,6	34	178,5	10,89	0,00**
Greška	1721,0	105	16,4	-	-

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Tabela 13. Jednofaktorijalna analiza varijanse dubine nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke sa izolatima *Colletotrichum* spp.

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	p
Izolati	3944,74	34	116,02	749,7	0,00**
Greška	16,25	105	0,15		-

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)



Grafikon 2. Dubina nekroze na plodovima jabuke 19 dana posle inokulacije izolatima *Colletotrichum* spp. (crne vertikalne linije - interval poverenja 95%)

Kada je u pitanju kolonizacija mezokarpa ploda jabuke, izolat koji ispoljava najjaču sposobnost kolonizacije je izolat ME-7 (Slika 8), na statistički značajno višem nivou u odnosu na sve ostale testirane izolate. Prosečna dnevna brzina kolonizacije mezokarpa ploda jabuke za ovaj izolat iznosi 1,9 mm, dok se za preostale izolate kreće u opsegu od 0,74 do 1,83 mm.

Budući da izolat ME-7 predstavlja jedan od izolata koji su na statistički najvišem nivou kada je u pitanju kolonizacija egzokarpa ploda, kao i da je izolat sa statistički značajno

najjačom sposobnošću kolonizacije mezokarpa, može se smatrati izolatom koji generalno ispoljava najjaču patogenost, odnosno sposobnost kolonizacije ploda jabuke.

Manji broj nehomogenih grupa utvrđen je za parametar prečnika nekroze (17 nehomogenih grupa) u odnosu na parametar dubine nekroze (25 nehomogenih grupa). Ovaj podatak upućuje na veću varijabilnost među izolatima u sposobnosti kolonizacije mezokarpa u odnosu na kolonizaciju egzokarpa ploda jabuke.



Slika 8. Dubina nekroze na plodu jabuke sorte zlatni delišes posle 19 dana inkubacije na sobnoj temperaturi (izolat ME-7)

Po dokazanoj patogenosti, ukupno 33 monosporijalna izolata i četiri morfološki reprezentativna reizolata (rHA-3, rK-4, rČ-3 i rMR-1) prekulivisani su na kosu KDA podlogu i čuvaju se u frižideru na temperaturi od 3-4°C. Ovako formirana kolekcija *Colletotrichum* spp. se presejava na svakih šest meseci. Za jedan deo monosporijalnih izolata obezbeđeno je dugoročno čuvanje u 20% glicerolu na - 80°C (Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun).

6.2.1. Uticaj uslova skladištenja plodova jabuke na patogenost *Colletotrichum* spp.

Na plodovima jabuke veštački inokulisanim izolatima *Colletotrichum* spp. iz morfološke grupe I (HA-3), II (K-4) i IV (MR-1) ne dolazi do razvoja simptoma tokom skladištenja na temperaturi od $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ (tri nedelje), kao ni u ULO hladnjači (dva meseca) (Slika 9) i u hladnjači sa normalnom atmosferom (šest meseci). Takođe, pojava simptoma izostaje i kod izolata I (HA-3) i II morfološke grupe (K-4) tokom tri nedelje skladištenja na temperaturi od $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. Pod svim ispitanim uslovima skladištenja ne dolazi do pojave simptoma na kontrolnim plodovima.

Po isteku perioda skladištenja, plodovi su dodatno inkubirani na sobnoj temperaturi ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) 21 dan. Uticaj uslova skladištenja i izolata kojima je vršena veštačka inokulacija posle 21 dan inkubacije na sobnoj temperaturi na širenje nekroze je značajan ($p < 0,01$) (Tabela 14). Izolat predstavlja najveći izvor variranja ($S = 90\ 760,5$).

Tablela 14. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika nekroze na plodovima jabuke veštački inokulisanim sa izolatima *Colletotrichum* spp. i skladištenim u različitim uslovima nakon tri nedelje inkubacije na sobnoj temperaturi

Izvor varanja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	P
Izolat	90 760,5	3	30 253,5	937,08	0,00**
Uslovi skladištenja	64 627,1	4	16 156,8	500,44	0,00**
Izolat*Uslovi skladištenja	39 905,9	12	3 325,5	103,00	0,00**
Greška	5 811,3	180	32,3		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Značajnost razlika (Dankanov test) između prečnika nekroze uzrokovane različitim izolatima 21 dan nakon inkubacije različito skladištenih plodova na sobnoj temperaturi prikazana je u Tabeli 15. Na svim plodovima na kojima su, nezavisno od uslova skladištenja, simptomi uočeni nakon inkubacije od 21 dan na sobnoj temperaturi, do pojave prvih simptoma dolazi nakon četiri dana inkubacije. Na inokulisanim plodovima koji su od početka skladišteni na sobnoj temperaturi ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), do pojave simptoma dolazi četvrtog dana od inokulacije. Na kontrolnim plodovima inokulisanim sterilnom KDA podlogom nije uočena pojava bilo kakvih simptoma 21 dan posle inkubacije na sobnoj temperaturi nakon skladištenja pod različitim uslovima.

Statistički značajno najveći prečnik nekroze registrovan je za izolat II morfološke grupe (K-4) posle tri nedelje skladištenja na $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ i tri nedelje inkubacije na sobnoj temperaturi (Slika 10).

Skladištenje plodova u ULO hladnjači atmosferom i hladnjači sa normalnom atmosferom (dva i šest meseci, respektivno) uzrokuje statistički značajno manji prečnik nekroze nakon 21 dan inkubacije plodova na sobnoj temperaturi u odnosu na prečnike nekroze na plodovima koji su odmah nakon inokulacije inkubirani na sobnoj temperaturi u istom vremenskom periodu (osim kod izolata I morfološke grupe (HA-3) gde ova razlika nije statistički značajna).

Generalno, skladištenje plodova tri nedelje na temperaturi $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ dovodi do statistički značajno većeg prečnika nekroze kod sva tri ispitivana izolata nakon 21 dana inkubacije na sobnoj temperaturi u odnosu na prečnik nekroze uzrokovan sa sva tri testirana izolata na plodovima koji su odmah nakon inokulacije inkubirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 21 dan. Pojava simptoma nakon inkubacije na sobnoj temperaturi izostaje na plodovima inokulisanim izolatom MR-1 koji su skladišteni u oba tipa hladnjača, dok na plodovima inokulisanim izolatom HA-3 pojava simptoma izostaje na plodovima skladištenim na $35\pm 1^{\circ}\text{C}$.

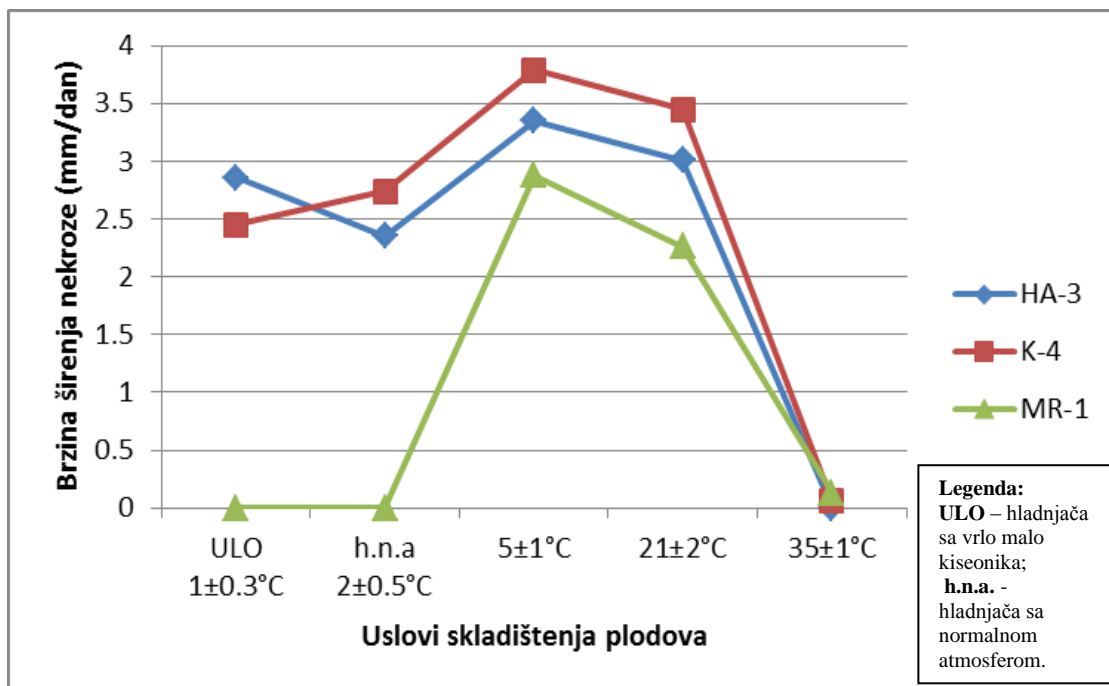
Tabela 15. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika nekroze ($\pm\text{Sd}$) na veštački inokulisanim plodovima jabuke izolatima *Colletotrichum* spp. skladištenim pod različitim uslovima, posle 21 dan inkubacije na sobnoj temperaturi ($21-23^{\circ}\text{C}$)

Uslovi skladištenja	Trajanje skladištenja	Izolat	Srednja vrednost prečnika nekroze (mm) $\pm\text{Sd}$
ULO $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$	Dva meseca	HA-3	60,2 $\pm 6,3$ cd
		K-4	51,6 $\pm 3,8$ b
		MR-1	0,0 $\pm 0,0$ a
		Kontrola	0,0 $\pm 0,0$ a
h.n.a. $2\pm 0,5^{\circ}\text{C}$	Šest meseci	HA-3	49,5 $\pm 3,6$ b
		K-4	57,6 $\pm 3,7$ c
		MR-1	0,0 $\pm 0,0$ a
		Kontrola	0,0 $\pm 0,0$ a
$5\pm 1^{\circ}\text{C}$	21 dan	HA-3	70,5 $\pm 7,9$ e
		K-4	79,6 $\pm 7,2$ f
		MR-1	60,6 ± 4 cd
		Kontrola	0,0 $\pm 0,0$ a
$21\pm 2^{\circ}\text{C}$	21 dan	HA-3	63,4 $\pm 7,5$ d
		K-4	72,5 ± 4 e
		MR-1	47,5 ± 19 b
		Kontrola	0,0 $\pm 0,0$ a
$35\pm 1^{\circ}\text{C}$	21 dan	HA-3	0,0 $\pm 0,0$ a
		K-4	1,3 $\pm 0,8$ a
		MR-1	2,8 $\pm 1,0$ a
		Kontrola	0,0 $\pm 0,0$ a

*ULO – (Ultra Low Oxygen) – hladnjača sa vrlo malo kiseonika (8% O₂ i 1% CO₂); h.n.a. - hladnjača sa normalnom atmosferom

**Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; ($\pm\text{Sd}$) – standardna devijacija

Brzina širenja nekroze (mm/dan) posle 21 dan inkubacije na sobnoj temperaturi različito skladištenih plodova predstavljena grafički (Grafikon 3).

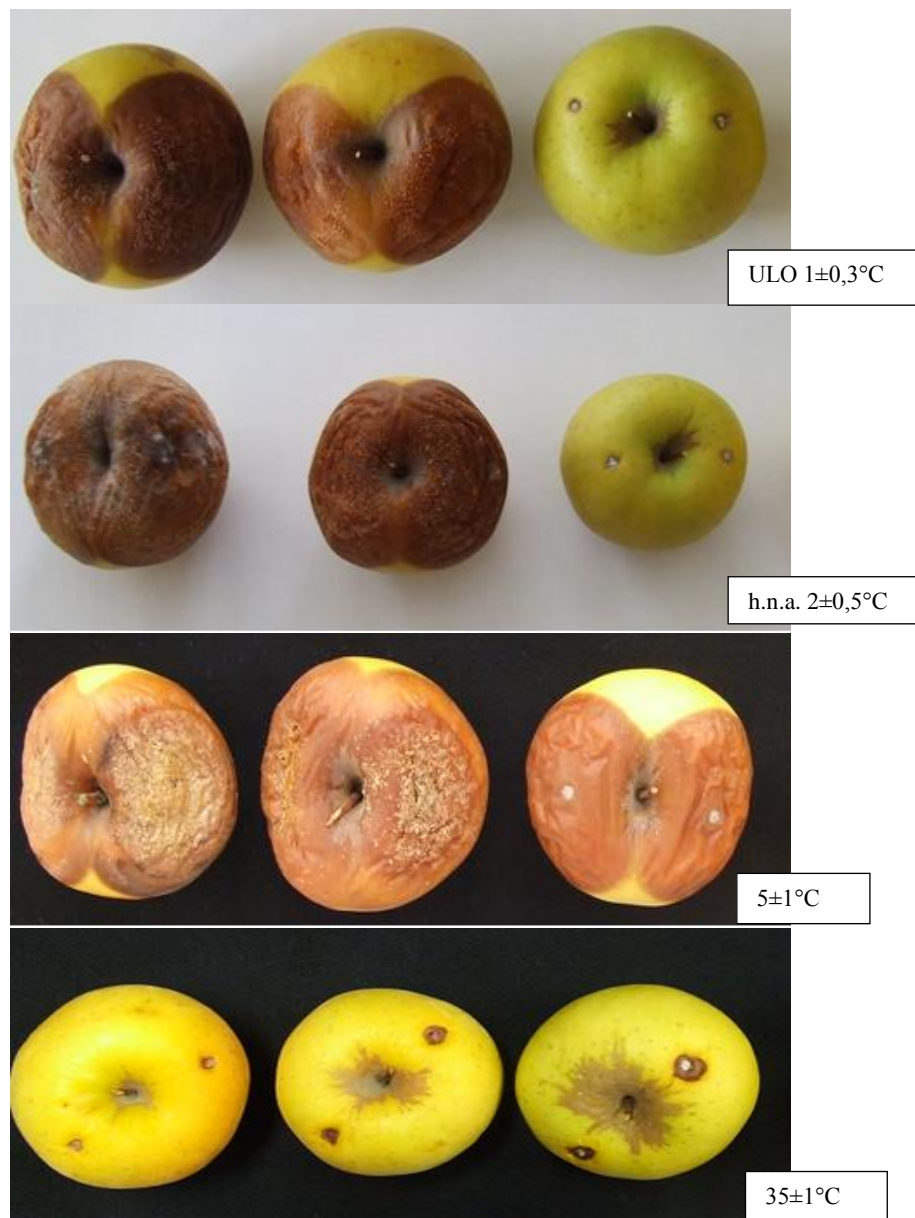


Grafikon 3. Prosečna dnevna brzina širenja nekroze (mm) nakon tri nedelje inkubacije različito čuvanih, veštački inokulisanih plodova na sobnoj temperaturi.

Na plodovima skladištenim na temperaturi 35±1°C uočen je značajan gubitak vode i smežuranje pokožice ploda.



Slika 9. Veštački inokulisani plodovi posle dva meseca u ULO hladnjači – hladnjača sa vrlo malo kiseonika (sa leva na desno: HA-3, K-4 i MR-1)



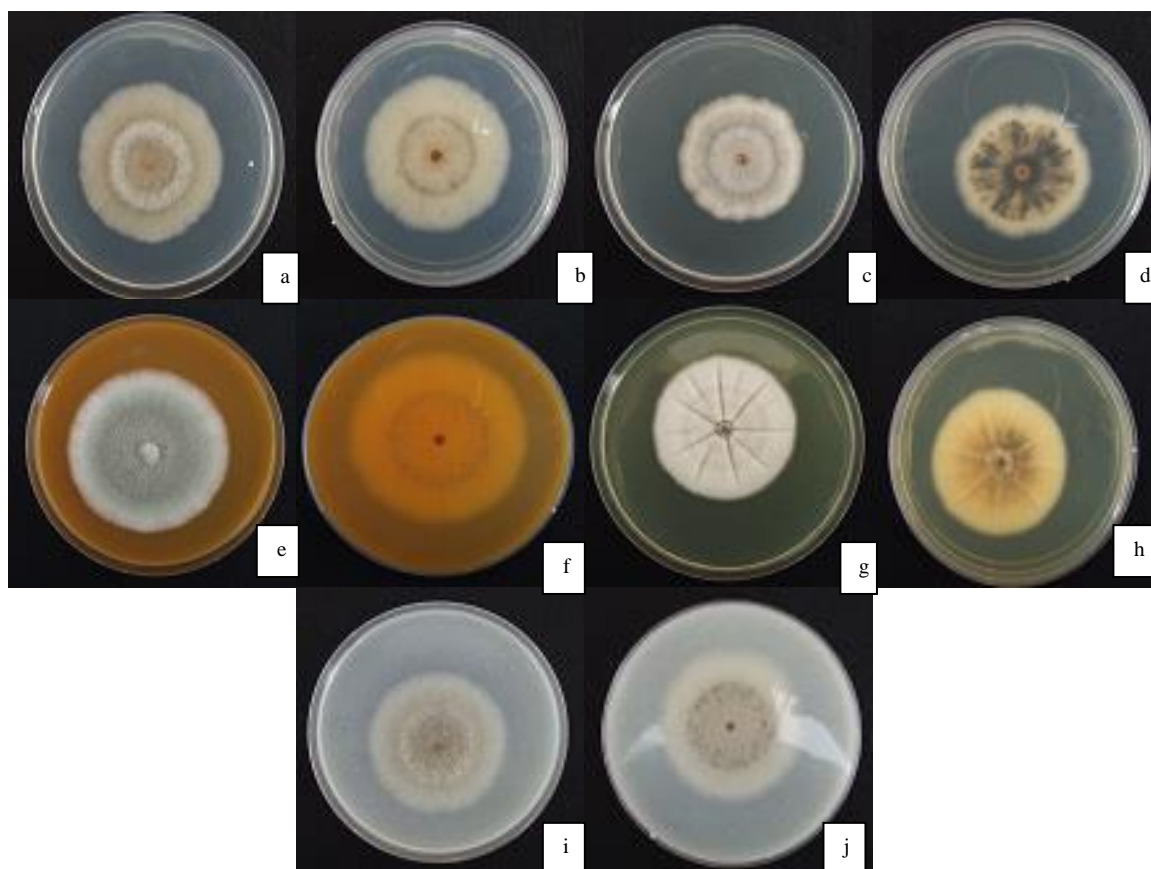
Slika 10. Plodovi posle različitog skladištenja i 21 dana inkubacije na sobnoj temperaturi (sa leva na desno: HA-3, K-4 i MR-1); ULO – hladnjača sa vrlo malo kiseonika; h.n.a. – hladnjača sa normalnom atmosferom

6.3. Morfološke i fiziološke osobine izolata *Colletotrichum* spp.

6.3.1. Morfologija vegetativnih organa

Ispitivani izolati 24 h nakon zasejavanja na svim ispitivanim podlogama obrazuju začetak vazdušaste micelije beličaste do sivkaste boje. Nakon par dana primećuju se promene u konzistenciji i obojenosti kultura. Na osnovu ispoljenih karakteristika posle sedam dana inkubacije, izolati se mogu svrstati u četiri morfološke grupe (Tabela 16).

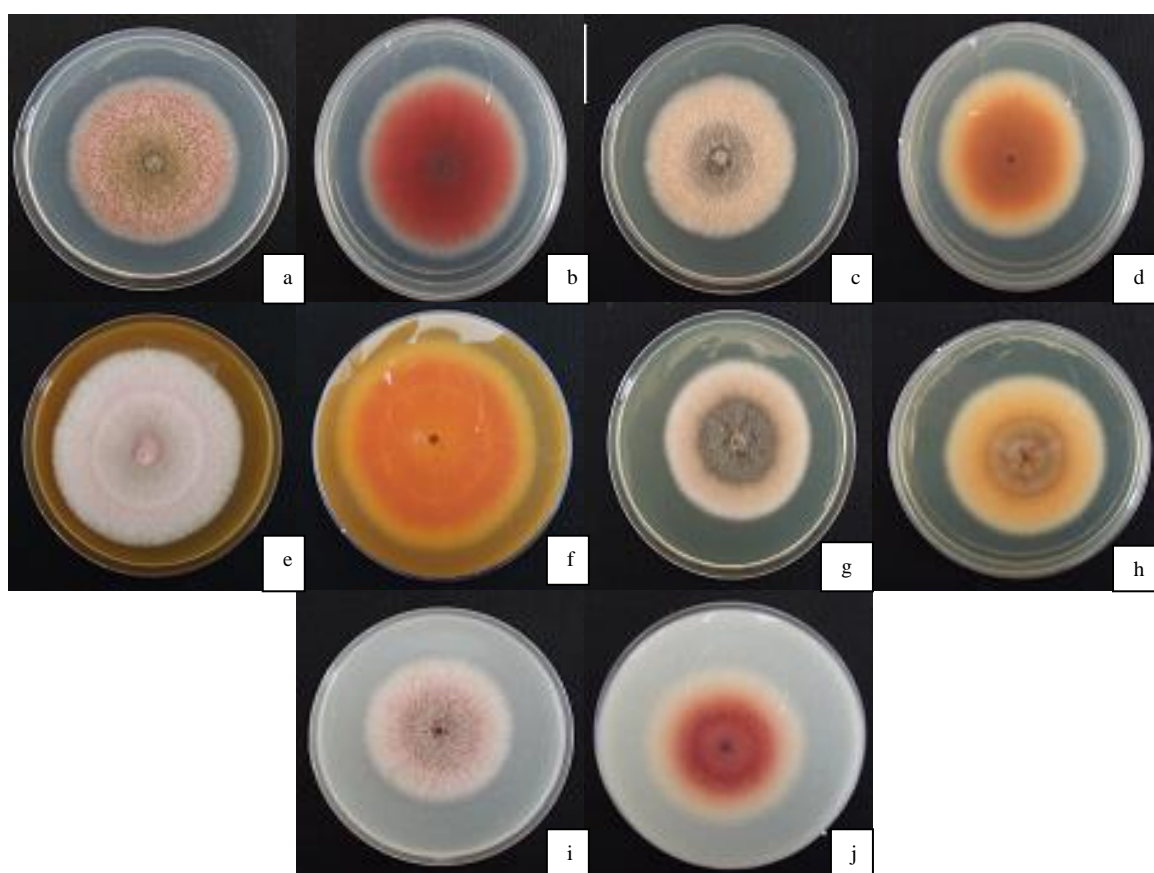
Prvu morfološku grupu (Slika 11) čine izolati koji su najbliži referentnom izolatu TUT 137A (*C. acutatum*). Na podlogama KDA, MPA, V8 i OA dolazi do izvesnih odstupanja, ali je i dalje morfološka sličnost izolata sa referentnim izolatom više izražena u odnosu na sve ostale izolate. Generalno, izolati I morfološke grupe formiraju svetlo do tamno sivo-maslinastu miceliju na podlogama KDA i MPA, dok je na podlogama V8, SDA i OA micelija svetlo sive boje. Po boji micelije, ovi izolati mogu se okarakterisati kao nehromogeni izolati. Narandžasta sporulacija u centralnom delu kolonije uočljiva je na podlogama KDA, MPA i OA, dok na SDA i V8 sporulacija nije vidljiva u vidu narandžastog matriksa (Tabela 16).



Slika 11. I morfološka grupa (izolat HA-3) sedam dana nakon inkubacije na podlogama KDA (a- lice; b- naličje), MPA (c- lice; d- naličje), V8 (e- lice; f- naličje), SDA (g- lice; h- naličje) i OA (i- lice; j- naličje).

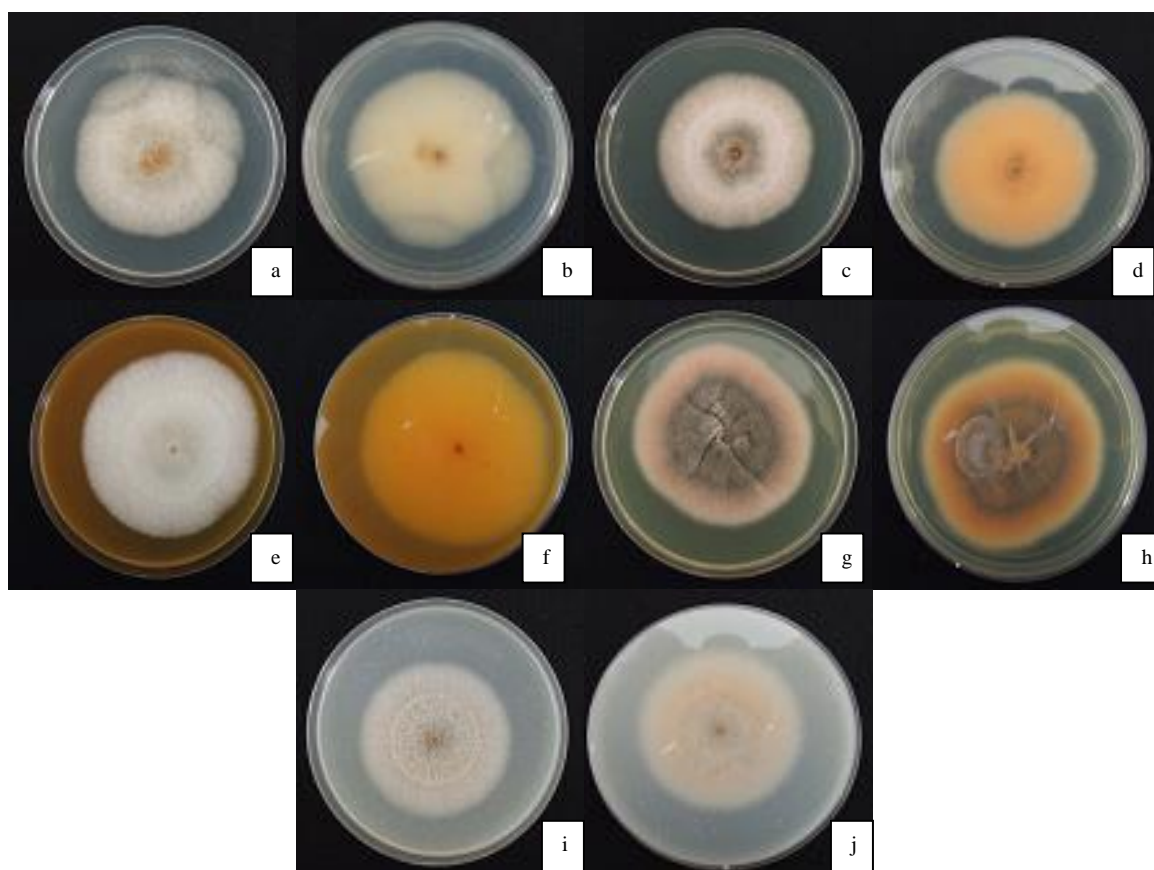
U drugoj morfološkoj grupi (Slika 12) na svakoj ispitanjoj podlozi svi pripadnici grupe formiraju specifične kolonije (Tabela 16) pri čemu nema odstupanja među izolatima.

Drugu morfološku grupu čine hromogeni izolati koje karakteriše formiranje crvenog pigmenta na KDA podlozi tj. upadljiva ružičasta boja kolonije. Na podlogama MPA, V8 i OA, formiranje crvenog pigmenta je slabije izraženo te kolonije imaju svetlo ružičastu do svetlo narandžastu boju. Na SDA podlozi formiranje pigmenta skoro potpuno izostaje te su kolonije krem boje. Na podlogama KDA, MPA i OA prisutna je sporulacija u vidu narandžastog matriksa.



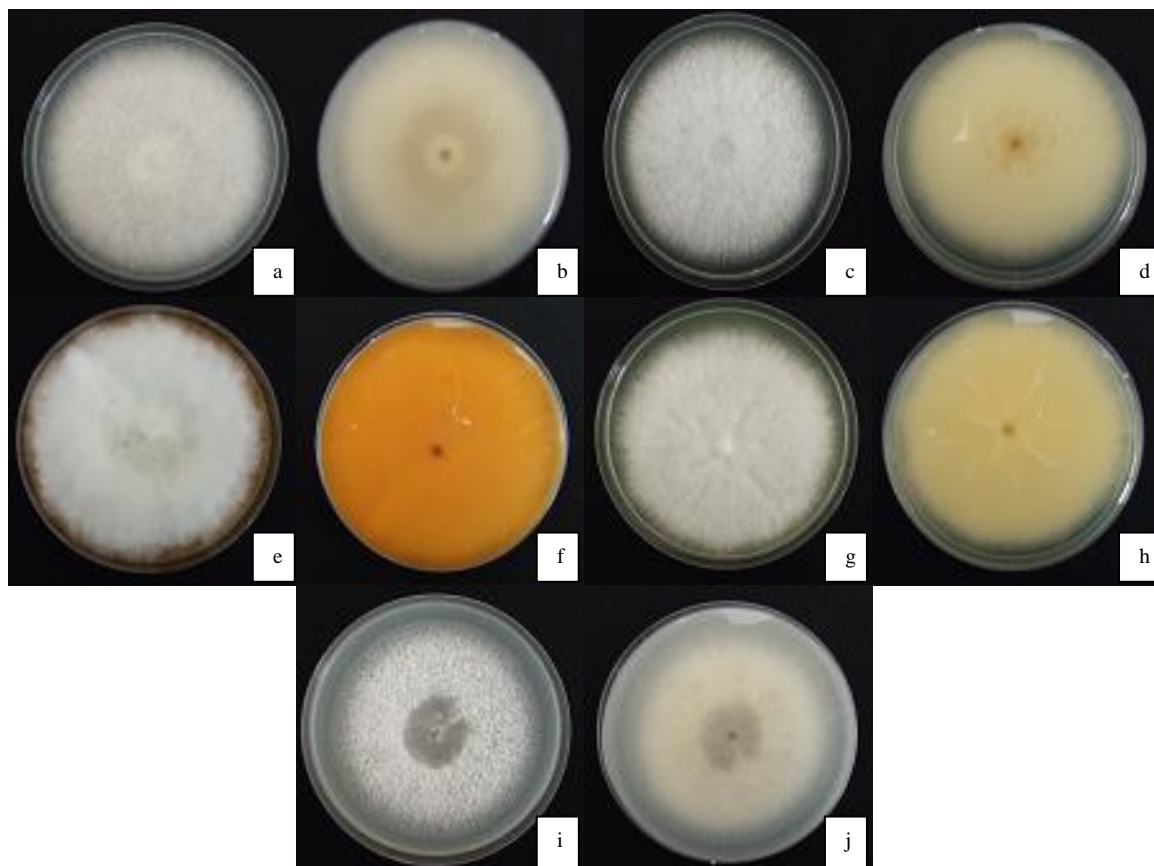
Slika 12. II morfološka grupa (Izolat Č-14) sedam dana nakon inkubacije na podlogama KDA (a- lice; b- naličje), MPA (c- lice; d- naličje), V8 (e- lice; f- naličje), SDA (g- lice; h- naličje) i OA (i- lice; j- naličje).

U trećoj morfološkoj grupi (Slika 13) izgled kolonije je ujednačen kod svih izolata (Tabela 16). Ovo su nehromogeni izolati koji formiraju svetlo sivu miceliju na KDA i OA podlogama, krem-sivu na MPA, belu na podlozi V8, a tamno sivu na podlozi SDA. Sporulacija u centralnom delu kolonije u vidu narandžastog matriksa uočljiva je na podlogama KDA, MPA i OA, dok na SDA i V8 sporulacija nije vidljiva u vidu narandžastog matriksa.



Slika 13. III morfološka grupa (izolat Č-3) sedam dana nakon inkubacije na podlogama KDA (a- lice; b- naličje), MPA (c- lice; d- naličje), V8 (e- lice; f- naličje), SDA (g- lice; h- naličje) i OA (i- lice; j- naličje).

Četvrtu morfološku grupu (Slika 14) čine izolati najbliži referentnom izolatu AVO 374B (*C. gloeosporioides*), bez odstupanja između pripadnika grupe. Ovi nehromogeni izolati formiraju snežno belu miceliju intenzivnog rasta bez vidljive sporulacije u vidu narandžastog matriksa na podlogama KDA, MPA, V8, SDA i OA (Tabela 16).



Slika 14. IV morfološka grupa (izolat Č-2) sedam dana nakon inkubacije na podlogama KDA (a- lice; b- naličje), MPA (c- lice; d- naličje), V8 (e- lice; f- naličje), SDA (g- lice; h- naličje) i OA (i- lice; j- naličje).

Nisu uočene razlike između izolata prilikom mikroskopskog pregleda vegetativnih organa. Mlade hife su razgranate, hijalinske i granuliranog ćelijskog sadržaja. Starije hife u centru kolonije su šire, debljih zidova i tamnije boje, proširenih vrhova, sa izraženim poprečnim pregradama. Hife se grupišu sa starenjem kultura i stvaraju tamna stromatična zadebljanja. Ove strukture mogu evoluirati u acervule ili ostati sterilne što varira u zavisnosti od izolata.

Nezavisno od toga da li formiraju vazdušastu ili vunastu miceliju na podlogama KDA, MPA, V8 i OA, na podlozi SDA micelija svih izolata je na SDA podlozi ravna (površinska).

Tabela 16. Morfološke osobine izolata *Colletotrichum* spp. posle sedam dana inkubacije na različitim hranljivim podlogama

Izolat	Grupa	Izgled kolonije na KDA		Izgled kolonije na MPA		Izgled kolonije na V8		Izgled kolonije na SDA		Izgled kolonije na OA	
		Lice	naličje	lice	naličje	lice	Naličje	lice	naličje	lice	naličje
R-1 R-2 MI-23* MI-21 KU-1 KU-14 HA-3 B-7 MR-317 SB-12 I-7 UZ-107 Š-1 UN-11 TV-5 ME-7 LP-8 TUT 137A*	I	Svetlo do tamno siva – maslinasta, zonirana, u centralnom delu narandžasta sporulacija, ravna ivična zona, vazdušasta	Svetlo do tamno siva – maslinasta, zonirana	Svetlo do tamno siva – maslinasta, zonirana, u centralnom delu narandžasta sporulacija, talasasta ivična zona, vazdušasta	Obod beličasto-krem, unutrašnji deo zrakast crno-krem	Svetlo siva sa belim obodom, ravna ivična zona, vazdušasta	Svetlo siva, nema zoniranja	Svetlo siva, blago zonirana, ravna ivična zona, sa poprečnim usecima, ravna (površinska)	Svetlo oker sa poprečnim usecima	Svetlo siva, blago zonirana, u centralnom delu narandžasta sporulacija, ravna ivična zona, vunasta	Beličasto – krem, u središnjem delu jasno oivičen kružni skup acervula
Č-13 Č-14 Č-30 Č-31 BV-6 LP-9 K-4 B-4	II	Ružičasta sa belim obodom, u središnjem delu braonkasti vrhovi hifa i narandžasta sporulacija, ravna ivična zona, vunasta	Ružičasta sa belim obodom	Svetlo narandžasta sa belim obodom, u središnjem delu braonkasta i narandžasta sporulacija, ravna ivična zona, vunasta	Narandžasta sa belim obodom	Svetlo ružičasta, blago zonirana, ravna ivična zona, vazdušasta	Svetlo ružičasto – bela, zonirana	Krem sa tamno sivim središnjim delom, beličastim obodom, ravna ivična zona, zonirana, ravna (površinska)	Krem-narandžasto-braon, zonirano	Svetlo ružičasta, ravna ivična zona, blago zonirana, u centralnom delu narandžasta sporulacija vunasta	Ružičasto – bela, zonirana, sa belim obodom

Nastavak tabele 16.

<p>Č-3 BV-11 MR-10</p>	<p>III</p>	<p>Svetlo siva, u centralnom delu narandžasta sporulacija, ravna ivična zona, vunasta</p>	<p>Svetlo siva</p>	<p>Krem-siva, u centralnom delu narandžasta sporulacija, zonirana, ravna ivična zona, vunasta</p>	<p>Svetlo narandžasta sa belim obodom</p>	<p>Bela, ravna ivična zona, vazdušasta</p>	<p>Bela</p>	<p>Tamno siva-roza, zonirana, sa beličastim obodom, ravna ivična zona, sa nepravilnim usecima samo u središnjem delu (tamno siva zona), ravna (površinska)</p>	<p>Narandžasto-tamno siva, zonirana sa usecima, sa belim obodom</p>	<p>Svetlo siva ravna, blago zonirana, ravna ivična zona, u centralnom delu narandžasta sporulacija, vunasta</p>	<p>Beličasta, sa nepravilno raspoređenim acervulama i vidljivom narandžastom sporulacijom</p>
<p>TV-2 MR-1 BV-4 SB-1 Č-2 AVO 374B</p>	<p>IV</p>	<p>Snežno bela, ravna ivična zona, vazdušasta</p>	<p>Beličasto-krem, blago zonirana</p>	<p>Snežno bela, ravna ivična zona, vazdušasta</p>	<p>Beličasto-krem, vidljiva narandžasta sporulacija blago zonirana</p>	<p>Snežno bela, ravna ivična zona, vazdušasta, izuzetno bujna</p>	<p>Bela</p>	<p>Snežno bela, blago zrakasta ivična zona, sa nepravilnim usecima od centralnog dela, ravna (površinska)</p>	<p>Krem sa nepravilnim usecima</p>	<p>Snežno bela, ravna ivična zona, vunasta</p>	<p>Beličasta, vidljiva narandžasta sporulacija i nepravilno raspoređene acervule</p>

Izolati koji blago odstupaju od pojedinih karakteristika grupe na podlogama: TUT 137A slaba sporulacija i skoro bela micelija na KDA, poprečni useci i ravna ivična zona na MPA, bela micelija na V-8, izražena zoniranost naličja na OA; MI-23* jače zonirano lice i ravna ivična zona na MPA.

6.3.2. Morfologija konidija

Ispitani izolati *Colletotrichum* spp. obilno formiraju konidije, kako u okviru acervula, tako i na bočnim granama micelije. Na veštački inokulisanim plodovima i u kulturi, konidije iz acervula se oslobađaju u vidu sluzastog, želatinoznog matriksa.

Konidije su jednoćelijske, bezbojne, hijalinske, glatke, prave, ili blago povijene. Prema obliku konidija formiranih na veštački inokulisanim plodovima i u kulturi svi izolati su svrstani u tri kategorije:

- (a) izolati sa fusiformnim konidijama, zaoštrenim na oba kraja (F);
- (b) izolati sa cilindričnim konidijama, zaoštrenim na jednom kraju (C1);
- (c) izolati sa cilindričnim konidijama, zaobljenim na oba kraja (C2).

U Tabeli 17 date su kategorije i dimenzije konidija formiranih posle 15 dana na veštački inokulisanim plodovima za sve ispitane izolate.

Tabela 17. Podela izolata u kategorije na osnovu oblika konidija formiranih na veštački inokulisanim plodovima i dimenzije konidija (μm).

Izolat	Kategorija	Dužina konidija (μm)	Širina konidija	Odnos
		min/prosek/max	(μm) min/prosek/max	Srednja dužina/srednja širina
ME-7		12,18/ 14,07 /16,38	4,2/ 4,41 /5,04	3,19
UN-11		12,18/ 13,98 /17,22	4,2/ 4,32 /5,04	3,23
BV-11		13,44/ 14,95 /16,8	4,2/ 4,45 /5,04	3,35
KU-1		12,6/ 14,23 /17,64	4,2/ 4,66 /5,04	3,05
Č-3		13,02/ 14,86 /16,8	4,2/ 4,7 /5,04	3,16
Č-14	F	9,66/ 15,7 /17,64	4,2/ 4,78 /5,04	3,28
Č-31		10,5/ 13,65 /16,8	4,2/ 4,62 /5,04	2,95
BV-6		12,6/ 14,11 /16,8	4,2/ 4,45 /5,04	3,17
LP-9		13,44/ 14,61 /17,22	4,2/ 4,41 /5,04	3,31
B-4		10,5/ 13,39 /17,64	4,2/ 4,45 /5,04	3,01
K-4		13,2/ 14,4 /17,22	4,2/ 4,62 /5,04	3,11
MR-10		13,02/ 14,61 /17,64	4,2/ 4,49 /5,04	3,25
R-1		13,44/ 14,4 /16,8	4,2/ 4,45 /5,04	3,23
R-2		13,02/ 14,4 /17,22	4,2/ 4,91 /5,04	2,93
MI-23		12,6/ 13,98 /16,8	3,78/ 4,53 /5,04	3,08
Š-1		13,02/ 15,45 /21,0	4,2/ 4,53 /5,04	3,41
KU-14		12,18/ 13,98 /17,22	4,2/ 4,45 /5,04	3,14
MI-21		11,0/ 12,9 /14,78	4,2/ 4,45 /5,04	2,65
TUT 137-A		13,02/ 14,07 /17,22	3,78/ 4,62 /5,04	3,04
LP-8		12,18/ 14,91 /20,16	4,2/ 4,66 /5,04	3,19
SB-12		12,18/ 14,19 /17,64	4,2/ 4,28 /5,04	3,31
MR-317		12,6/ 13,18 /15,12	4,2/ 4,57 /5,04	2,88
TV-5	C1	11,76/ 13,98 /17,64	4,2/ 4,62 /5,04	3,02
B-7		13,02/ 14,99 /18,48	4,2/ 4,57 /5,04	3,28
HA-3		8,82/ 13,02 /17,64	4,2/ 4,28 /5,04	3,04
Č-13		10,08/ 14,61 /20,58	3,78/ 4,28 /5,04	3,41
Č-30		11,76/ 14,65 /18,9	4,2/ 4,53 /5,04	3,23

Nastavak tabele 17.

UZ-107		12,18/ 14,82 /17,64	3,78/ 4,28 /5,04	3,46
I-7		12,6/ 15,7 /23,1	4,2/ 4,62 /5,04	3,39
MR-1		9,24/ 18,38 /21,7	4,2/ 4,36 /4,62	2,61
BV-4		9,24/ 17,29 /22,7	4,2/ 4,45 /5,04	2,53
Č-2	C2	8,4/ 19,59 /23,96	4,2/ 4,41 /5,04	2,62
SB-1		8,4/ 18,08 /20,7	4,2/ 4,45 /5,04	2,48
TV-2		8,82/ 17,17 /24,0	4,2/ 4,49 /4,62	2,48
AVO 374B		8,4/ 17,46 /15,12	4,2/ 4,62 /5,04	2,48

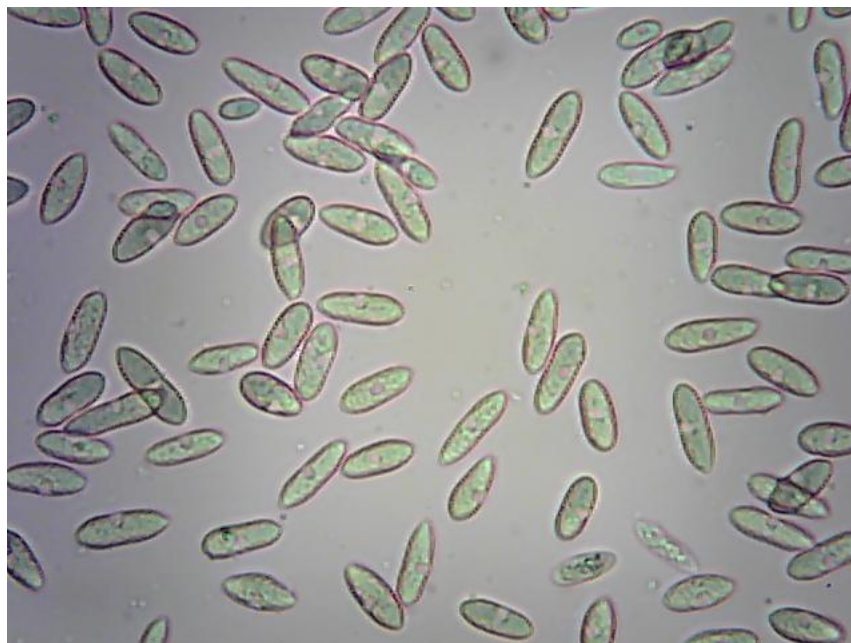
U Tabeli 18 date su kategorije i dimenzije konidija formiranih posle 15 dana u kulturi na KDA podlozi za sve ispitane izolate.

Tabela 18. Podela izolata u kategorije na osnovu oblika konidija formiranih posle 15 dana u kulturi na KDA podlozi i dimenzije konidija (μm).

Izolat	Kategorija	Dužina konidija (μm)	Širina konidija	Odnos
		min/prosek/max	(μm) min/prosek/max	Srednja dužina/srednja širina
ME-7		11,15/ 13,17 /14,91	3,46/ 3,92 /4,96	3,35
UN-11		11,22/ 12,88 /16,45	3,46/ 3,98 /4,96	3,23
BV-11		12,52/ 13,92 /15,9	3,46/ 3,54 /4,96	3,93
KU-1		11,0/ 14,0 /16,52	3,46/ 4,1 /4,96	3,41
Č-3		12,82/ 14,22 /15,9	3,46/ 4,2 /4,46	3,38
Č-14		9,52/ 14,8 /16,25	3,46/ 3,92 /4,96	3,77
Č-31		10,25/ 12,95 /15,8	3,46/ 3,85 /4,46	3,36
BV-6		11,5/ 13,69 /15,72	3,46/ 3,95 /4,46	3,46
LP-9*		12,64/ 13,98 /16,42	3,46/ 3,52 /4,46	3,97
B-4*	F	11,2/ 12,89 /16,54	3,96/ 4,25 /4,96	3,03
K-4		12,92/ 13,54 /16,42	3,46/ 3,92 /4,46	3,45
MR-10		12,35/ 13,92 /16,84	3,46/ 3,89 /4,46	3,57
R-1*		11,92/ 13,8 /16,52	3,46/ 3,85 /4,46	3,58
R-2		12,65/ 13,42 /16,56	3,46/ 3,98 /4,96	3,37
MI-23		12,25/ 13,78 /15,65	3,46/ 3,98 /4,46	3,46
Š-1		12,96/ 14,22 /18,24	3,46/ 3,96 /4,46	3,59
KU-14		11,28/ 12,42 /16,92	3,46/ 3,96 /4,46	3,13
MI-21		10,75/ 11,65 /14,42	3,46/ 3,85 /4,96	2,76
TUT 137A		11,56/ 12,97 /14,42	3,46/ 3,89 /4,96	3,33
LP-8*		11,82/ 13,95 /17,22	3,46/ 3,56 /4,96	3,91
SB-12		10,26/ 12,96 /16,84	3,46/ 3,98 /4,46	3,25
MR-317		11,2/ 12,92 /15,06	3,46/ 3,57 /4,46	3,61
TV-5	C1	10,96/ 12,52 /16,2	3,46/ 4,12 /4,46	3,03
B-7		12,32/ 13,99 /16,58	3,46/ 3,87 /4,46	3,61
HA-3		9,82/ 12,46 /15,78	3,46/ 4,12 /4,96	3,02
Č-13		10,0/ 13,82 /19,52	3,46/ 3,86 /4,46	3,58
Č-30		10,82/ 13,58 /17,65	3,46/ 3,94 /4,46	3,44
UZ-107		11,95/ 13,74 /16,5	3,46/ 3,92 /4,96	3,5
I-7		12,2/ 14,72 /19,87	3,46/ 3,62 /4,46	4,06
MR-1		10,54/ 17,98 /19,7	3,46/ 3,92 /4,46	2,8
BV-4	C2	9,36/ 16,42 /18,68	3,46/ 3,92 /4,96	2,65
Č-2		8,25/ 18,98 /19,87	3,46/ 3,62 /4,96	3,03
SB-1		7,96/ 16,22 /19,8	3,46/ 3,92 /4,96	2,6
TV-2		8,76/ 16,54 /18,62	3,46/ 3,94 /4,46	2,67
AVO 374B		8,4/ 16,92 /18,32	3,46/ 3,92 /4,46	2,78

*Izolati koji u kulturi formiraju dva tipa konidija (F i C1);

Prema obliku konidija (Slike 15, 16 i 17) formiranih na veštački inokulisanim plodovima svi izolati su jasno izdiferencirani u tri grupe (F, C1 i C2). Međutim, u kulturi na KDA podlozi pojedini izolati formiraju dva tipa konidija (izolati LP-9, B-4, LP-8, R-1 tipove F i C1).



Slika 15. Fuziformni (F) tip konidija (izolat: MI-23)



Slika 16. Cilindrični zaoštren na jednom kraju (C1) tip konidija (izolat: HA-3)



Slika 17. Cilindrične, zaobljene na oba kraja (C2) tip konidija (izolat: MR-1)

Referentni izolat *C. acutatum* (TUT 137A) formira fuziformni tip konidija (F), dok referentni izolat vrste *C. gloeosporioides* (AVO 374B) formira cilindrične konidije zaobljene na oba kraja (C2).

Prosečna dužina konidija formiranih na veštački inokulisanim plodovima i iz kulture znatno varira među svim izolatima. Naročito varijabilni parametri su maksimalna i minimalna dužina konidija. Na veštački inokulisanim plodovima maksimalna dužina konidija je u opsegu 14,78 - 24,00 μm , a u kulturi 14,42 - 19,87 μm . Minimalna dužina konidija na veštački inokulisanim plodovima kreće se od 8,4 do 13,44 μm , a u kulturi od 7,96 do 12,92 μm .

Međutim, ekstremne vrednosti širine konidija su ujednačene među svim izolatima, kako na veštački inokulisanim plodovima, tako i u kulturi. Maksimalna širina konidija formiranih na veštački inokulisanim plodovima iznosi 4,62 ili 5,04 μm , a u kulturi 4,46 ili 4,96 μm . Minimalna širina konidija na veštački inokulisanim plodovima iznosi 3,78 ili 4,2 μm , a u kulturi 3,46 μm .

Prosečna dužina i širina konidija svih izolata je veća na veštački inokulisanim plodovima od prosečne dužine i širine konidija u kulturi na KDA podlozi.

Izolat Č-2 na veštački inokulisanim plodovima i u kulturi formira konidije najveće prosečne dužine u odnosu na ostale izolate (19,59 i 18,98 μm , respektivno).

6.3.3. Obrazovanje teleomorfno stadijuma

Pojava teleomorfno stadijuma nije uočena ni kod jednog ispitivanog izolata *Colletotrichum* spp. uključujući i dva referentna izolata. Do obrazovanja peritecija ne dolazi ni na jednoj od ispitivanih podloga, kao i na veštački inokulisanim plodovima koji su čuvani i pregledani do potpunog iscrpljivanja.

6.3.4. Uticaj hranljivih podloga na rast izolata

Uticaj hranljivih podloga na rast izolata *Colletotrichum* spp. ispitan je na podlogama KDA, MPA, V8, SDA i OA merenjem prečnika kolonije (mm). Uticaj je prvi put ocenjen posle četiri dana inkubacije izolata na 25°C, i praćen je do ispunjenja Petri kutije (Slika 18).

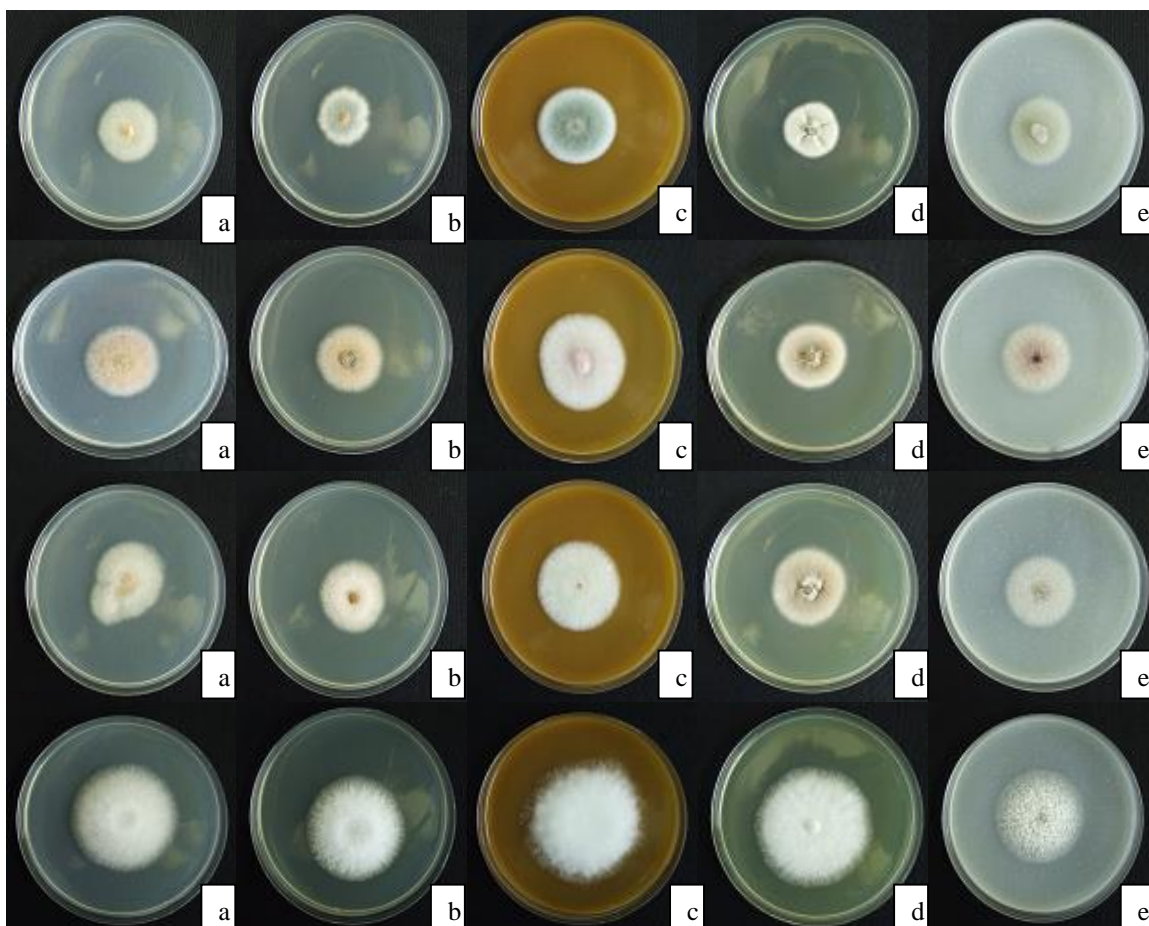
Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse dati su u Tabeli 19. Na osnovu vrednosti sume kvadrata može se zaključiti da su izolati najveći izvor variranja (SS=20 869,6) prečnika kolonije. Međutim, vrednost parametra p ($p < 0,01$) ukazuje da su oba faktora, i izolati i podloge, kao i njihova interakcija statistički visoko značajni izvori variranja.

Tabela 19. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *Colletotrichum* spp. gajenih na različitim podlogama u trajanju od četiri dana

Izvor variranja	Suma kvadrata SS	Stepeni slobode df	Sredina kvadrata MS	Količnik F	Nivo značajnosti P
Podloga	2 265,5	4	566,4	988	0,00**
Izolat	20 869,6	34	613,8	1071	0,00**
Podloga*Izolat	2 722,4	136	20,0	35	0,00**
Greška	200,7	350	0,6		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Na osnovu Dankanovog testa (Tabela 53 u Prilogu) utvrđeno je da najveći rast u odnosu na sve ostale izolate i podloge ostvaruje izolat IV morfološke grupe (Č-2) na podlozi SDA (52 mm). Na istom nivou značajnosti je i rast preostalih izolata iz morfološke grupe IV na SDA podlozi (50,67 - 52 mm). Generalno, izolati IV morfološke grupe ispoljavaju statistički značajno veći rast na svim podlogama u odnosu na sve preostale ispitivane izolate, uz nekoliko izuzetaka (izolati MR-1, SB-1 i BV-4 na OA podlozi i izolat Č-2 na MPA podlozi). Rast ovih izolata na navedenim podlogama je u nivou rasta većine ispitivanih izolata I, II i III morfološke grupe na podlozi V8 na kojoj ovi izolati ispoljavaju najveći rast. Najveći rast od preostalih izolata ispoljavaju izolati II morfološke grupe (Č-31, Č-14, K-4) i III morfološke grupe (Č-3) na podlozi V8 (32 do 40,67 mm). Rast svih izolata iz I, II i III morfološke grupe je statistički značajno manji na SDA podlozi u odnosu na njihov rast na V8 podlozi.



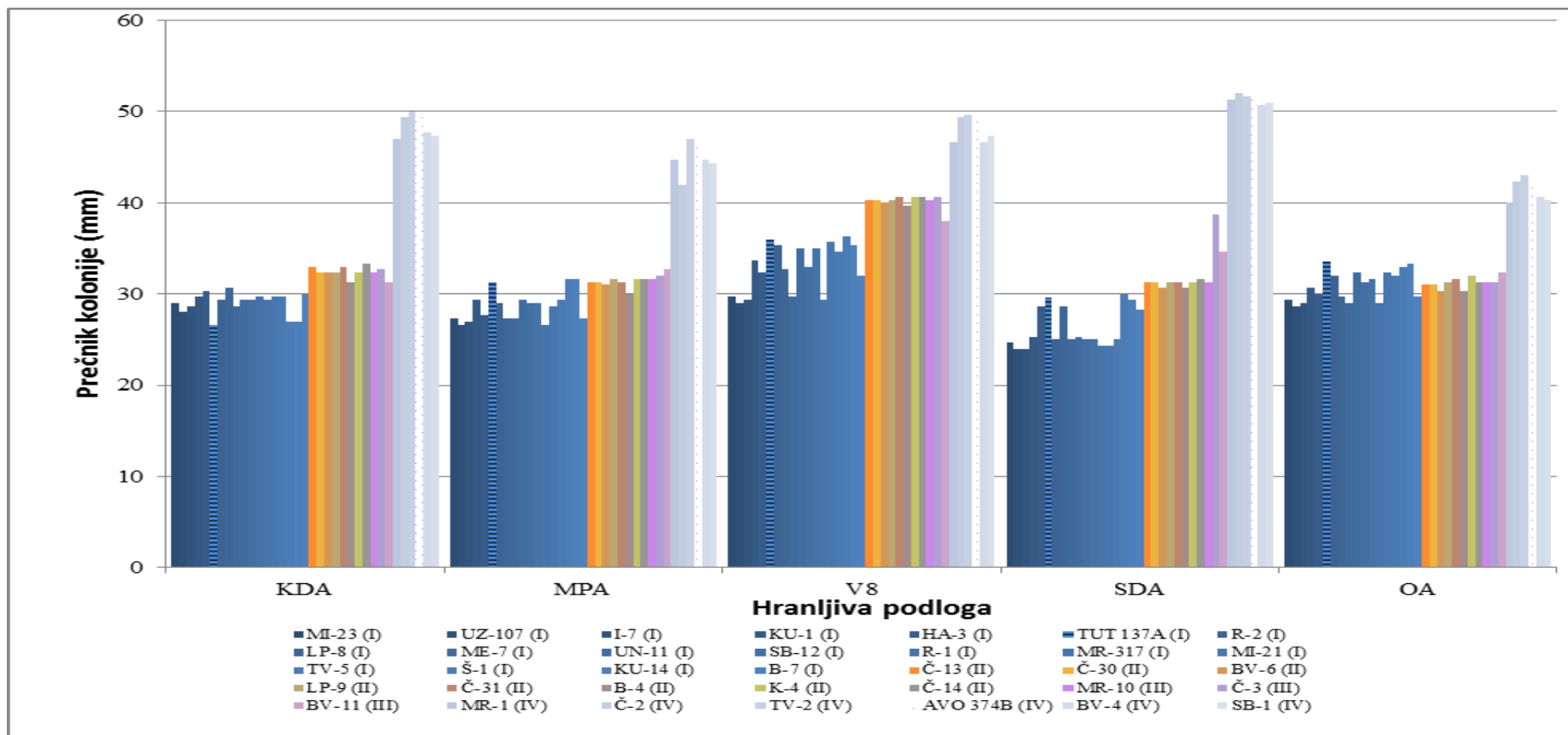
Slika 18. Rast izolata *Colletotrichum* spp. na različitim hranljivim podlogama posle četiri dana inkubacije (1.red izolat MI-23; 2. red izolat Č-14; 3.red izolat BV-11; 4. red izolat MR-1. Podloge: KDA-a; MPA-b; V8-c; SDA-d; OA-e)

Najmanji rast ispoljavaju izolati I morfološke grupe (UZ-107 i I-7) na SDA podlozi (24 mm). Na istom nivou značajnosti (24,33 – 25,33 mm) je rast još nekih izolata I morfološke grupe (MI-21, MR-317, MI-23, R-2, SB-12, TV-5, ME-7, R-1, UN-11 i KU-1) takođe na SDA podlozi. Najmanji rast na SDA podlozi ispoljavaju svi izolati II morfološke grupe i većina izolata I i III morfološke grupe (ali ne uvek statistički značajno u odnosu na ostale podloge).

Uočeno je da podloga SDA za izolate IV morfološke grupe predstavlja najpogodniji medijum za razvoj (Grafikon 4) dok za izolate iz preostale tri morfološke grupe predstavlja najmanje pogodan, te može poslužiti kao jedan od faktora diskriminacije pri identifikaciji *Colletotrichum* spp. do nivoa vrste, budući da se u grupi sa najizraženijim rastom na SDA podlozi nalazi referentan izolat vrste *C. gloeosporioides* (AVO 374B).

Referentan izolat vrste *C. acutatum* (I morfološka grupa) ispoljava statistički značajno manji rast na SDA podlozi u odnosu na podloge MPA, OA i V8.

Nezavisno od podloge, izolati I morfološke grupe ispunjavaju Petri kutiju posle 13 dana inkubacije, a II grupe posle 11 dana. Petri kutija je kod izolata III morfološke grupe ispunjena posle 10 dana inkubacije dok je kod izolata I grupe ovo slučaj posle 8 dana, nezavisno od podloge.



Grafikon 4. Prečnik kolonija izolata (mm) posle četiri dana inkubacije na različitim podlogama (oznaka u zagradi pored izolata označava morfološku grupu; boje stubića: tamno plave nijanse - I morfološka grupa; narandžaste do zelene nijanse – II morfološka grupa; ljubičaste nijanse – III morfološka grupa; svetlo plave nijanse – IV morfološka grupa. Stubići sa mustrom označavaju referentne izolate).

Većina izolata sporuliše na svim ispitanim podlogama posle sedam dana. Samo kod izolata IV morfološke grupe sporulacija izostaje na SDA podlozi i posle 14 dana inkubacije. Kod jednog izolata I morfološke grupe (TUT 137-A) sporulacija izostaje na podlozi V8. Svi izolati najobilnije sporulišu na podlozi OA (Tabela 20).

Tabela 20. Prisustvo (+)/odsustvo (-) sporulacije u kulturi ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. posle 14 dana inkubacije na različitim podlogama

Morfološka grupa	Izolat	Podloga				
		KDA	MPA	V-8	SDA	OA
I	R-1	+++	++	+	+	+++
	R-2	++	++	+	+	+++
	MI-23	+++	++	+	+	+++
	MI-21	+++	++	+	+	+++
	KU-1	++	++	+	+	+++
	KU-14	+++	++	+	+	+++
	HA-3	+++	+++	+	+	+++
	B-7	+++	++	+	+	+++
	MR-317	+++	+++	+	+	+++
	SB-12	+++	++	+	+	+++
	I-7	++	++	+	+	+++
	UZ-107	+++	++	+	+	+++
	Š-1	+++	++	+	+	+++
	UN-11	+++	+++	+	+	+++
	TV-5	+++	++	+	+	+++
	ME-7	++	+++	+	+	+++
	LP-8	+++	++	+	+	+++
TUT137A	++	++	-	+	+++	
II	Č-13	+++	++	+	+	+++
	Č-14	+++	++	+	+	+++
	Č-30	+++	++	+	+	+++
	Č-31	++	++	+	+	+++
	BV-6	+++	+++	+	+	+++
	LP-9	+++	+++	+	+	+++
	K-4	++	++	+	+	+++
	B-4	++	++	+	+	+++
III	Č-3	++	++	+	+	+++
	BV-11	++	++	+	+	+++
	MR-10	++	++	+	+	+++
IV	TV-2	+	+	+	-	++
	MR-1	+	+	+	-	++
	BV-4	+	+	+	-	++
	SB-1	+	+	+	-	++
	Č-2	+	+	+	-	++
	AVO 374B	+	+	+	-	++

(+) slaba sporulacija; (++) srednje izražena sporulacija; (+++) jako izražena sporulacija; (-) odsustvo sporulacije

6.3.5. Uticaj temperature i svetlosti na rast izolata

Uticaj temperature na rast izolata *Colletotrichum* spp. ispitan je za sledeće vrednosti: 2, 4, 5, 6, 7, 10, 20, 25, 28, 30, 33 i 35°C.

Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse (Tabela 21) pokazali su da prečnik micelije (mm) statistički značajno varira kako sa temperaturom inkubacije na KDA podlozi, tako i između različitih izolata. Utvrđeno je da su temperature, izolati i njihova interakcija statistički visoko značajni izvori variranja ($p < 0,01$), pri čemu je temperatura inkubacije najveći izvor variranja (SS= 308 894,8).

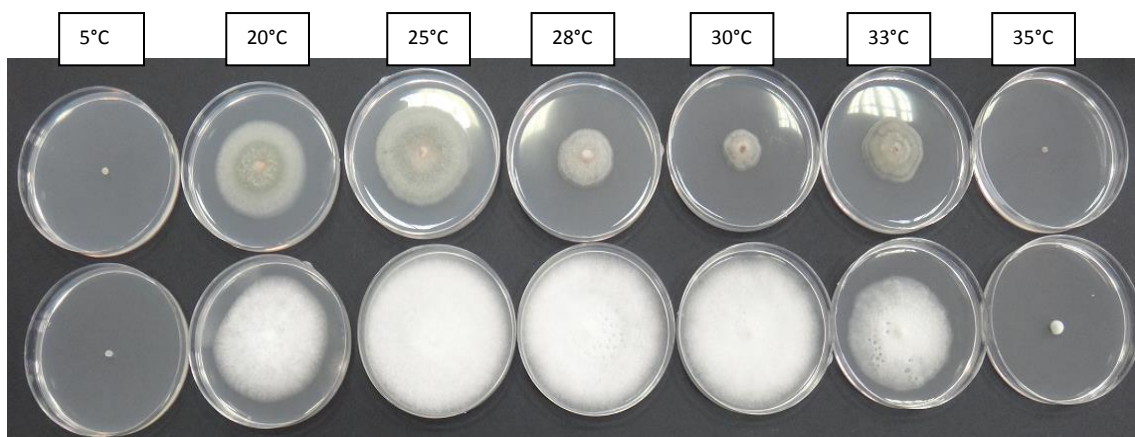
Tabela 21. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *Colletotrichum* spp. gajenih na različitim temperaturama u trajanju od sedam dana

Izvor varanja	Suma	Stepeni	Sredina	Količnik	Nivo
	kvadrata	slobode	kvadrata		značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Temperatura	308 894,8	11	28 081,3	31 499,2	0,00**
Izolat	38 014,9	15	2 534,3	2 842,8	0,00**
Temperatura*Izolat	83 790,3	165	507,8	569,6	0,00**
Greška	513,5	576	0,9		

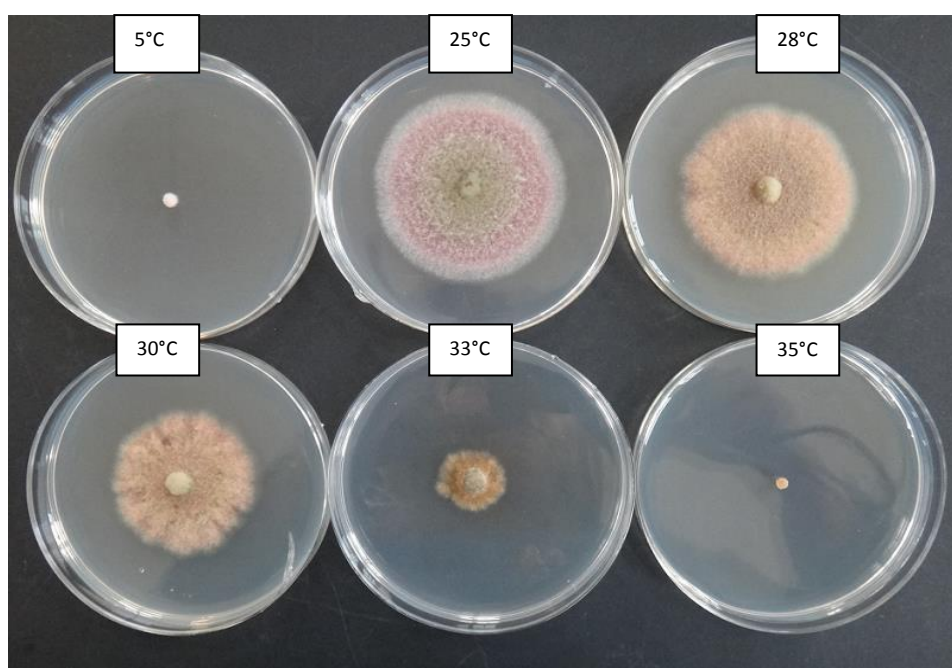
*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Rast ispitivanih izolata na KDA podlozi posle sedam dana inkubacije na različitim temperaturama (srednje vrednosti) prikazan je na Grafikonu 5.

Od ispitivanih izolata, samo dva izolata (ME-7 i TUT 137A) iz morološke grupe I ispoljavaju najveći rast na 20°C, dok svi preostali izolati najveći rast ispoljavaju na 25°C (Slike 19 i 20). Najveći rast od svih testiranih izolata registrovan je za referentni izolat *C. gloeosporioides* (morfološka grupa IV). Na 25°C, posle sedam dana inkubacije ustanovljeno je da se brzina rasta izolata može dovesti u vezu sa njihovom pripadnošću morfološkim grupama. Naime, najveći rast ispoljavaju izolati IV morfološke grupe (80,25 -81 mm), zatim izolat III morfološke grupe (68,5 mm), zatim izolati II morfološke grupe (54,5 – 63,25 mm) dok najmanji rast imaju izolati I morfološke grupe (23,25 -51,25 mm). Razlike u rastu između morfoloških grupa su statistički značajne (Dankanov test).



Slika 19. Rast izolata I morfološke grupe (gornji red) i IV morfološke grupe (donji red) posle sedam dana inkubacije na različitim temperaturama na KDA podlozi

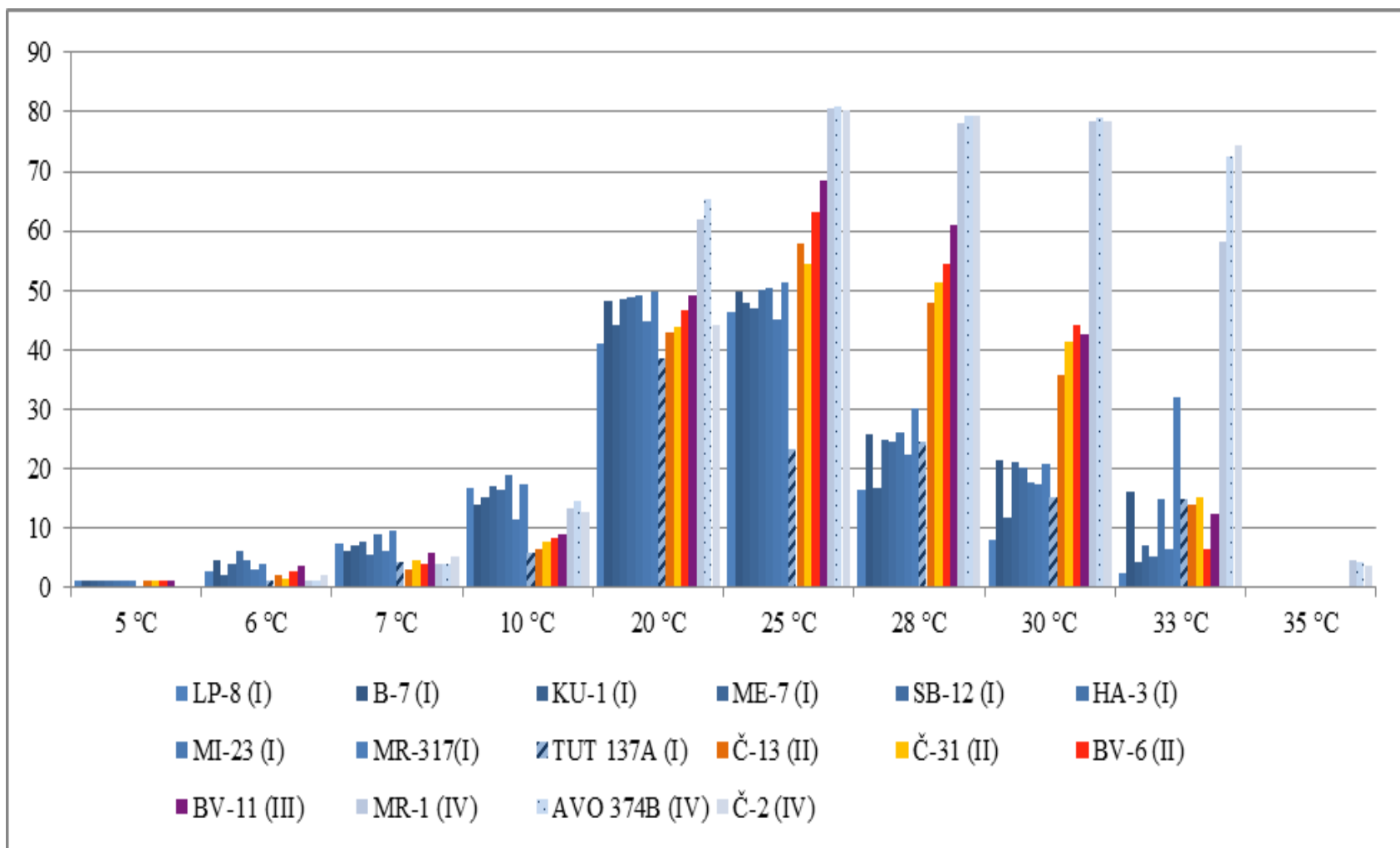


Slika 20. Izolat II morfološke grupe Č-31 posle sedam dana inkubacije na KDA na različitim temperaturama

Na temperaturama od 2 i 4°C posle četiri i sedam dana inkubacije nije registrovan rast ni jednog izolata, kao ni posle četiri dana inkubacije na 5°C. Međutim, posle sedam dana na temperaturi od 5°C primećen je rast izolata koji pripadaju morfološkim grupama I (osim referentnog izolata *C. acutatum*), II i III, dok je rast izolata iz IV morfološke grupe izostao i na 5°C.

Temperatura od 35°C se takođe izdvaja kao granična temperatura na kojoj nije utvrđen rast izolata I, II i III morfološke grupe dok izolati IV morfološke grupe nastavljaju rast i na ovoj temperaturi već posle četiri dana inkubacije.

Najniža temperatura na kojoj je utvrđen rast svih izolata je 6°C a najviša 33°C.



Grafikon 5. Rast izolata *Colletotrichum* sp. posle sedam dana inkubacije na KDA podlozi na različitim temperaturama (oznaka u zagradi pored izolata označava morfološku grupu)

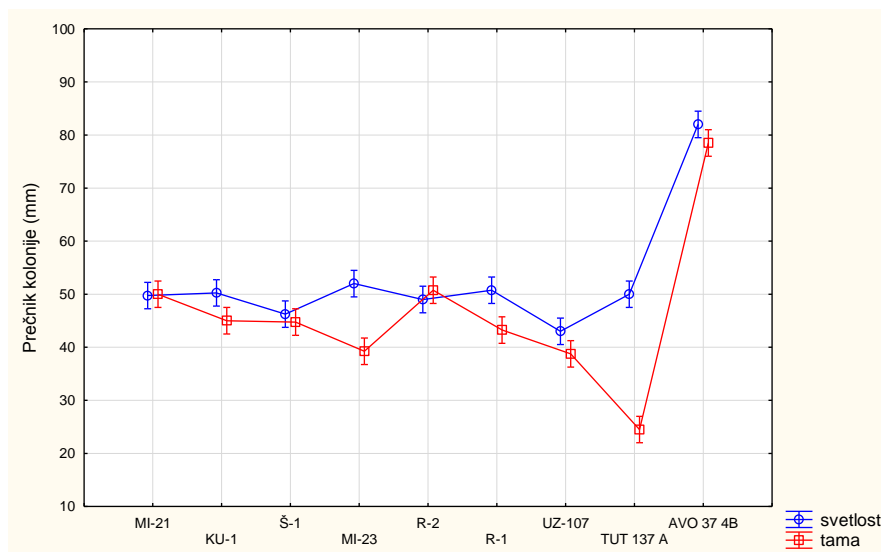
Kako je prikazano u Tabeli 22, pri ispitivanju uticaja svetlosti na rast, najveći izvor variranja su izolati, zatim interakcija ispitivanih faktora (izolat*svetlost), dok je najmanji izvor variranja svetlost (smena dan/noć i tama). Međutim, oba faktora, i njihova interakcija imaju značajan uticaj na rast izolata.

Tabela 22. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *Colletotrichum* spp. posle 10 dana inkubacije u uslovima smene dan/noć i potpune tame

Izvor varanja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Izolat	9 686,3	8	1 210,8	195,32	0,00**
Svetlost	754,0	1	754,0	121,63	0,00**
Izolat*Svetlost	1 110,6	8	138,8	22,39	0,00**
Greška	334,8	54	6,2		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) ; **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Uticaj svetlosti na rast izolata *Colletotrichum* spp. prikazan je na Grafikonu 6. Posle 10 dana inkubacije na sobnoj temperaturi izolat IV morfološke grupe AVO 374B ispoljava značajno veći rast u odnosu na sve ostale testirane izolate (I morfološka grupa) kako u uslovima smene dan/noć, tako i u uslovima tame. Većina ispitanih izolata ispoljava veći rast pri inkubaciji u uslovima smene dana i noći. Samo dva izolata, koja pripadaju morfološkoj grupi I, ispoljavaju veći rast u uslovima tame, ali ne statistički značajno (MI-21 i R-2). Svi ispitivani izolati sporulišu i u uslovima smene dan/noć i u uslovima tame.



Grafikon 6. Rast izolata *Colletotrichum* sp. posle 10 dana inkubacije na KDA podlozi na sobnoj temperaturi u uslovima svetlosti i tame

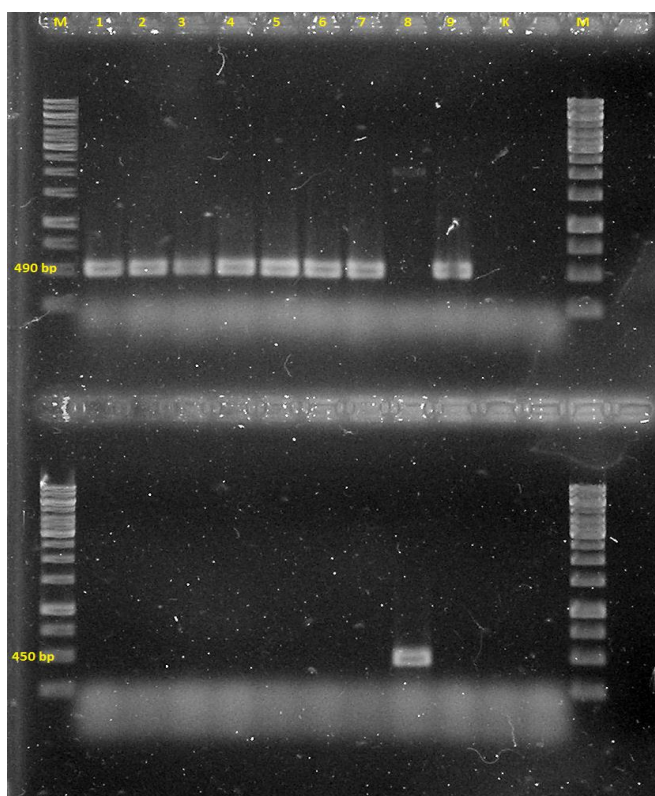
Nije utvrđena pravilnost u ponašanju izolata iz različitih morfoloških grupa u uslovima smene dana i noći i u uslovima tame te se ovaj kriterijum ne može uzeti u obzir za diferencijaciju izolata do nivoa vrste.

6.4. Molekularna identifikacija izolata *Colletotrichum* spp.

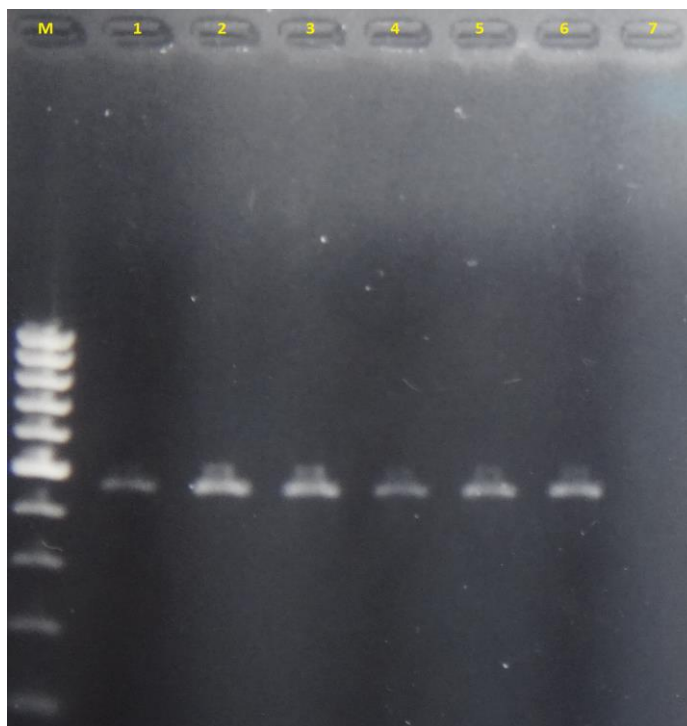
6.4.1. Identifikacija primenom prajmera specifičnih za vrstu

Nakon uspešne ekstrakcije DNK ispitivanih izolata, molekularnom analizom 33 dobijena izolata izvršenoj prema modifikovanoj metodi Sreenivasaprasad i sar. (1996) i Lewis Ivey i sar. (2004) identifikovano je 28 izolata vrste *C. acutatum* i pet izolata vrste *C. gloeosporioides* koji su poreklom sa različitih lokaliteta (Tabela 23).

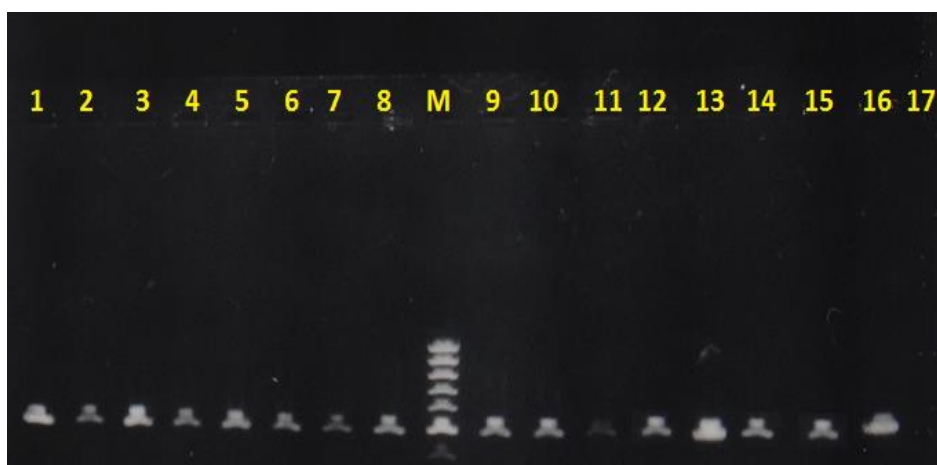
Veličine amplifikovanih PCR produkata iznose 490 bp za *C. acutatum* (Slika 21 i 23) i 450 bp za *C. gloeosporioides* (Slika 21 i 22), što je utvrđeno vizuelizacijom produkata razdvojenih elektroforezom u agaroznom gelu obojenom etidijumbromidom na UV-transiluminatoru pomoću 1 kb DNK markera. Za pozitivne kontrole koje su predstavljali referentni izolati, za *C. acutatum* (TUT 137A) i za *C. gloeosporioides* (AVO 374B), takođe su amplifikovani produkti odgovarajuće veličine (490 bp i 450 bp, respektivno). U svim izvedenim reakcijama u koloni sa negativnom kontrolom (PCR smeša bez unete DNK) nije zabeležena amplifikacija.



Slika 21. Vizuelizacija PCR produkata dobijenih primenom prajmera specifičnih za vrstu (CaInt2/ITS4 za *C. acutatum* i CgInt/ITS4 za *C. gloeosporioides*) na agaroznom gelu: kolone 1-7 izolati Š-1, KU-1, MI-21, MI-23, R-2, R-1 i UZ-107; kolona 8 referentni izolat *C. gloeosporioides* izolat AVO 37 4B; kolona 9 referentni izolat *C. acutatum* TUT 137 A; K- kontrola; M-1kb marker



Slika 22. Vizuelizacija PCR produkata dobijenih primenom prajmera specifičnog za vrstu (CgInt/ITS4 za *C.gloeosporioides*) na agaroznom gelu: kolone 1-5 izolati SB-1, BV-4, TV-2, Č-2 i MR-1; kolona 6 referentni izolat *C. gloeosporioides* AVO 37 4B; kolona 7 - kontrola; kolona 8 – referentni izolat *C. acutatum* TUT 137A; kolona M-1kb marker.



Slika 23. Vizuelizacija PCR produkata dobijenih primenom prajmera specifičnog za vrstu (CaInt2/ITS4 za *C. acutatum*) na agaroznom gelu: kolone 1-16 izolati MR-10, TV-5, LP-9, BV-11, ME-7, Č-31, I-7, UN-11, KU-14, B-4, B-12, B-7, K-4, HA-3, TUT 137A, Č-14 kolona M-1kb marker; kolona 17 - kontrola.

Svi izolati I, II i III morfološke grupe identifikovani su kao *C. acutatum*, dok su izolati IV morfološke grupe identifikovani kao *C. gloeosporioides*, čime je utvrđeno postojanje velike morfološke varijabilnosti između izolata vrste *C. acutatum*.

Tabela 23. Identifikacija izolata *Colletotrihum* spp. primenom prajmera specifičnih za vrstu

Izolat	Prajmeri forward/revers		Vrsta	Lokalitet
	CaInt2/ITS4	CgInt/ITS4		
R-1	+	-	<i>C. acutatum</i>	Radmilovac
R-2	+	-	<i>C. acutatum</i>	Radmilovac
MI-23	+	-	<i>C. acutatum</i>	Mirosaljci
MI-21	+	-	<i>C. acutatum</i>	Mirosaljci
KU-1	+	-	<i>C. acutatum</i>	Kukujevci
KU-14	+	-	<i>C. acutatum</i>	Kukujevci
HA-3	+	-	<i>C. acutatum</i>	Hajdukovo
B-7	+	-	<i>C. acutatum</i>	Banoštor
MR-317	+	-	<i>C. acutatum</i>	Mala Remeta
SB-12	+	-	<i>C. acutatum</i>	Soko Banja
I-7	+	-	<i>C. acutatum</i>	Hipermarket „Idea“
UZ-107	+	-	<i>C. acutatum</i>	Uzići
Š-1	+	-	<i>C. acutatum</i>	Šabac
UN-11	+	-	<i>C. acutatum</i>	Hipermarket „Univerexport“
TV-5	+	-	<i>C. acutatum</i>	Tavankut
ME-7	+	-	<i>C. acutatum</i>	Hipermarket „Merkator“
LP-8	+	-	<i>C. acutatum</i>	Tržnica „Limanska Pijaca“
Ć-13	+	-	<i>C. acutatum</i>	Čelarevo
Č-14	+	-	<i>C. acutatum</i>	Čelarevo
Č-30	+	-	<i>C. acutatum</i>	Čelarevo
Č-31	+	-	<i>C. acutatum</i>	Čelarevo
BV-6	+	-	<i>C. acutatum</i>	Bački Vinogradi
LP-9	+	-	<i>C. acutatum</i>	Tržnica „Limanska Pijaca“
K-4	+	-	<i>C. acutatum</i>	Kać
B-4	+	-	<i>C. acutatum</i>	Banoštor
Č-3	+	-	<i>C. acutatum</i>	Čelarevo
BV-11	+	-	<i>C. acutatum</i>	Bački Vinogradi
MR-10	+	-	<i>C. acutatum</i>	Mala Remeta
TV-2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	Tavankut
MR-1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	Mala Remeta
BV-4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	Bački Vinogradi
SB-1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	Soko Banja
Č-2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	Čelarevo

+ označava pozitivnu reakciju sa prajmerima navedenim u zaglavlju tabele a - negativnu

6.4.2. Kloniranje sekvenci rDNK-ITS regiona

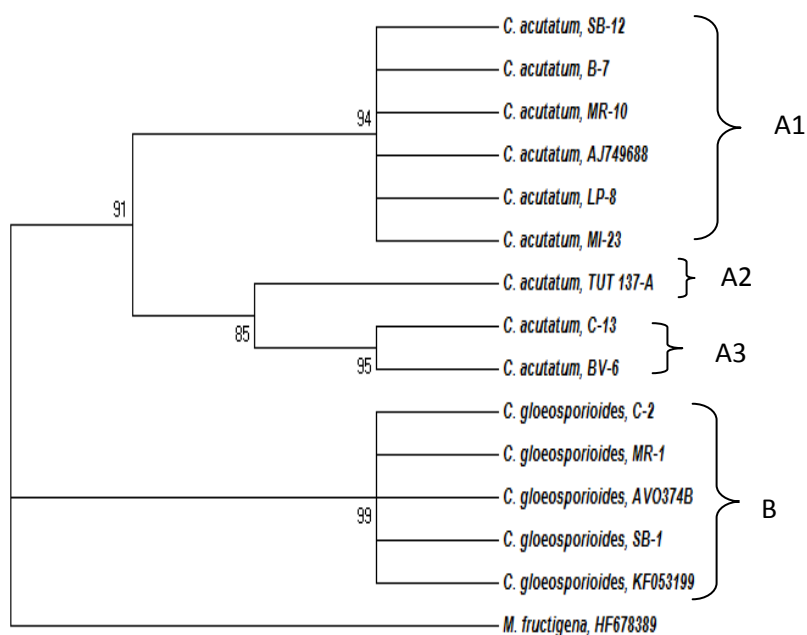
ITS region ribozomalne DNK deset reprezentativnih izolata (I, II, III, i IV morfološka grupa) i dva referentna izolata amplifikovan je primenom prajmera ITS1 i ITS4. Dobijeni amplifikovani produkti *Colletotrichum* spp. izolata su veličine oko 600 bp, što je u skladu sa podacima Freeman i sar. (2001) i Culebras i sar. (2003).

6.4.3. Filogenetska analiza

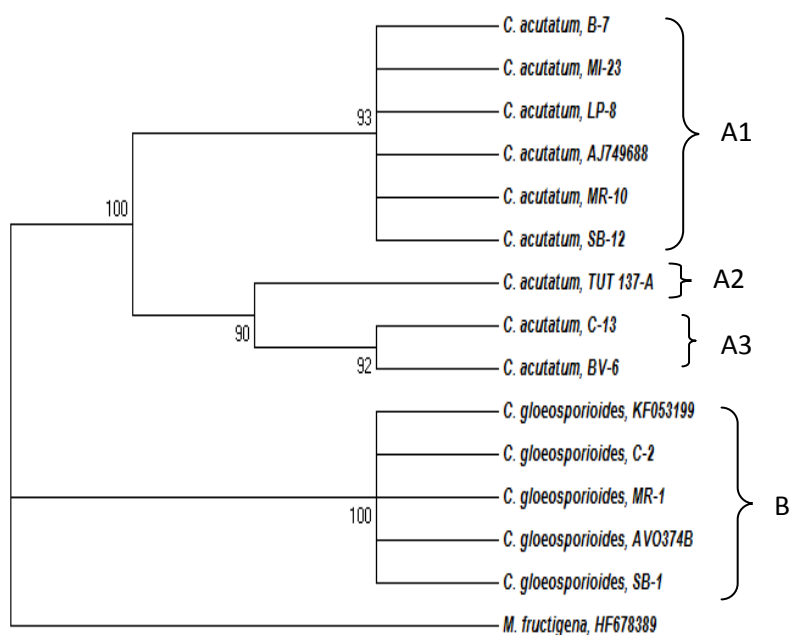
Na osnovu ClustalW programa, u okviru programskog paketa BioEdit utvrđeno je da su pikovi dobijenih sekvenci dobro vidljivi i da ne dolazi do njihovog međusobnog preklapanja, te je zaključeno da su sekvence dobrog kvaliteta i da se može pristupiti njihovoj analizi. Nakon poravnavanja sekvenci u istom programu određena je konsenzus sekvenca sa ukupnom dužinom, uključujući prazna mesta (gap - *engl.*), od 545bp.

U cilju filogenetičke analize sekvenci konstruisana su filogenetička stabla korišćenjem metoda maksimalne sličnosti (Maximum Likelihood Evolutionary Distance), kao i metoda maksimalne parasimonije (Maximum Parsimony Method), uz bootstrap analizu i konstruisanje konsenzus dendograma (Slike 24 i 25, respektivno). Na osnovu filogenetskog stabla izrađenog primenom metode maksimalne sličnosti, analizom sopstvenih (bootstrap) replikacija grananja dobijena je prosečna bootstrap vrednost 92,8%, a stabla izrađenog metodom maksimalne parasimonije 95%.

Primenom metode maksimalne parasimonije (Slika 25) dobijeni su jasniji rezultati o genetičkoj divergentnosti ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. Svi *Colletotrichum* spp. izolati se sa 100% bootstrap vrednosti odvajaju od vrste *M. fructigena* (broj u Gen Banci: HF678389) koja je korišćena kao outgroup vrsta. Analzom dendograma dobijenog ovom metodom zaključujemo da se svi izolati *C. acutatum* sa 100% bootstrap vrednosti odvajaju od *C. gloeosporioides*. Izolati *C. gloeosporioides* pripadaju istom genetičkom klasteru zajedno sa sekvencom *C. gloeosporioides* koja je preuzeta iz Gen Banke (Broj u Gen Banci: KF053199) sa 100% bootstrap vrednosti. U okviru *C. acutatum* jasno se izdvajaju tri klastera. Jedan klaster čine izolati BV-6, Č-13 i TUT 137A sa visokom bootstrap vrednošću od 90% u okviru koga se izdvaja još jedan klaster sa visokom bootstrap vrednošću od 92% koji čine hromogeni izolati *C. acutatum* (BV-6 i Č-13). Treći klaster sa visokom bootstrap vrednošću od 93% u koji spada sekvenca *C. acutatum* koja je preuzeta iz GenBanke (Broj u Gen Banci: AJ749688) čine nehromogeni izolati B-7, SB-12, MR-10, MI-23 i LP-8.



Slika 24. Filogenetičko stablo izrađeno primenom metode maksimalne sličnosti na osnovu ITS1-5.8S-ITS2 rDNK koje pokazuje mesto ispitivanih *Colletotrichum* izolata u odnosu na referentne sekvence povučene iz svetske banke gena (GenBank) (*C. acutatum* – AJ749688 i *C. gloeosporioides* – KF053199). Bootstrap vrednosti (1000 replikacija) su prikazane na mestima grananja.



Slika 25. Filogenetičko stablo izrađeno primenom metode maksimalne parasimonije na osnovu ITS1-5.8S-ITS2 rDNK koje pokazuje mesto ispitivanih *Colletotrichum* izolata u odnosu na referentne sekvence povučene iz svetske banke gena (GenBank) (*C. acutatum* – AJ749688 i *C. gloeosporioides* – KF053199). Bootstrap vrednosti (1000 replikacija) su prikazane na mestima grananja.

U cilju provjere genetičke udaljenosti između četiri definisana klastera, izolati su podjeljeni u grupe (grupa A1 - nehromogeni izolati *C. acutatum* B-7, MI-23, LP-8, AJ749688, MR-10, SB-12; grupa A2 – nehromogeni izolat *C. acutatum* TUT 137A; grupa A3 - hromogeni izolati *C. acutatum* BV-6 i Č-13; grupa B: izolati *C. gloeosporioides* KF053199, Č-2, MR-1, AVO 374B, SB-1). U programskom paketu MEGA izračunata je prosečna genetička udaljenost između analiziranih grupa (Tabela 24). Najveća genetička udaljenost utvrđena je između klastera A3 (hromogeni izolati *C. acutatum*) i klastera B (*C.gloeosporioides*), a najmanja između A2 i A3 (nehromogeni izolat *C. acutatum* TUT 137A i hromogeni izolati *C. acutatum*).

Tabela 24. Prosečna genetička udaljenost između genetičkih grupa dobijenih analizom 5,8S-ITS regiona rDNK

Grupe izdvojene filogenetskom analizom		Genetička udaljenost (0,01 U) ± Sd
A1	B	0,092±0,014
A2	B	0,098±0,015
A3	B	0,100±0,015
A1	A2	0,025±0,007
A1	A3	0,024±0,007
A2	A3	0,014±0,005

*A1, A2 i A3 – *C. acutatum*; B – *C. gloeosporioides*; ±Sd-standardna devijacija

6.5. Biološka zaštita plodova jabuke od *Colletotrichum* spp.

6.5.1. Antifungalno delovanje *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* i *L. mesenteroides* na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* *in vitro*

Rezultati uticaja mikroorganizama *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* i *L. mesenteroides* na rast micelije *C. acutatum* (izolati HA-3 i K-4) i na *C. gloeosporioides* (izolat MR-1) obrađeni su dvofaktorijalnom analizom varijanse (Tabela 25). Tretmani predstavljaju najveći izvor variranja inhibicije rasta micelije, ali postoje i značajne razlike u inhibiciji rasta micelije između izolata.

Tabela 25. Dvofaktorijalna analiza varijanse inhibicije rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i *C. gloeosporioides* (MR-1)

Izvor variranja	Suma kvadrata SS	Stepeni slobode Df	Sredina kvadrata MS	Količnik F	Nivo značajnosti P
Tretman	7 430,85	7	1 061,55	1461,40	0,00**
Izolat	88,67	2	44,34	61,04	0,00**
Tretman*Izolat	369,04	14	26,36	36,29	0,00**
Greška	87,17	120	0,73		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Dankanovim testom (Tabela 26) utvrđeno je da *S. hygroscopicus* uzrokuje statistički značajno veću inhibiciju rasta micelije sva tri testirana izolata u odnosu na ostale ispitane mikroorganizme i kontrolu. Generalno, izolati HA-3 i MR-1 ispoljavaju višu osetljivost na testirane mikroorganizme i fungicid Zato 50 WG u odnosu na izolat K-4.

Kod oba izolata *C. acutatum*, u varijanti sa fungicidom Zato 50 WG registrovana je statistički značajno veća inhibicija rasta micelije u odnosu na *S. hygroscopicus*, dok je kod izolata *C. gloeosporioides* inhibicija u varijanti sa fungicidom Zato 50 WG na istom nivou značajnosti kao i u varijanti sa *S. hygroscopicus*.

S. aureus uzrokuje statistički značajnu inhibiciju rasta micelije sva tri izolata u poređenju sa kontrolom, ali statistički značajno nižu u odnosu na *B. cereus* i *S. hygroscopicus*.

Primenom *B. cereus* postiže se inhibicija rasta micelije samo kod izolata *C. gloeosporioides* koja je statistički značajna u odnosu na kontrolu, ali na statistički značajno nižem nivou od *S. hygroscopicus*.

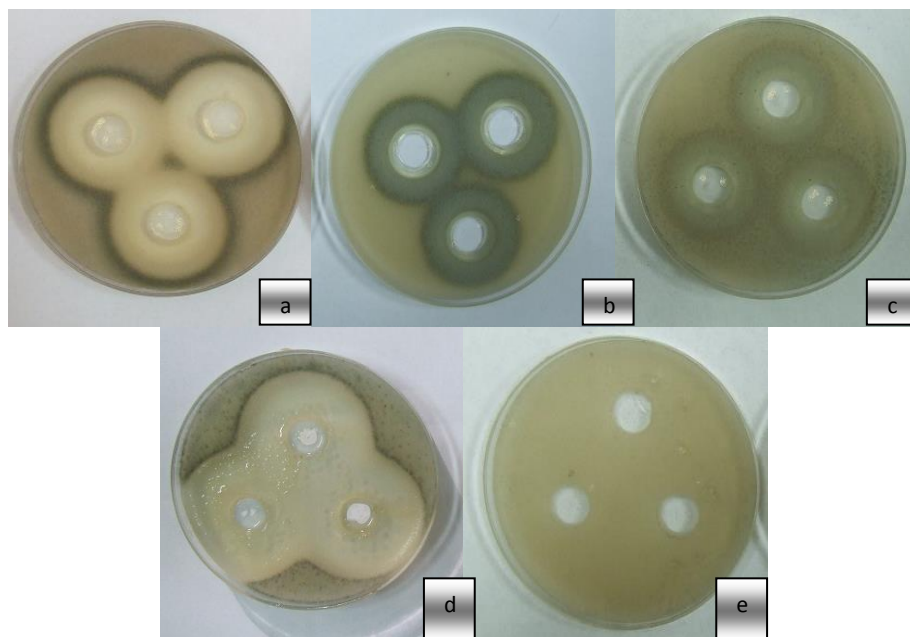
S. cerevisiae i *L. mesenteroides* ne ispoljavaju inhibitorno dejstvo na rast micelije izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*.

Tabela 26. Dankanov test: srednje vrednosti poluprečnika zone inhibicije rasta micelije (\pm Sd) izolata *Colletotrichum* spp. prouzrokovane delovanjem ispitanih mikroorganizama

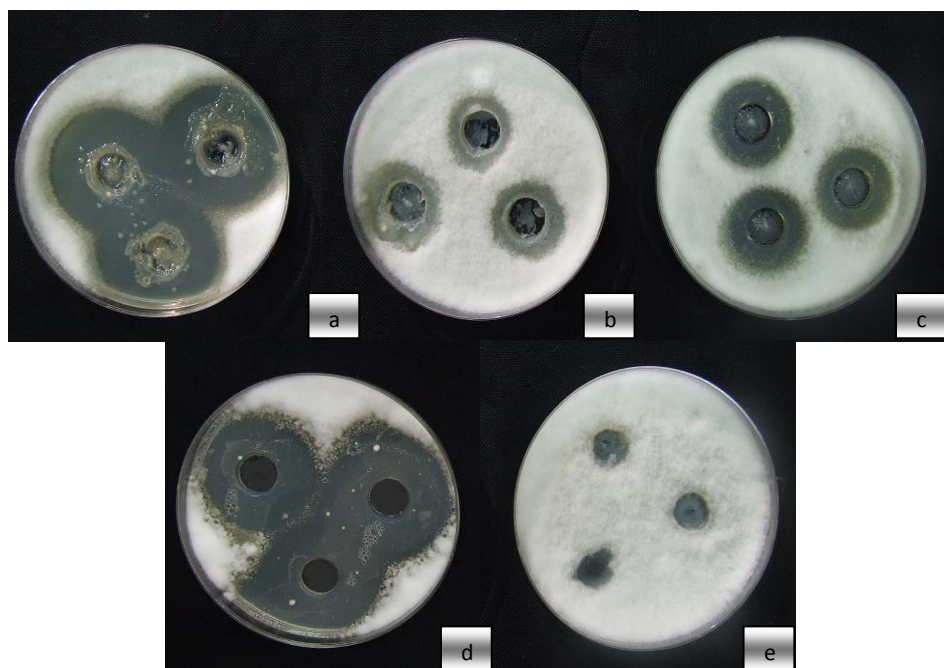
Tretman	Izolat	Poluprečnik zone inhibicije (mm)
<i>S. hygroscopicus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	18,50 \pm 0,84 b
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	15,00 \pm 0,00 e
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	17,17 \pm 0,75 c
<i>S. aureus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	3,83 \pm 0,41 g
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	2,34 \pm 0,58 h
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	4,00 \pm 1,26 g
<i>S. cerevisae</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 i
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 i
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 i
<i>B. cereus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 i
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 i
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	9,67 \pm 0,82 f
<i>P. aeruginosa</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,34 \pm 0,11 i
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 i
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 i
<i>L. mesenteroides</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 i
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 i
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 i
Zato 50 WG	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	19,67 \pm 0,52 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	16,17 \pm 1,33 d
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	18,00 \pm 2,19 bc
Kontrola	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 i
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 i
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 i

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) –standardna devijacija

Inhibicija rasta micelije *C. acutatum* (izolat HA-3) i *C. gloeosporioides* (izolat MR-1) postignuta mikroorganizmima koji su ispoljili antifungalnu aktivnost na ove izolate prikazana je na slikama 26 i 27, respektivno.



Slika 26. Inhibicija rasta micelije *C. acutatum* (izolat HA-3) primenom različitih tretmana: (a) *S. hygroscopicus*; (b) *S. aureus*; (c) *P. aeruginosa*; (d) Zato 50 WG; (e) Kontrola



Slika 27. Inhibicija rasta micelije *C. gloeosporioides* (izolat MR-1) primenom različitih tretmana (a) *S. hygroscopicus*; (b) *S. aureus*; (c) *B. cereus*; (d) Zato 50 WG; (e) Kontrola

6.5.2. Antifungalno delovanje *B. subtilis* (sojevi N 146, ST 1/III, Č 13 i QST 713) na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* in vitro

Na osnovu rezultata faktorijalne analize varijanse (Tabela 27) utvrđeno je da su najveći izvor variranja pri inhibiciji rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i *C. gloeosporioides* (MR-1) tretmani, ali i da izolati značajano utiču na zavisno promenljivu, odnosno rast micelije ($p < 0,01$).

Tabela 27. Dvofaktorijalna analiza varijanse inhibicije rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i *C. gloeosporioides* (MR-1)

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	P
Tretman	3 636,04	5	727,21	527,81	0,00**
Izolat	38,46	2	19,23	13,96	0,00**
Soj Tretman*Izolat	18,65	10	1,86	1,35	0,22
Greška	124,00	90	1,38		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Kod sva tri ispitivana izolata nije utvrđena statistički značajna razlika u inhibiciji rasta micelije primenom različitih sojeva *B. subtilis*. Svi testirani sojevi uzrokuju statistički značajno veću inhibiciju rasta micelije sva tri izolata u odnosu na kontrolu. Međutim, inhibicija rasta micelije uzrokovana primenom fungicida Zato 50 WG je na statistički značajno višem nivou u odnosu na sve ispitane sojeve *B. subtilis*.

Izolat *C. acutatum* (K-4) ispoljava nižu osetljivost na sve primenjene tretmane u odnosu na druga dva izolata, ali ne uvek statistički značajnu (Tabela 28).

Tabela 28. Dankanov test: srednje vrednosti poluprečnika zone inhibicije rasta izolata *Colletotrichum* spp. (\pm Sd) prouzrokovane delovanjem ispitanih sojeva *B. subtilis*

Tretmani	Izolat	Poluprečnik zone inhibicije (mm)
<i>B. subtilis</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	15,17 \pm 0,75 bc
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	14,00 \pm 0,63 cd
soj N 146	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	15,33 \pm 1,21 bc
<i>B. subtilis</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	15,33 \pm 0,82 bc
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	14,17 \pm 1,83 cd
soj ST 1/III	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	14,33 \pm 0,82 cd

Nastavak tabele 28.

	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	16,17 ±0,75 b
<i>B. subtilis</i>	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	14,33 ±1,63 cd
soj Č 13	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	14,83 ±1,47 bc
	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	15,50 ±2,35 bc
<i>B. subtilis</i>	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	13,17 ±1,17 d
soj QST 713	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	14,50 ±1,52 cd
	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	18,33 ±1,21 a
Zato 50 WG	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	16,17 ±0,75 b
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	18,33 ±1,03 a
	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 ±0,00 e
Kontrola	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 ±0,00 e
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 ±0,00 e

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (±Sd) –standardna devijacija

Na slici 28 prikazana je inhibicija rasta micelije izolata MR-1 (*C. gloeosporioides*) postignuta primenom ispitivanih sojeva *B. subtilis*.



Slika 28. Inhibicija rasta micelije izolata MR-1 (*C. gloeosporioides*) primenom ispitivanih tretmana: *B. subtilis* soj N146 (a); *B. subtilis* soj ST 1/III (b); *B. subtilis* soj Č 13 (c); *B. subtilis* soj QST 713 (d); Zato 50 WG (e); Kontrola (f).

6.5.3. Antifungalno delovanje *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *B. cereus* i *P. aeruginosa* na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* *in vivo*

Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse pokazali su da su tretmani primenjeni na plodovima jabuke najveći izvor variranja nekroze uzrokovane izolatima *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i *C. gloeosporioides* (MR-1). Takođe, prečnik nekroze značajno varira i u zavisnosti od izolata kojima je izvršena veštačka inokulacija plodova (Tabela 29).

Tabela 29. Dvofaktorijalna analiza varijanse nekroze razvijene na tretiranim, veštački inokulisanim plodovima jabuke posle 14 dana inkubacije

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Tretman	3 512,71	5	702,54	151,61	0,00**
Izolat	82,78	2	41,39	8,93	0,00**
Tretman*Izolat	118,54	10	11,85	2,56	0,01*
Greška	250,24	54	4,63		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Dankanov test (Tabela 30) je pokazao da je prečnik nekroze na plodovima tretiranim *S. hygroscopicus* statistički značajno manji u odnosu na nekrozu na plodovima iz drugih tretmana, osim kod preparata Zato 50 WG sa kojim je na istom nivou značajnosti.

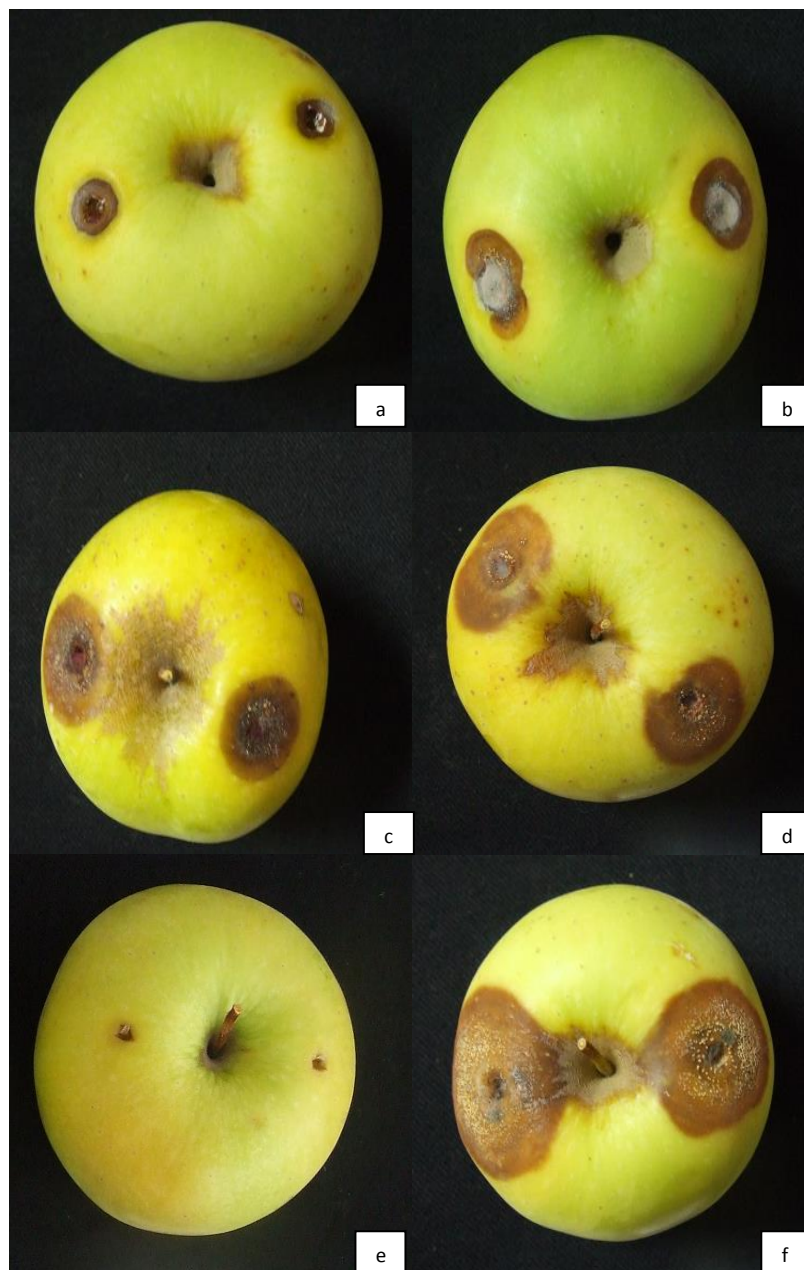
S. aureus, *B. cereus* i *P. aeruginosa* uzrokuju statistički značajno manji razvoj nekroze plodova veštački inokulisanih sa izolatima K-4 (*C. acutatum*) i MR-1 (*C. gloeosporioides*) u odnosu na kontrolu, ali je nekroza na statistički značajno višem nivou u odnosu na varijantu u kojoj je primenjen fungicid Zato 50 WG. Kod tretmana sa *B. cereus* i *P. aeruginosa*, u slučaju veštačke inokulacije sa HA-3 (*C. acutatum*), razvijena nekroza je na nivou značajnosti sa kontrolom.

Tabela 30. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika nekroze (\pm Sd) (mm) na tretiranim, veštački inokulisanim plodovima jabuke posle 14 dana inkubacije

Tretmani	Izolat	Prečnik nekroze (\pm Sd)
<i>S. hygroscopicus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,75 \pm 0,50 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	2,00 \pm 0,82 a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	1,75 \pm 0,50 a
<i>S. aureus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	13,00 \pm 2,94 cd
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	11,25 \pm 1,50 c
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	7,25 \pm 0,50 b
<i>B. cereus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	19,25 \pm 1,71 f
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	15,00 \pm 2,45 de
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	13,50 \pm 1,91 cd
<i>P. aeruginosa</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	17,00 \pm 1,83 ef
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	13,00 \pm 5,10 cd
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	12,00 \pm 3,46 cd
Zato 50 WG	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Kontrola	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	18,25 \pm 2,75 ef
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	18,75 \pm 2,06 f
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	18,00 \pm 2,31 ef

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) – standardna devijacija

Stepen razvijene nekroze na plodovima tretiranim kultivacionim tečnostima mikroorganizama *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *B. cereus* i *P. aeruginosa* i fungicidom Zato 50 WG, veštački inokulisanim sa *C. acutatum* (izolat K-4) prikazan je na Slici 29.



Slika 29. Razvoj nekroze na tretiranim plodovima, veštački inokulisanim sa *C. acutatum* (K-4): (a) *S. hygroscopicus*; (b) *S. aureus*; (c) *B. cereus*; (d) *P. aeruginosa*; (e) Zato 50 WG; (f) Kontrola

Na plodovima tretiranim sa kultivacionim tečnostima mikroorganizma i fungicidom Zato 50 WG, bez inokulacije patogenima, ne dolazi do promena koje bi ukazivale na negativan efekat tretmana na plodove jabuke.

6.5.4. Antifungalno delovanje *B. subtilis* (sojevi N 146, ST 1/III, Č 13 i QST 713) na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* in vivo

Obradom dobijenih podataka dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su najveći izvor variranja tretmani primenjeni na plodovima jabuke. Izolati *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i *C. gloeosporioides* (MR-1), kojima je vršena veštačka inokulacija plodova, takođe su značajan izvor variranja zavisno promenljive, kao i njihova interakcija (Tabela 31).

Tabela 31. Dvofaktorijalna analiza varijanse nekroze razvijene na tretiranim, veštački inokulisanim plodovima jabuke posle 14 dana inkubacije

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Tretman	15 007,81	5	3 001,56	388,34	0,00**
Izolat	581,29	2	290,65	37,60	0,00**
Tretman*Izolat	593,38	10	59,34	7,68	0,00**
Greška	973,87	126	7,73		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Kao što je prikazano u Tabeli 32, testirani sojevi *B. subtilis* uzrokuju statistički značajno manji razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima u odnosu na kontrolu. Međutim, nekroza razvijena na plodovima tretiranim ispitivanim sojevima *B. subtilis* je na statistički značajno višem nivou u odnosu na plodove koji su tretirani fungicidom Zato 50 WG.

Prema Dankanovom testu, statistički značajno višu osetljivost na testirane sojeve bakterija, ispoljava izolat *C. gloeosporioides* u odnosu na oba izolata *C. acutatum* (osim u slučaju soja ST 1/III). Soj QST 713, ispoljava najvišu inhibiciju razvoja nekroze uzrokovane izolatima *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* (HA-3), s tim što je kod izolata *C. gloeosporioides* razlika statistički značajna. Statistički značajno najviša inhibicija za izolat *C. acutatum* (K-4) registrovana je za soj ST 1/III.

Tabela 32. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika nekroze (\pm Sd) (mm) na tretiranim, veštački inokulisanim plodovima jabuke posle 14 dana inkubacije

Tretmani	Izolat	Prečnik nekroze (\pm Sd)
<i>B. subtilis</i> soj N 146	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	16,88 \pm 2,53 d
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	15,88 \pm 2,64 d
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	12,38 \pm 2,50 c
<i>B. subtilis</i> soj ST 1/III	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	15,38 \pm 4,07 d
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	12,38 \pm 3,70 c
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	10,75 \pm 2,05 c
<i>B. subtilis</i> soj Č 13	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	22,38 \pm 2,45 e
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	22,75 \pm 3,65 e
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	12,25 \pm 2,31 c
<i>B. subtilis</i> soj QST 713	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	17,00 \pm 4,54 d
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	15,63 \pm 4,63 d
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	7,50 \pm 2,67 b
Zato 50 WG	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Kontrola	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	34,38 \pm 1,19 f
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	33,88 \pm 2,80 f
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	35,25 \pm 1,39 f

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) – standardna devijacija

Uticaj ispitanih sojeva *B. subtilis* na razvoj nekroze na plodovima veštački inokulisanim sa *C. acutatum* (izolat HA-3) prikazan je na Slici 30.



Slika 30. Razvoj nekroze na plodovima tretiranim kultivacionom tečnošću različitih sojeva *B. subtilis* inokulisanih sa *C. acutatum* (izolat: HA-3)
 (a) soj N146; (b) soj ST 1/III; (c) soj Č-13; (d) soj QST 713; (e) Zato 50 WG; (f) Kontrola

Na plodovima tretiranim sa kultivacionim tečnostima mikroorganizma i fungicidom Zato 50 WG, bez veštačke inokulacije patogenima, ne dolazi do promena koje bi ukazivale na negativan efekat tretmana na plodove jabuke.

6.5.5. Optimizacija uslova kultivacije *S. hygroscopicus* u cilju ostvarenja maksimalne antifungalne aktivnosti na *Colletotrichum* spp.

Budući da od svih ispitanih mikroorganizama *S. hygroscopicus* ispoljava najjače inhibitorno delovanje na ispitivane izolate *in vitro* i *in vivo*, ovaj mikroorganizam je odabran za optimizacione oglede. Ovim ogledima su definisani uslovi gajenja koji obezbeđuju maksimalno antifungalno delovanje *S. hygroscopicus*, uz minimalne troškove proizvodnje.

6.5.5.1. Optimizacija sastava hranljive podloge za kultivaciju *S. hygroscopicus*

Prvi korak optimizacije: variranje izvora ugljenika i azota. Simultano variranje izvora ugljenika i azota statistički značajano utiče na zone inhibicije rasta *C. acutatum* (HA-3) i *C. gloeosporioides* (MR-1) (Tabele 33 i 34).

Tabela 33. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3)

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Izvori C i N	1 673,77	12	139,48	159,99	0,00**
Greška	56,67	65	0,87		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Tabela 34. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *C. gloeosporioides* (MR-1)

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Izvori C i N	1 771,42	12	147,62	126,53	0,00**
Greška	75,83	65	1,17		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Inhibicija rasta micelije oba testirana izolata primenom *S. hygroscopicus* je statistički značajno veća u odnosu na kontrolu, nezavisno od sastava podloge korišćene za kultivaciju. Podloga koja sadrži glicerol kao izvor ugljenika i ekstrakt kvasca kao izvor azota obezbeđuje najjaču antifungalnu aktivnost proizvodnog mikroorganizma za oba izolata u odnosu na ostale testirane podloge. Uočene su statistički značajne razlike u

zonama inhibicije kod izolata *C. acutatum* između podloge sa glicerolom i ekstraktom kvasca i svih ostalih podloga (Tabela 35; Slika 31).

Tabela 35. Dankanov test: srednje vrednosti poluprečnika zone inhibicije rasta micelije(\pm Sd) izolata *C. acutatum* (HA-3)

Izvori ugljenika i azota	Poluprečnik zone inhibicije (mm)
glicerol+ekstrakt kvasca	18,83 \pm 0,98 a
glicerol+sojino brašno	17,67 \pm 1,51 b
glicerol+kukuruzno brašno	13,00 \pm 1,67 d
glicerol+amonijum sulfat	11,17 \pm 0,75 f
glukoza+ekstrakt kvasca	13,17 \pm 0,41 d
glukoza+sojino brašno	11,33 \pm 0,52 ef
glukoza+kukuruzno brašno	14,33 \pm 1,03 c
glukoza+amonijum sulfat	12,33 \pm 0,82 de
maltoza+ekstrakt kvasca	7,33 \pm 0,82 g
maltoza+sojino brašno	10,33 \pm 0,52 f
maltoza+kukuruzno brašno	10,33 \pm 1,03 f
maltoza+amonijum sulfat	6,83 \pm 0,75 g
Kontrola	0,01 \pm 0,00 h

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) – standardna devijacija

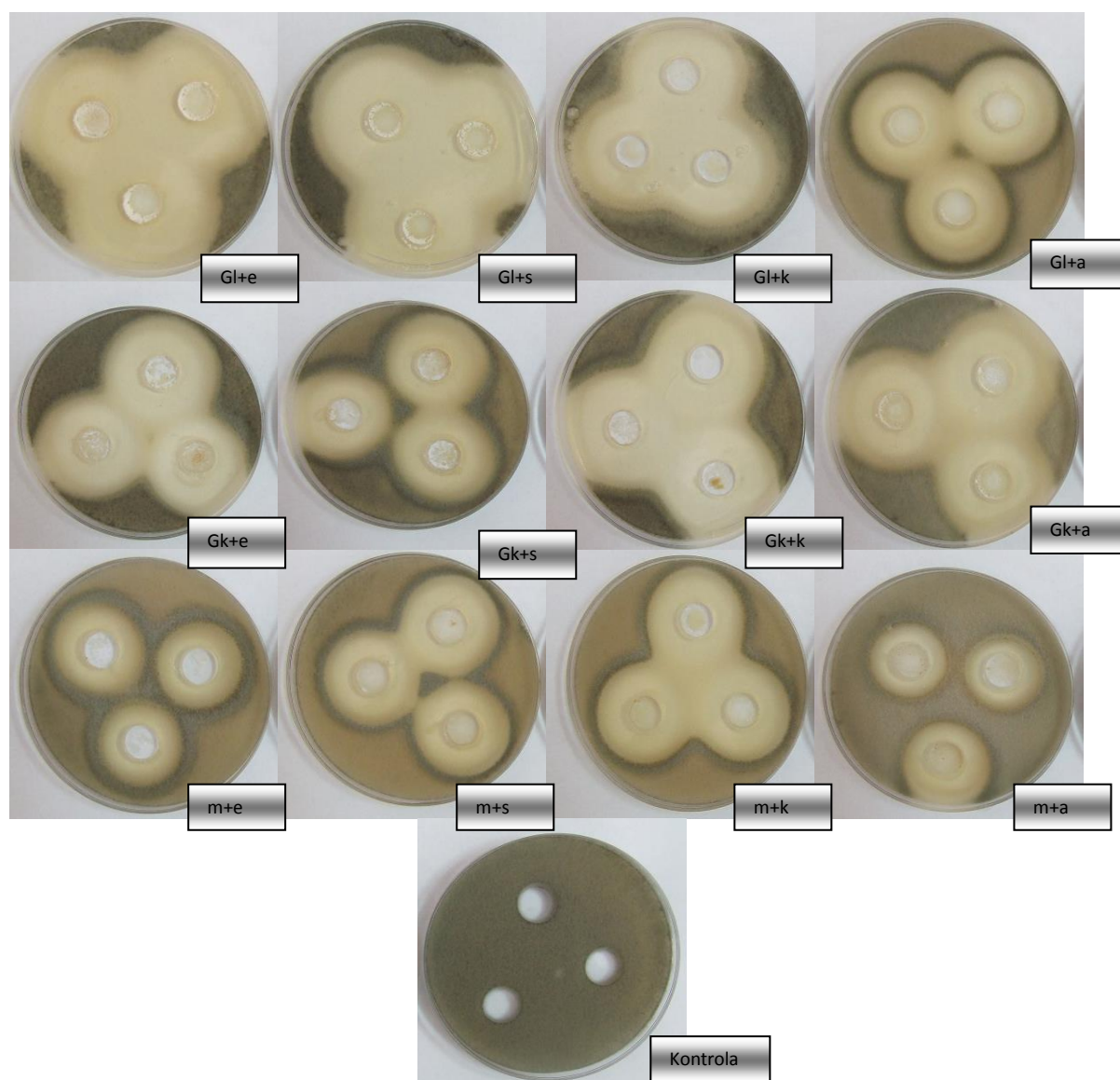
Kod izolata *C. gloeosporioides* nije uočena statistički značajna razlika u zonama inhibicije između podloge sa glicerolom i ekstraktom kvasca i podloge od glicerola i sojinog brašna. Međutim, dve pomenute podloge uzrokuju statistički značajno veću inhibiciju rasta izolata *C. gloeosporioides* u odnosu na sve preostale podloge (Tabela 36).

Tabela 36. Dankanov test: srednje vrednosti poluprečnika zone inhibicije rasta micelije(\pm Sd) izolata *C. gloeosporioides* (MR-1)

Izvori ugljenika i azota	Poluprečnik zone inhibicije (mm)
glicerol+ekstrakt kvasca	20,33 \pm 1,37 a
glicerol+sojino brašno	20,17 \pm 1,17 a
glicerol+kukuruzno brašno	14,67 \pm 1,63 b
glicerol+amonijum sulfat	12,83 \pm 0,75 cd
glukoza+ekstrakt kvasca	13,83 \pm 0,98 bc
glukoza+sojino brašno	11,67 \pm 0,52 d
glukoza+kukuruzno brašno	14,00 \pm 1,90 bc
glukoza+amonijum sulfat	14,83 \pm 0,75 b
maltoza+ekstrakt kvasca	14,17 \pm 1,17 bc
maltoza+sojino brašno	12,50 \pm 0,84 d
maltoza+kukuruzno brašno	12,33 \pm 0,52 d
maltoza+amonijum sulfat	9,83 \pm 0,98 e
Kontrola	0,01 \pm 0,00 f

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) – standardna devijacija

Kao rezultat ovih ogleda, podloga sa glicerolom kao izvorom ugljenika i ekstraktom kvasca kao izvorom azota izabrana je za dalju optimizaciju sa ciljem maksimizacije antifungalne aktivnosti *S. hygrosopicus* na *Coletotrichum* spp., uz minimalizovanje proizvodnih troškova.



Slika 31. Inhibicije rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3) uzrokovane delovanjem *S. hygrosopicus* kultivisanog na podlogama sa različitim izvorima ugljenika i azota

Legenda: **gl** – glicerol; **gk** – glukoza; **m** – maltoza; **e** – ekstrakt kvasca; **s**-sojino brašno; **k**-kukuruzno brašno; **a** – amonijum sulfat

Drugi korak optimizacije: variranje količina ugljenika, azota i fosfora.

Kombinacije eksperimentalnih faktora (sastav podloge) dobijene na osnovu Box-Behnkenovog eksperimentalnog plana i odzivi (poluprečnik zone inhibicije rasta izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*) dobijeni posle izvođenja eksperimenata sumirani su u Tabeli 37.

Tabela 37. Kombinacije sastava podloge (faktora) i vrednosti poluprečnika zone inhibicije (odziva) nakon izvođenja eksperimenta

Glicerol	Faktori (g/l)		Odzivi (poluprečnik zone inhibicije (mm))	
	Ekstrakt kvasca	Fosfati	<i>C. acutatum</i> (izolat HA-3)	<i>C. gloeosporioides</i> (izolat MR-1)
15,00	17,50	1,00	20,12	18,67
10,00	30,00	1,00	13,88	10,79
20,00	5,00	1,00	21,25	21,58
10,00	5,00	1,00	21,82	22,46
15,00	17,50	1,00	18,98	16,33
10,00	17,50	0,50	19,83	16,92
15,00	17,50	1,00	19,83	15,75
20,00	17,50	1,50	20,68	16,92
10,00	17,50	1,50	18,70	17,21
15,00	5,00	0,50	21,82	21,88
15,00	5,00	1,50	20,97	19,83
20,00	17,50	0,50	15,58	10,50
15,00	30,00	1,50	19,55	17,79
20,00	30,00	1,00	14,17	7,58
15,00	30,00	0,50	11,62	6,42

Rezultati regresione analize dobijenih odziva prikazani su u Tabeli 38. Koeficijenti se odnose na apsolutne vrednosti.

Tabela 38. Koeficijenti regresione jednačine za dobijene vrednosti poluprečnika zone inhibicije (odzive)

Efekti	Poluprečnik zone inibicije <i>C. acutatum</i>		Poluprečnik zone inibicije <i>C.gloeosporioides</i>	
	Koeficijent regresije	p-vrednost	Koeficijent regresije	p-vrednost
Odsečak				
b ₀	28,9408*	0,0039	28,3059	0,0530
Linearni				
b ₁	0,2465	0,6942	0,7241	0,5603
b ₂	-0,4373*	0,0451	-0,8039	0,0553
b ₃	-11,7852	0,0543	-11,9748	0,2517
Kvadratni				
b ₁₁	-0,0331	0,1296	-0,0481	0,2372
b ₂₂	-0,0066	0,0727	-0,0007	0,9064
b ₃₃	-0,4717	0,8066	-1,3033	0,7311
Interakcija				
b ₁₂	0,0034	0,6449	-0,0093	0,5288
b ₁₃	0,6230*	0,0164	0,6130	0,1353
b ₂₃	0,3512*	0,0041	0,5368*	0,0115

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Rezultati ANOVA za odabrane odzive prikazani su u Tabeli 39. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije (0,973 i 0,958), koje su dobijene za sve odzive ukazuje na adekvatno fitovanje eksperimentalnih podataka polinomom drugog reda. Modeli polinoma drugog reda za oba posmatrana odziva su značajni pri nivou značajnosti 95% što potvrđuju F-vrednosti od 20,1943 za zonu inhibicije rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3) i 12,7714 za *C. gloeosporioides* (MR-1).

Tabela 39. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva

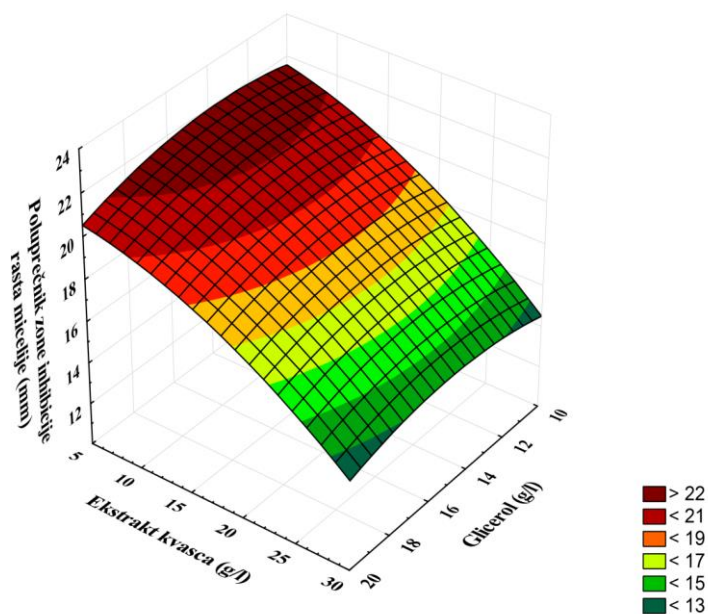
Odziv	Izvor								
	Rezidual			Model			F-value	p-value	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Poluprečnik zone inhibicije (<i>C. acutatum</i>)	5	3,8511	0,7702	9	139,9860	15,5540	20,1943	<0,0001	0,973
Poluprečnik zone inhibicije (<i>C. gloeosporioides</i>)	5	14,8326	2,9665	9	340,9804	37,8867	12,7714	<0,0001	0,958

DF – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – sredina kvadrata.

Matematički model za ispitivanje uticaja sastava podloge na inhibiciju rasta

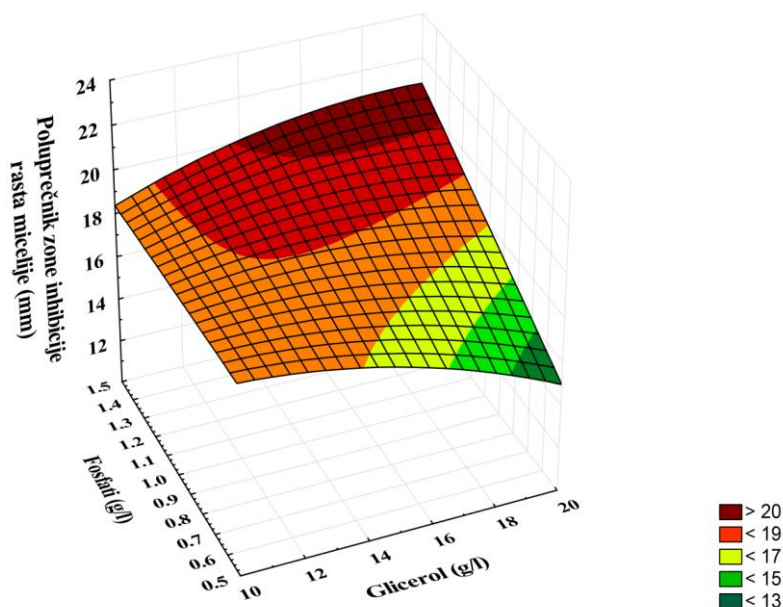
C. acutatum. Koeficijent determinacije za odziv poluprečnik zone inhibicije (mm) za izolat *C. acutatum* iznosi 0,973 što ukazuje na visoku korelaciju posmatranih i predviđenih vrednosti. O pojedinačnim efektima različitih parametara i njihovih interakcija može se diskutovati na osnovu značajnosti regresionih koeficijenata prikazanih u Tabeli 38. Statistički značajan uticaj na posmatrani odziv pri nivou značajnosti 95% (p -vrednost < 0,05) imaju linearni član količine ekstrakta kvasca, interakcija količine glicerola i fosfata i interakcija količine ekstrakta kvasca i fosfata.

Na Grafikonima 7a, 7b i 7c prikazani su efekti količine glicerola, ekstrakta kvasca i fosfata u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus* na zonu inhibicije rasta izolata *C. acutatum*, što je indirektni pokazatelj antifungalne aktivnosti mikroorganizma. Linearan uticaj sadržaja ekstrakta kvasca na antifungalnu aktivnost proizvodnog mikroorganizma je značajan ($p=0,045$), i njegova negativna vrednost (Tabela 38) ukazuje da ovaj nutrijent ima inhibitorski efekat na posmatrani odziv. Na osnovu rezultata prikazanih na Grafikonu 7a može se analizirati uticaj sadržaja glicerola i ekstrakta kvasca, pri srednjim vrednostima sadržaja fosfata od 1 g/l na antifungalno delovanje *S. hygroscopicus*. Sa povećanjem sadržaja ekstrakta kvasca u podlozi, antifungalno delovanje na *C. acutatum* se smanjuje. Najjača antifungalna aktivnost zabeležena je u slučaju primene količine ekstrakta kvasca od 5 do 10 g/l što obezbeđuje dovoljno azota za umnožavanje biomase, ali ograničava trajanje eksponencijalne faze. Pri primenjenim većim količinama ekstrakta kvasca usled dužeg trajanja eksponencijalne faze dolazi do značajnog iscrpljenja hranljive podloge pre početka stacionarne faze rasta tokom koje se odvija produkcija sekundarnih proizvoda metabolizma. Jasno je da sadržaj glicerola ima značajno slabiji uticaj na posmatrani odziv u odnosu na sadržaj ekstrakta kvasca. Sa konstantnim sadržajem fosfata (1 g/l), maksimalna antifungalna aktivnost se postiže sa sadržajem glicerola od 12-16 g/l.



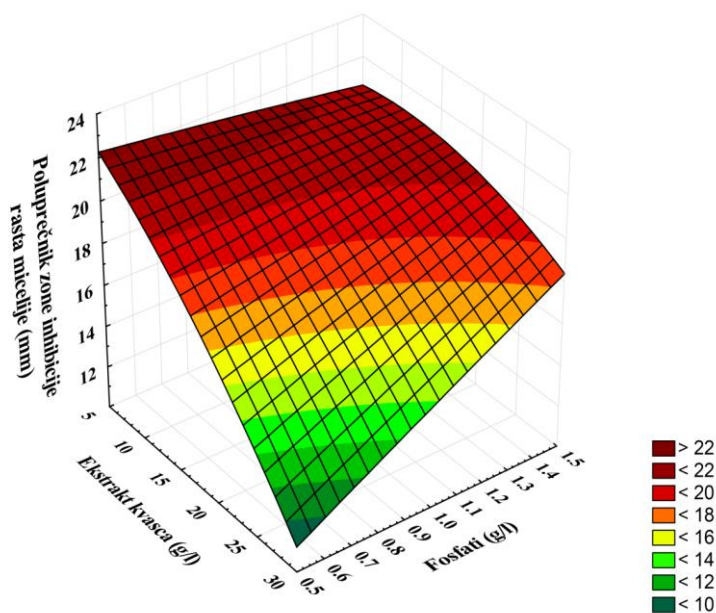
Grafikon 7a. Uticaj sadržaja ekstrakta kvasca i glicerola (pri prosečnom sadržaju fosfata od 1 g/l) u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*, na inhibiciju rasta izolata *C. acutatum*

Na Grafikonu 7b prikazan je efekat sadržaja glicerola i fosfata, sa prosečnim sadržajem ekstrakta kvasca 17,5 g/l. Interakcija između sadržaja glicerola i fosfata ima statistički značajan uticaj ($p=0,016$) na zonu inhibicije rasta *C. acutatum*. Pozitivna interakcija ova dva faktora (Tabela 38) ukazuje na njihov sinergistički efekat. Pri malim količinama glicerola u podlozi, povećanje sadržaja fosfata u primenjenom opsegu nema značajan uticaj na posmatrani odziv. Međutim, pri većim količinama glicerola sa rastom sadržaja fosfata dolazi do značajnog povećanje poluprečnika zone inhibicije rasta, i maksimalne vrednosti ovog odziva postižu se sa sadržajem glicerola i fosfata od 14-20 g/l i 1,3-1,5 g/l, respektivno.



Grafikon 7b. Uticaj sadržaja fosfata i glicerola (pri prosečnom sadržaju ekstrakta kvasca od 17,5 g/l) u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*, na inhibiciju rasta izolata *C. acutatum*

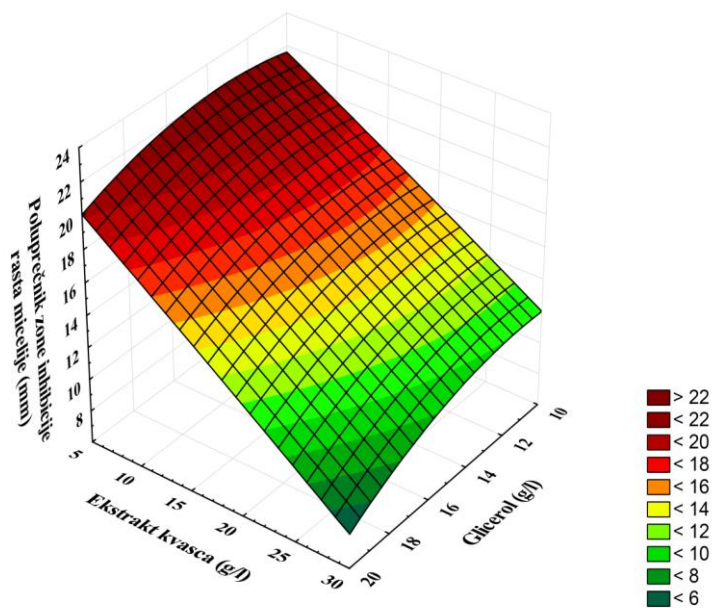
Uticaj primenjenih količina ekstrakta kvasca i fosfata pri srednjem sadržaju glicerola od 15 g/l u podlozi na zonu inhibicije rasta *C. acutatum* može se analizirati na osnovu Grafikona 7c. Interakcija sadržaja ekstrakta kvasca i fosfata je statistički značajna ($p=0,004$). Pri sadržaju ekstrakta kvasca u opsegu 10-30 g/l, visoke koncentracije azota omogućavaju intenzivan rast biomase pri čemu se troše i značajne količine izvora fosfora. Kako bi se obezbedile dovoljne količine fosfata za sekundarni metabolizam i proizvodnju antifungalnih metabolita, u primenjenim eksperimentalnim uslovima neophodno je dodati veću količinu fosfata u podlogu. Sa druge strane, pri sadržaju ekstrakta kvasca od 5-10 g/l rast biomase je vidno ograničen malom količinom izvora azota te količina fosfata ima neznatan uticaj na posmatrani odziv.



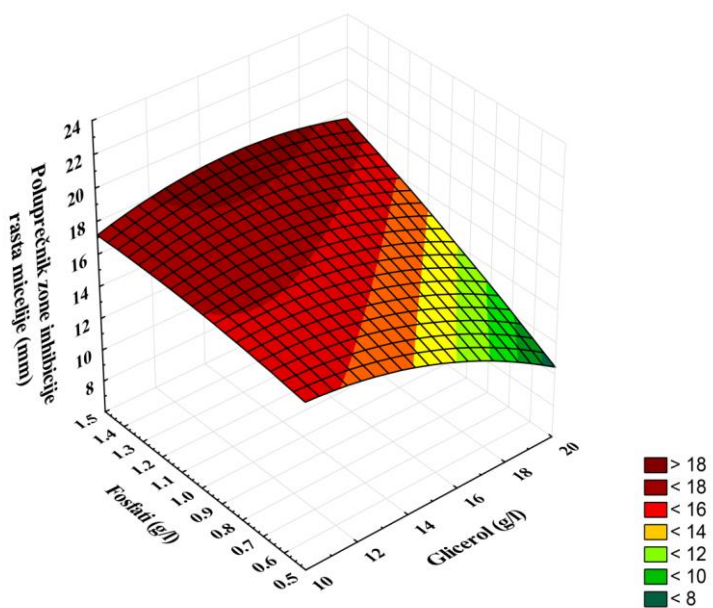
Grafikon 7c. Uticaj sadržaja ekstrakta kvasca i fosfata (pri prosečnom sadržaju glicerola od 15 g/l) u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*, na inhibiciju rasta izolata *C. acutatum*

Matematički model za ispitivanje uticaja sastava podloge na inhibiciju rasta *C. gloeosporioides*. Za odziv poluprečnika zone inhibicije rasta izolata *C. gloeosporioides* koeficijent determinacije iznosi 0,958 što ukazuje da samo 4,2% varijacija ne može biti objašnjeno modelom. Pojedinačni efekti variranih parametara i njihove interakcije prikazani su u Tabeli 36. Statistički značajan uticaj ima interakcija sadržaja ekstrakta kvasca i fosfata ($p=0,011$). Pozitivna interakcija dve nezavisno promenljive (Tabela 38) ukazuje na sinergistički efekat sadržaja ekstrakta kvasca i fosfata, kao što je slučaj i kod izolata *C. acutatum*.

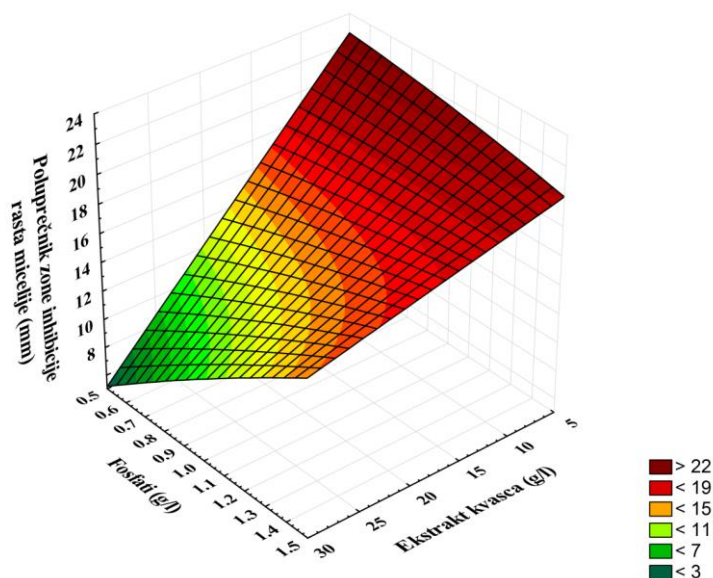
Uticaj sadržaja glicerola, ekstrakta kvasca i fosfata na antifungalnu aktivnost *S. hygroscopicus*, koja je indirektno prikazana kroz poluprečnik zone inhibicije rasta izolata *C. gloeosporioides*, prikazan je na Grafikonima 8a, 8b i 8c. Poređenjem rezultata prikazanih na Grafikonima 7 i 8, može se zaključiti da variranje sastava podloge za kultivaciju *S. hygroscopicus* ima skoro identičan uticaj na njegovu antifungalnu aktivnost na vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Jedina značajna razlika se uočava poređenjem grafikona 7b i 8b koji prikazuju uticaj sadržaja glicerola i fosfata pri prosečnom sadržaju ekstrakta kvasca na inhibiciju rasta izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, respektivno. Naime, maksimalno antifungalno delovanje na *C. gloeosporioides* postiže se pri nešto nižoj količini glicerola u odnosu na *C. acutatum* (12-18 g/l).



Grafikon 8a. Uticaj sadržaja ekstrakta kvasca i glicerola (pri prosečnom sadržaju fosfata od 1 g/l) u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*, na inhibiciju rasta izolata *C.gloeosporioides*

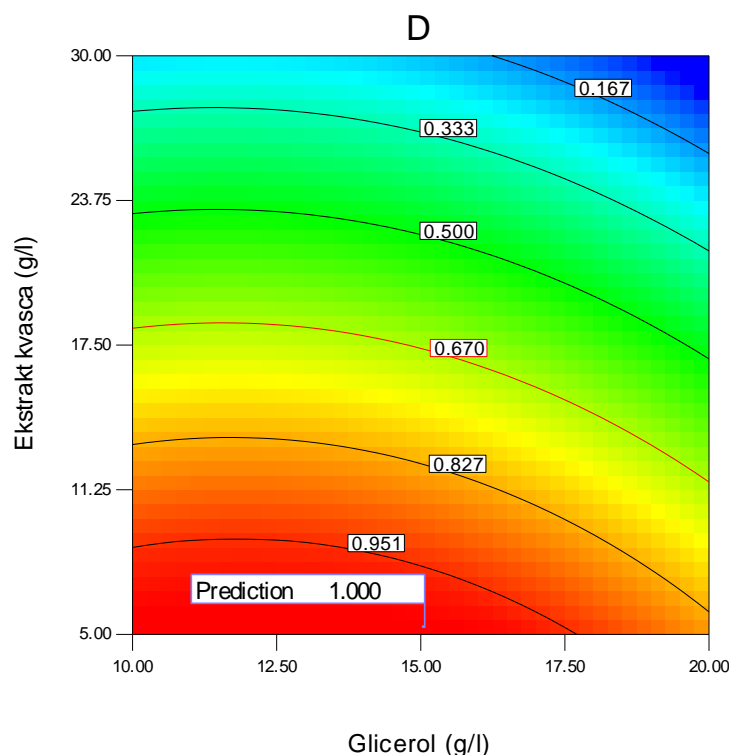


Grafikon 8b. Uticaj sadržaja fosfata i glicerola (pri prosečnom sadržaju ekstrakta kvasca od 17,5 g/l) u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*, na inhibiciju rasta izolata *C.gloeosporioides*



Grafikon 8c. Uticaj sadržaja ekstrakta kvasca i fosfata (pri prosečnom sadržaju glicerola od 15 g/l) u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*, na inhibiciju rasta izolata *C.gloeosporioides*

Optimizacija podloge. Postizanje maksimalnih zona inhibicije rasta za izolate *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* je definisano kao cilj optimizacije. Ovo zahteva posmatranje oba odziva (poluprečnik zone inhibicije izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*) i primenu metode željene funkcije. Proračun je izvršen primenom softverskog paketa Design-Expert 7.00, StatEase, Inc., USA. Rezultati optimizacije vrednosti sadržaja glicerola, ekstrakta kvasca i fosfata u hranljivoj podlozi za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma prikazani su na Grafikonu 9. Kao što je prikazano, visoke vrednosti željene funkcije postignute su u oblasti niskog sadržaja ekstrakta kvasca (5-7 g/l) i sadržaja glicerola u opsegu od 10-17,5 g/l. Simultana optimizacija pokazala je da se maksimalna vrednost ukupne željene funkcije ($D=1$) postiže sa sadržajem glicerola od 15,07 g/l, ekstrakta kvasca 5,28 g/l i fosfata 0,81 g/l. Procenjene vrednosti posmatranih odziva pri navedenom sastavu hranljive podloge su poluprečnik zone inhibicije izolata *C. acutatum* 22,80 mm, a izolata *C. gloeosporioides* 23,38 mm. Sa ciljem validacije dobijenih matematičkih modela izveden je eksperiment pri definisanim optimalnim uslovima, u tri ponavljanja, pri čemu su ostvarene vrednosti inhibicije za *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* iznosile $22,21 \pm 0,56$ mm i $23,13 \pm 0,47$ mm, respektivno, što ukazuje na dobro slaganje predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti. Prema tome, dobijeni rezultati dokaz su efikasnosti primenjenog modela.



Grafikon 9. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od sadržaja glicerola i ekstrakta kvasca pri definisanom optimalnom sadržaju fosfata od 0,81 g/l

Velika antifungalna aktivnost proizvodnog mikroorganizma *S. hygroscopicus*, proizvedenog pod utvrđenim optimalnim uslovima potvrđena je *in vivo* na veštački inokulisanim plodovima jabuke na kojima je registrovana efikasnost od 99,3% za *C. acutatum* i 99,8% za *C. gloeosporioides* nakon 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi.

6.5.5.2. Utvrđivanje načina delovanja i optimizacija trajanja kultivacije

Utvrđivanje načina delovanja *in vitro*. Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da je ispitivani tretman značajan izvor variranja poluprečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3) i *C. gloeosporioides* (MR-1) (Tabela 40).

Tabela 40. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja primene kultivacione tečnosti sa i bez ćelija *S. hygroscopicus* na inhibiciju rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3) i *C. gloeosporioides* (MR-1)

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Tretman	3 325,17	2	1 662,58	3 015,27	0,00**
Izolat	1,56	1	1,56	2,83	0,10
Tretman*Izolat	0,87	2	0,44	0,79	0,46
Greška	16,54	30	0,55		

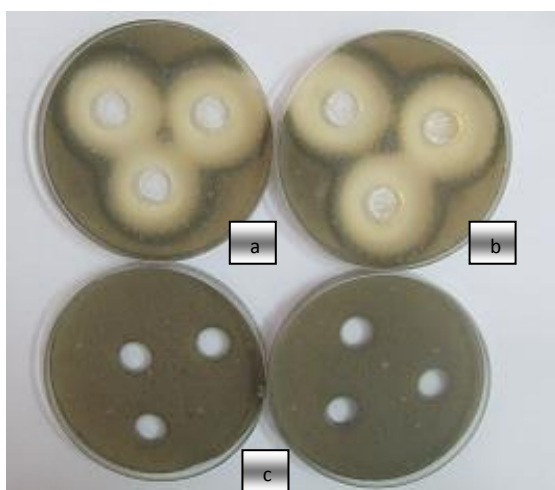
*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Dankanovim testom nije utvrđeno postojanje statistički značajnih razlika u poluprečniku zone inhibicije koje je uzrokovao supernatant kultivacione tečnosti i tečnosti koje su sadržale ćelije mikroorganizma, te je utvrđeno da je antifungalno delovanje *S. hygrosopicus* zasnovano na ekstracelularnim metabolitima (Tabela 41). Inhibicija rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3) postignuta primenom kultivacionih tečnosti sa i bez ćelija *S. hygrosopicus* prikazana je na Slici 32.

Tabela 41. Dankanov test: srednje vrednosti poluprečnika zone inhibicije rasta izolata *Colletotrichum* spp. (\pm Sd) prouzrokovane delovanjem različitih tretmana

Tretmani	Izolat	Poluprečnik zone inhibicije (mm) \pm Sd
Kultivaciona tečnost <i>S. hygrosopicus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	20,00 \pm 0,63a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	20,50 \pm 0,55a
Supernatant kultivacione tečnosti <i>S. hygrosopicus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	20,17 \pm 0,98a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	20,92 \pm 1,28a
Kontrola	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 b
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 b

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) –standardna devijacija



Slika 32. Inhibicija rasta micelije *C. acutatum* (HA-3) primenom kultivacione tečnosti *S. hygrosopicus*: (a) supernatant kultivacione tečnosti; (b) kultivaciona tečnost; (c) kontrola

Utvrđivanje mehanizma delovanja *in vivo*. Kako je prikazano u Tabeli 42 primenjeni tretmani su značajan izvor variranja prečnika nekroze na veštački inokulisanim

plodovima jabuke, dok izolati kojima je vršena inokulacija ne utiču značajno na variranje posmatranog parametra.

Tabela 42. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja primene kultivacione tečnosti sa i bez ćelija *S. hygroscopicus* na prečnik nekroze veštački inokulisanih plodova jabuke sa izolatima *C. acutatum* (HA-3) i *C. gloeosporioides* (MR-1)

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Tretman	14 620,71	2	7 310,35	918,29	0,00**
Izolat	0,75	1	0,75	0,09	0,76
Tretman*Izolat	2,37	2	1,18	0,15	0,86
Greška	334,36	42	7,96		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

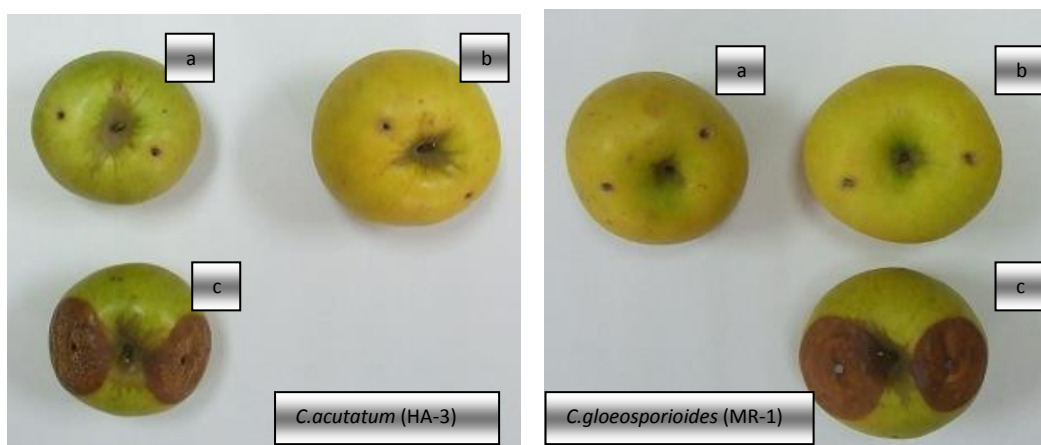
Kao u ispitivanjima *in vitro*, i u *in vivo* ogledima nije utvrđena statistički značajna razlika u prečniku nekroze na plodovima koji su tretirani kultivacionom tečnošću koja je sadržala ćelije *S. hygroscopicus* i plodovima tretiranim supernatantom kultivacione tečnosti, bez ćelija proizvodnog mikroorganizma (Tabela 43; Slika 33).

Tabela 43. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika nekroze na tretiranim, veštački inokulisanim plodovima jabuke sa izolatima *Colletotrichum* spp.

Tretmani	Izolat	Prečnik nekroze (mm) \pm Sd
Kultivaciona tečnost <i>S. hygroscopicus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,63 \pm 1,18 a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,13 \pm 0,35 a
Supernatant kultivacione tečnosti <i>S. hygroscopicus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,38 \pm 1,06 a
Kontrola	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	37,63 \pm 3,50 b
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	37,00 \pm 5,73 b

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) –standardna devijacija

Na osnovu rezultata može se zaključiti da se mehanizam antifungalnog delovanja ovog mikroorganizma zasniva na ekstracelularnim metabolitima.



Slika 33. Prečnik nekroze na veštački inokulisanim plodovima tretiranim sa kultivacionom tečnošću *S. hygroscopicus*: (a) kultivaciona tečnost; (b) supernatant kultivacione tečnosti; (c) kontrola

Trajanje kultivacije. Zbog činjenice da su izvor antifungalne aktivnosti *S. hygroscopicus* ekstracelularni metaboliti koje proizvodi u podlozi optimalnog sastava, prilikom utvrđivanja optimalnog trajanja kultivacije *S. hygroscopicus* korišćeni su supernatanti kultivacione tečnosti, bez ćelija mikroorganizma (metaboliti), kao i supernatanti kultivacione tečnosti bez ćelija mikroorganizma koje su izložene delovanju temperature od 100°C, 45 min u vodenom kupatilu (temperaturno tretirani metaboliti). Cilj temperaturnog tretiranja bio je da se utvrdi termička stabilnost metabolita sa antifungalnim svojstvima, jer je to jedan korak bliže identifikaciji ovih komponenti.

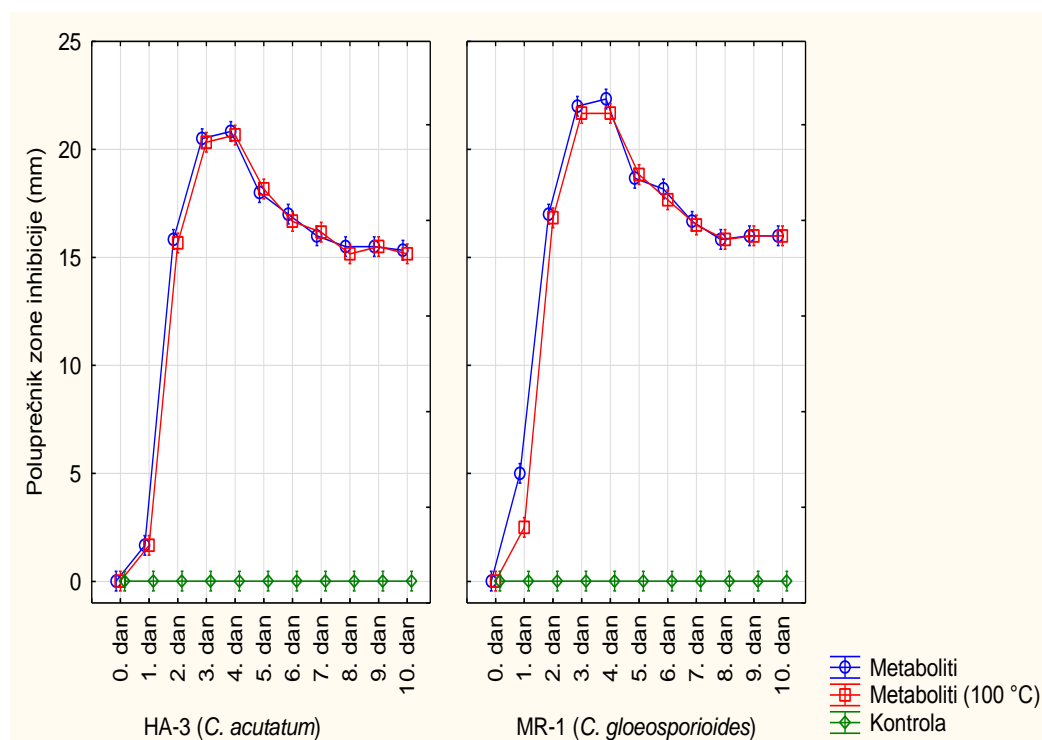
Na osnovu trofaktorijalne analize varijanse može se konstatovati da na variranje poluprečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *Coletotrichum* spp. značajan uticaj imaju sva tri ispitana faktora (trajanje kultivacije, kultivacione tečnosti *S. hygroscopicus* (tretman) i vrste izolata), kao i njihove interakcije (Tabela 44).

Tabela 44. Trofaktorijalna analiza varijanse uticaja trajanja kultivacije, primenjene kultivacione tečnosti (tretmana) i vrste izolata na inhibiciju rasta micelije *C. acutatum* (HA-3) i *C. gloeosporioides* (MR-1)

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Trajanje kultivacije	7 589,96	10	759,00	2 374,1	0,00**
Tretman	18 744,20	2	9 372,10	29 315,6	0,00**
Izolat	35,76	1	35,76	111,9	0,00**
Trajanje kultivacije*Tretman	3 803,71	20	190,19	594,9	0,00**
Trajanje kultivacije*Izolat	13,05	10	1,30	4,1	0,00**
Tretman*Izolat	19,25	2	9,62	30,1	0,00**
Trajanje kultivacije*Tretman*Izolat	15,36	20	0,77	2,4	0,00**
Greška	105,50	330	0,32		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Na Grafikonu 17 prikazana je zavisnost poluprečnika zone inhibicije rasta micelije izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* od primenjenih tretmana i trajanja kultivacije *S. hygroscopicus*. Potpuno odsustvo antifungalnih metabolita utvrđeno je nultog dana kultivacije (oko 2 h nakon inokulacije optimalne podloge proizvodnim mikroorganizmom), dok nakon 24 h počinje njihova proizvodnja, a nakon dva dana prisutna količina metabolita uzrokuje zadovoljavajuću inhibiciju rasta micelije *Colletotrichum* spp (≥ 11 mm). Proizvodnja antifungalnih metabolita najintenzivnija je tokom trećeg i četvrtog dana kultivacije, a nakon toga dolazi do opadanja sadržaja metabolita, ali je njihovo prisustvo na zadovoljavajućem nivou i desetog dana kultivacije, budući da poluprečnik zone inhibicije iznosi preko 11 mm.

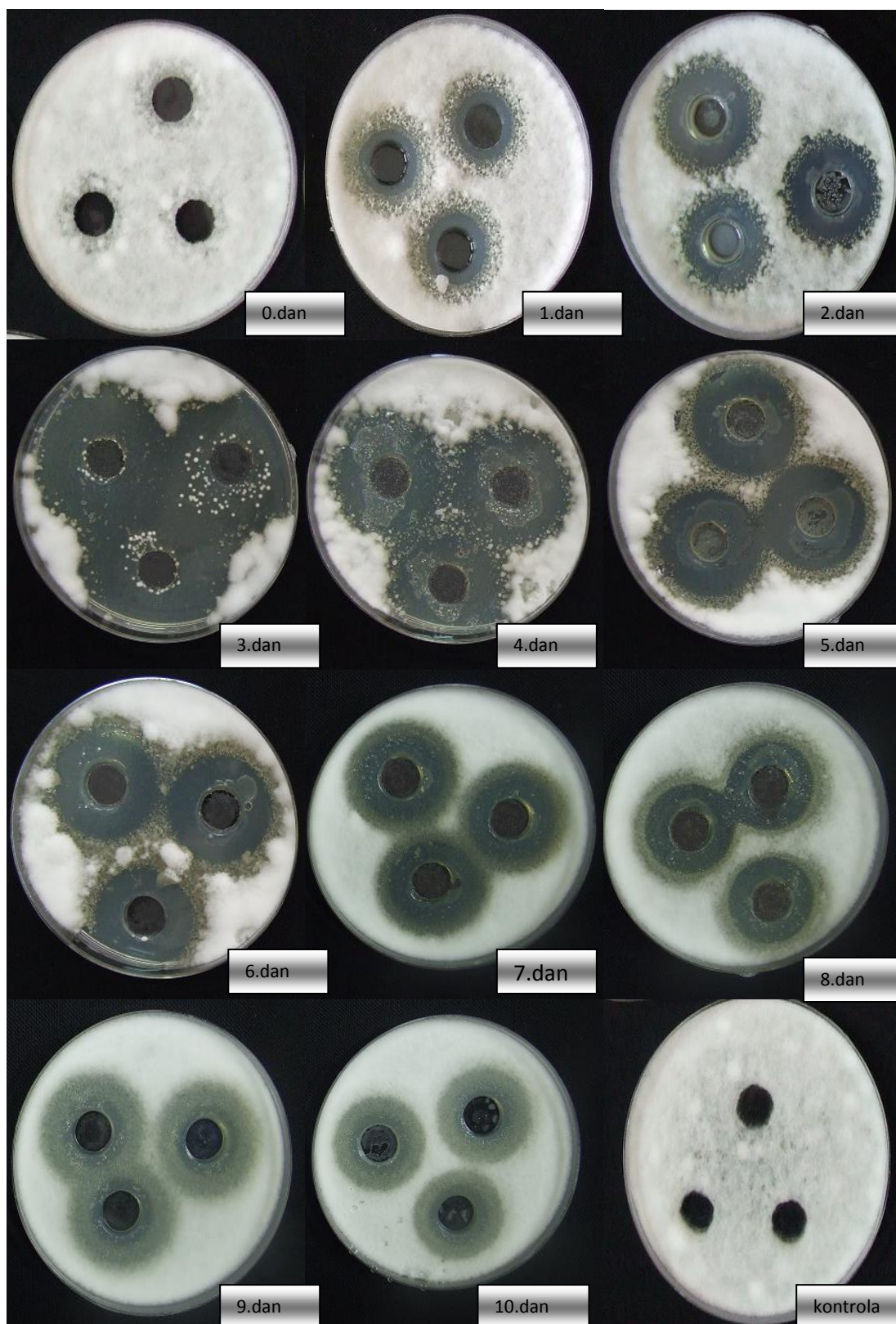


Grafikon 10. Uticaj trajanja kultivacije na produkciju antifungalnih metabolita *S. hygroscopicus* i temperaturnog tretiranja metabolita na inhibiciju rasta micelije izolata *C. acutatum* (HA-3) i *C. gloeosporioides* (MR-1).

Dankanovim testom (Tabela 52 u Prilogu) nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u inhibiciji rasta micelije između trećeg i četvrtog dana kultivacije, kao ni između termički tretiranih i netretiranih metabolita *S. hygroscopicus*. Inhibicija micelije oba izolata svakog dana kultivacije, osim nultog, je na statistički značajno višem nivou u odnosu na kontrolu.

Slika 34 prikazuje postignutu inhibiciju rasta micelije *C. gloeosporioides* (MR-1) od 0. do 10. dana kultivacije.

Optimalno vreme kultivacije *S. hygrosopicus* u cilju maksimalne proizvodnje antifungalnih metabolita iznosi 3-4 dana. Metaboliti *S. hygrosopicus* sa antifungalnim delovanjem su iz grupe termostabilnih jedinjenja.



Slika 34. Delovanje termički tretiranih (100°C) metabolita *S. hygrosopicus* na inhibiciju rasta micelije *C. acutatum* od 0. do 10. dana kultivacije

6.5.6. Uticaj niskih temperatura na aktivnost kultivacionih tečnosti mikroorganizama i formuliranih biopreparata na *Colletotrichum* spp. *in vivo*

Skladištenje na sobnoj temperaturi. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika nekroze na plodovima tretiranim sa kultivacionim tečnostima *S. hygroscopicus* (proizvedena pod optimalnim uslovima) i *B. subtilis* N 146, SE formulacijom *B. subtilis* N 146, i preparatima F-Stop, Extrasol, Serenade, Clarinet, Merpan 50 WP, Bellis i Zato 50 WG, i veštački inokulisanim sa *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i *C. gloeosporioides* (MR-1) posle 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi, pokazala je da je najveći izvor variranja primenjeni tretman (Tabela 45).

Tabela 45. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika nekroze na tretiranim, veštački inokulisanim plodovima jabuke posle 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Tretman	11 028,53	10	1 102,85	195,22	0,00**
Izolat	1 043,83	2	521,91	92,39	0,00**
Tretman*Izolat	2 218,53	20	110,93	19,64	0,00**
Greška	1 304,99	231	5,65		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Posle 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi (Tabela 46), postignut nivo zaštite plodova tretiranih sa kultivacionom tečnošću *S. hygroscopicus* proizvedenom pod optimalnim uslovima (optimalan sastav podloge, četiri dana kultivacije) i preparatom Extrasol je na istom nivou kao i zaštita postignuta primenom sintetičkih fungicida, nezavisno od izolata kojim je izvršena veštačka inokulacija. U slučaju preostalih bioloških preparata i veštačke inokulacije sa *C. gloeosporioides*, postignut nivo zaštite takođe je na istom nivou značajnosti kao i u slučaju primene sintetičkih fungicida (osim u slučaju kultivacione tečnosti *B. subtilis* N146). Međutim, kod veštačke inokulacije izolatima vrste *C. acutatum*, zaštita plodova je na istom nivou sa sintetičkim fungicidima samo u slučaju tretiranja plodova sa razvijenom formulacijom *B. subtilis* N 146 (5%) i preparatom F-stop i to u slučaju izolata HA-3 i K-4, respektivno. Generalno, svi primenjeni tretmani obezbeđuju statistički značajno slabiji razvoj nekroze u odnosu netretiranu kontrolu.

Tabela 46. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika nekroze (\pm Sd) (mm) na tretiranim, veštački inokulisanim plodovima jabuke posle 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi

Tretmani	Izolat	Prečnik nekroze (\pm Sd)
<i>S. hygroscopicus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,81 \pm 0,26 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,88 \pm 0,44 a
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,44 \pm 0,49 a
<i>B. subtilis</i> N-146	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	13,63 \pm 5,68 cd
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	19,19 \pm 4,09 fg
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	11,83 \pm 0,54 c
<i>B. subtilis</i> N-146 (5%)	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	2,52 \pm 0,44 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	7,17 \pm 0,42 b
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	1,96 \pm 0,79 a
F-stop (1%) (<i>B. subtilis</i> soj ST 1/III)	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	5,80 \pm 1,71 b
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Extrasol (1%) (<i>B. subtilis</i> Č 13)	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	1,91 \pm 0,77 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Serenade (1%) (<i>B. subtilis</i> QST 713)	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	17,13 \pm 8,98 ef
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	12,00 \pm 4,41 c
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Clarinet	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Merpan 50 WP	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	2,16 \pm 0,21 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	1,91 \pm 0,46 a
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a

Nastavak table 46.

Bellis	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01±0,00 a	
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01±0,00 a	
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01±0,00 a	
Zato 50WG	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01±0,00 a	
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01±0,00 a	
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01±0,00 a	
Kontrola	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	21,50±3,12	g
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	26,25±3,62	h
	MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)	15,50±2,98	de

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (±Sd) –standardna devijacija

Na plodovima tretiranim kultivacionim tečnostima mikroorganizama i biološkim preparatima, bez veštačke inokulacije, ne dolazi do promena koje bi ukazivale na negativan efekat primenjenih tretmana na plodovima jabuka.

Skladištenje na niskoj temperaturi. Po iznošenju tretiranih, veštački inokulisanih plodova iz hladnjače sa normalnom atmosferom posle dva meseca inkubacije na $2\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, ne dolazi do razvoja simptoma na plodovima ni u jednoj varijanti, uključujući kontrolnu. Međutim, posle šest dana inkubacije na sobnoj temperaturi, dolazi do pojave prvih simptoma.

Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse dobijenih vrednosti posmatranog parametra (prečnik nekroze) posle 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi prikazani su u Tabeli 47. Na osnovu vrednosti p može se zaključiti da su tretmani, izolati i njihova interakcija statistički visoko značajan izvor variranja zavisno promenljive, pri čemu su primenjeni tretmani najveći izvor variranja.

Tabela 47. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika nekroze na tretiranim plodovima jabuke posle dva meseca inkubacije u hladnjači i 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi

Izvor variranja	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	SS	df	MS	F	P
Tretman	7 675,83	10	767,58	227,03	0,00**
Izolat	5 940,65	2	2 970,32	878,52	0,00**
Tretman*Izolat	4 594,80	20	229,74	67,95	0,00**
Greška	1 227,32	363	3,38		

*Statistički značajna razlika ($p<0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p<0,01$)

Intenzitet razvijene nekroze na plodovima jabuke posle 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi po iznošenju plodova iz hladnjače prikazan je u Tabeli 48.

Tabela 48. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika nekroze na tretiranim plodovima jabuke posle dva meseca inkubacije u hladnjači i 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi

Tretmani	Izolati	Prečnik nekroze (mm) (\pm Sd)
<i>S. hygroscopicus</i>	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,50 \pm 0,00 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,50 \pm 0,00 a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
<i>B. subtilis</i> soj N 146	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	13,58 \pm 4,56 f
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	13,50 \pm 0,90 f
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
<i>B. subtilis</i> soj N 146 5% (formulisan)	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	13,17 \pm 2,12 ef
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	10,50 \pm 1,38 cd
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
F- Stop 1% (<i>B. subtilis</i> ST 1/III)	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	9,33 \pm 1,07 c
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	12,67 \pm 1,23 ef
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Extrasol 1% (<i>B. subtilis</i> Č 13)	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	16,42 \pm 5,26 g
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	18,08 \pm 1,56 h
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Serenade 1% (<i>B. subtilis</i> QST 713)	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	11,75 \pm 1,66 de
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	9,42 \pm 1,44 c
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Clarinet	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	3,59 \pm 3,82 b
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Merpan 50WP	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a

Nastavak tabele 48.

Tretmani	Izolati	Prečnik nekroze (\pm Sd)
Bellis	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Zato 50 WG	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	0,01 \pm 0,00 a
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	10,17 \pm 4,09 c
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a
Kontrola	HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	18,25 \pm 2,26 h
	K-4 (<i>C. acutatum</i>)	18,00 \pm 3,07 h
	MR-1(<i>C. gloeosporioides</i>)	0,01 \pm 0,00 a

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) –standardna devijacija

Treba istaći da za izolati vrste *C. gloeosporioides* posle dvomesečnog skladištenja u hladnjači nije utvrđen razvoj simptoma ni u jednoj varijanti, ni posle dve nedelje inkubacije na sobnoj temperaturi. Ovaj ishod bio je očekivan uzimajući u obzir dokazanu osetljivost ove vrste na niske temperature *in vitro* i *in vivo* u okviru ovog, i istraživanja drugih autora.

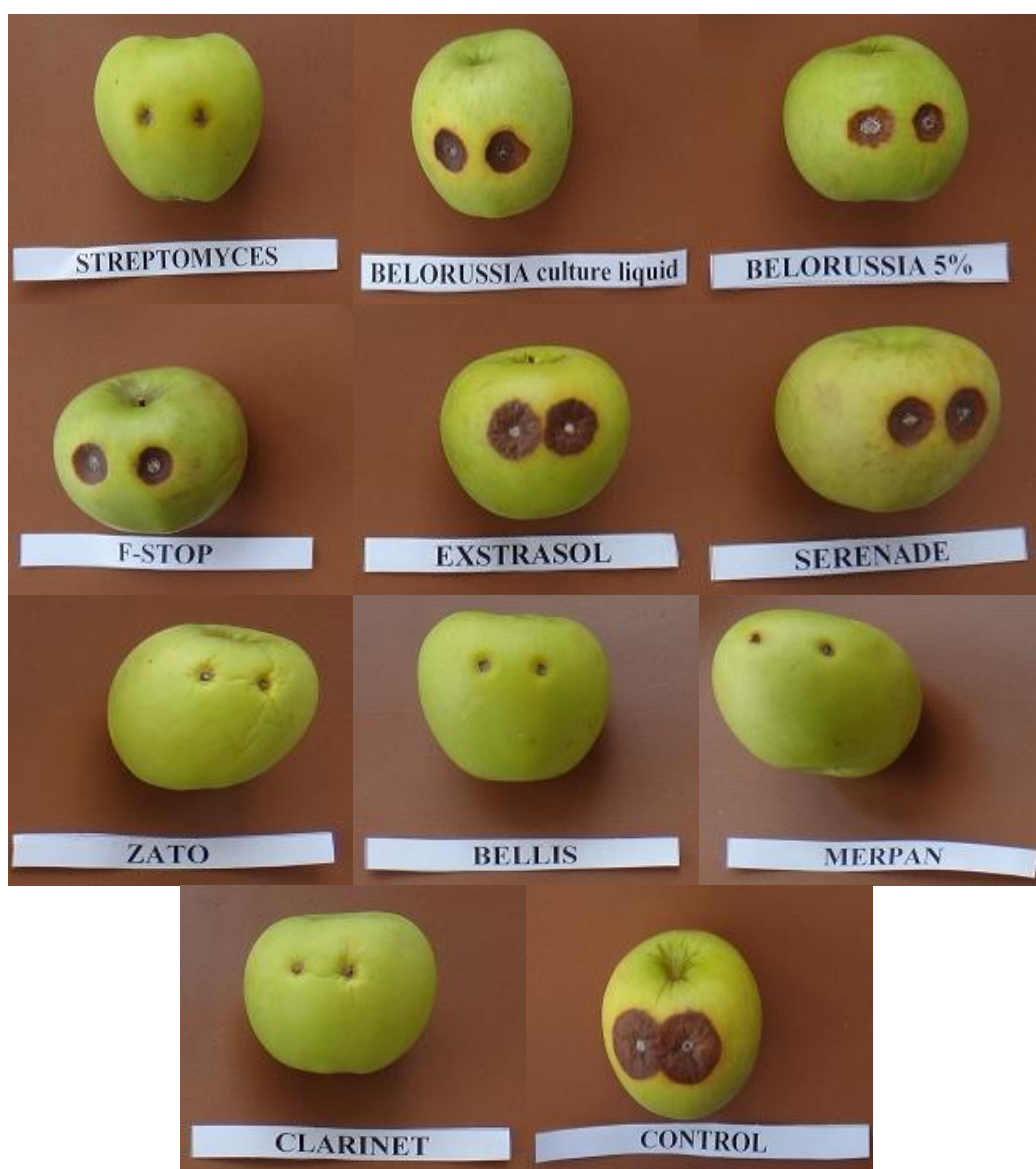
Od bioloških agenasa, najveću inhibiciju nekroze kod izolata *C. acutatum* uzrokuje *S. hygroscopicus*, a najslabiju preparat Extrasol (Slike 35 i 36).

Prema rezultatima Dankanovog testa (Tabela 48) prečnik nekroze na plodovima tretiranim sa *S. hygroscopicus* je na istom nivou značajnosti sa prečnikom nekroze na plodovima tretiranim hemijskim fungicidima. Kod izolata K-4 razvoj nekroze na plodovima tretiranim fungicidom Clarinet je statistički značajno veći u odnosu na *S. hygroscopicus*. Kod istog izolata, na plodovima tretiranim preparatom Zato 50 WG razvoj nekroze je na značajno višem nivou ne samo u odnosu na plodove tretirane sa *S. hygroscopicus*, već i u odnosu na plodove tretirane sa preparatom Clarinet.

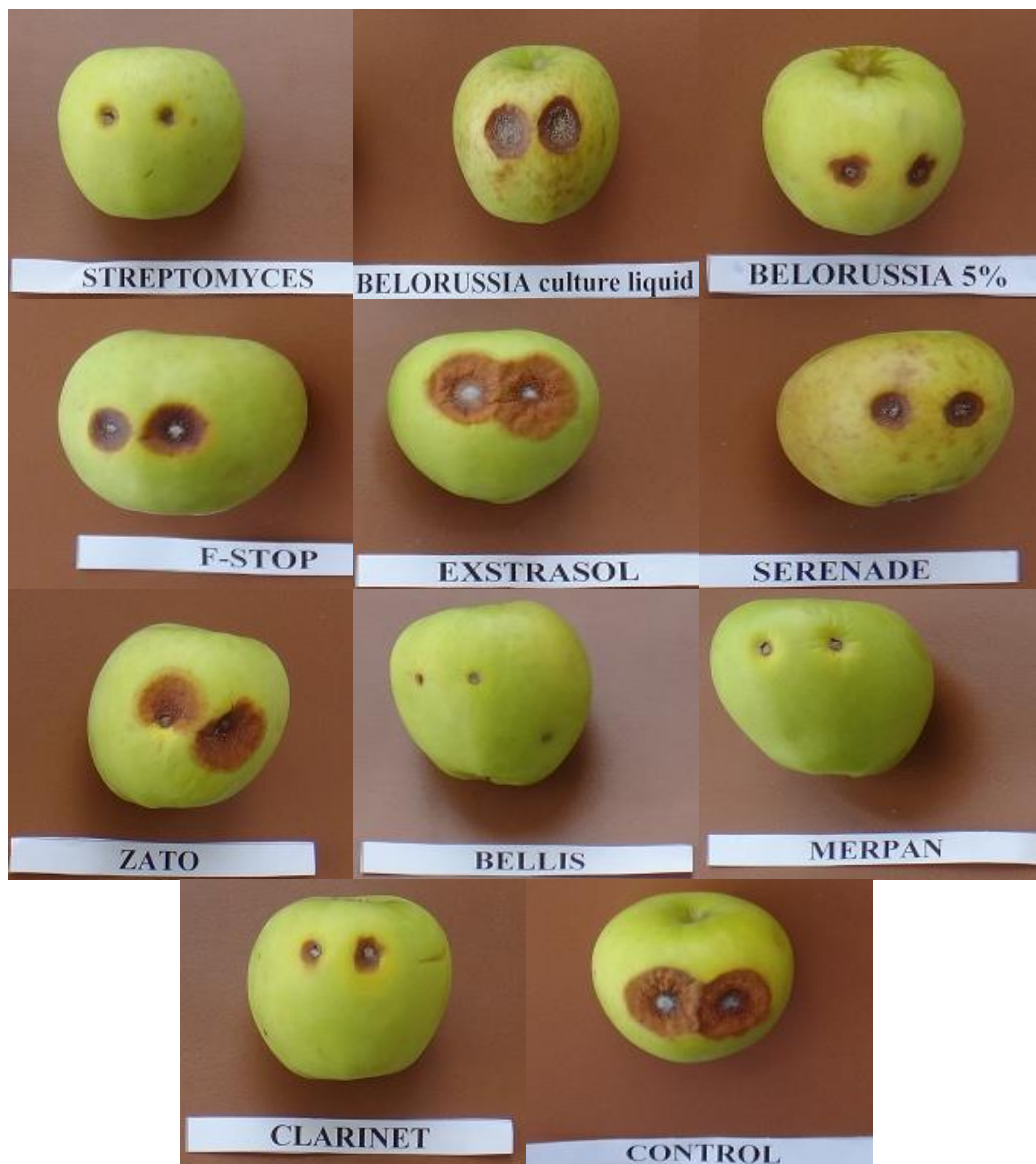
Na svim plodovima tretiranim preparatima na bazi *B. subtilis* razvoj nekroze je značajno manji u odnosu na netretirane plodove u kontroli, a značajno veći u odnosu na plodove tretirane sa *S. hygroscopicus*. Jedino je nekroza na plodovima tretiranim preparatom Extrasol 1% u slučaju izolata K-4 na istom nivou značajnosti sa kontrolom.

Takođe, antifungalno delovanje preparata na bazi *B. subtilis* je na statistički značajno nižem nivou u odnosu na ispitivane sintetičke fungicide osim u slučaju preparata Zato 50 WG i izolata K-4.

Poređenjem efekta bakterije *B. subtilis* (soj N 146) primenjene u obliku submerzne kulture i u obliku formulisanog preparata (SE), utvrđeno je da se formulisanjem u oblik SE povećava antifungalno delovanje, s tim što je samo u slučaju izolata K-4 (*C. acutatum*) razlika statistički značajna.



Sika 35. Razvoj nekroze na tretiranim plodovima jabuke sorte zlatni delišes posle dva meseca inkubacije u hladnjači i 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi; Plodovi veštački inokulisani izolatom HA-3 (*C. acutatum*); Belorussia – označava *B. subtilis* soj N146; Belorussia 5% - razvijena SE formulacija



Slika 36. Razvoj nekroze na tretiranim plodovima jabuke sorte zlatni delišes posle dva meseca inkubacije u hladnjači i 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi; Plodovi veštački inokulisani izolatom K-4 (*C. acutatum*); Belorussia – označava *B. subtilis* soj N146; Belorussia 5% - razvijena SE formulacija

Na plodovima tretiranim sa *S. hygroscopicus* ne dolazi do razvoja nekroze ni posle dodatnih mesec dana inkubacije na sobnoj temperaturi, dok su kontrolni plodovi u celini zahvaćeni nekrozom.

Na plodovima na kojima su primenjeni ispitivani tretmani, bez inokulacije patogenima, nema promena koje bi ukazivale na negativan efekat primenjenih tretmana na plodove jabuke.

6.5.7. Aktivnost isparljive faze etarskih ulja na izolate *Colletotrichum* spp.

6.5.7.1. Inhibitorno delovanje etarskih ulja

Od proučavanih 56 etarskih ulja, samo šest ulja (pet ulja origana (*O. vulgare* A, B, C, D i E) i jedno ulje timijana (*T. vulgaris*)) potpuno zaustavlja rast micelije tri ispitivana izolata (*C. acutatum* – MI-21 i Č-13; *C. gloeosporioides* – AVO 374B). Četiri ulja origana (A, B, C i D) ispoljavaju potpunu inhibiciju rasta micelije sva tri izolata u opsegu koncentracija 0,02-0,04 µl/ml vazduha, dok za origano E minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) iznosi 0,08 µl/ml vazduha (Tabela 49). Za ulje timijana (*T. vulgaris*) za oba izolata *C. acutatum* MIC je 0,02 µl/ml vazduha, a za izolat *C. gloeosporioides* 0,04 µl/ml vazduha.

Od preostalih 50 proučavanih ulja 47 ne zaustavlja rast ispitivanih izolata ni pri koncentraciji od 0,16 µl/ml vazduha (Tabela 49).

6.5.7.2. Letalno delovanje etarskih ulja

Od svih testiranih ulja, najniža minimalna letalna koncentracija (MLC) za sva tri ispitivana izolata utvrđena je za ulje origana C (0,02 µl/ml vazduha). Za ostala ulja origana minimalna koncentracija koja ispoljava letalno delovanje je u opsegu 0,04-0,08 µl/ml vazduha. Između vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* nije utvrđena razlika u osetljivosti na ulja origana, dok je ulje timijana toksičnije za *C. acutatum* (Tabela 49).

Tabela 49. Toksičnost etarskih ulja za vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*

Etarsko ulje	<i>C. acutatum</i> (MI-21)		<i>C. acutatum</i> (Č-13)		<i>C. gloeosporioides</i> (AVO 374B)	
	MIC ¹	MLC ²	MIC	MLC	MIC	MLC
<i>Lavandula officinalis</i> A*	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Lavandula officinalis</i> B	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Lavandula officinalis</i> C	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Lavandula officinalis</i> D	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Lavandula officinalis</i> E	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Lavandula officinalis</i> F	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Matricaria chamomilla</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Origanum vulgare</i> A	<u>0,04</u>	<u>0,04</u>	<u>0,02</u>	<u>0,04</u>	<u>0,02</u>	<u>0,04</u>
<i>Origanum vulgare</i> B	<u>0,02</u>	<u>0,04</u>	<u>0,02</u>	<u>0,04</u>	<u>0,02</u>	<u>0,04</u>
<i>Origanum vulgare</i> C	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>
<i>Origanum vulgare</i> D	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>0,04</u>	<u>0,02</u>	<u>0,04</u>
<i>Origanum vulgare</i> E	<u>0,08</u>	<u>0,08</u>	<u>0,08</u>	<u>0,08</u>	<u>0,08</u>	<u>0,08</u>

Nastavak table 49.

<i>Salvia officinalis A</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Salvia officinalis B</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Salvia officinalis C</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Salvia officinalis D</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Salvia officinalis E</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Salvia officinalis F</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Salvia sclarea</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Pelargonium graveolens</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Foeniculum vulgare A</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Foeniculum vulgare B</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Foeniculum vulgare C</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Foeniculum vulgare D</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Foeniculum vulgare E</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Pinus nigra A</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Pinus nigra B</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Ocimum basilicum</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Mentha piperita</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Geraniol</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Pimpinella anisum A</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Pimpinella anisum B</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Cinnamomum verum A</i>	0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Cinnamomum verum B</i>	0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Cinnamomum camphora</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Syzygium aromaticum</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Thymus vulgaris</i>	<u>0,02</u>	<u>0,16</u>	<u>0,02</u>	<u>0,08</u>	<u>0,04</u>	<u>>0,16</u>
<i>Juniperus communis A</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Juniperus communis B</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Citrus sinensis</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Eucalyptus globulus</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Rosmarinus officinalis</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Melaleuca alternifolia A</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Melaleuca alternifolia B</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Aethum graveolens A</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Aethum graveolens B</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Aethum graveolens C</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Aethum graveolens D</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Ruta montana</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Laurus nobilis</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Lignum santali</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Leptospermum scoparium</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Cymbopogon citratus</i>	0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Carum carvi</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Coriandrum sativum</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16
<i>Helichrysum italicum</i>	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16	>0,16

1Minimalna koncentracija etarskog ulja koja prouzrokuje potpunu inhibiciju rasta posle sedam dana izlaganja (minimalna inhibitorna

koncentracija - Minimum Inhibitory Concentration) – (µl/ml vazduha)

2Minimalna koncentracija etarskog ulja koja ispoljava letalan efekat na patogena (Minimum Lethal Concentration) – (µl/ml vazduha)

*Etarska ulja različitog geografskog porekla, poreklom od iste biljne vrste, označena su različitim slovima u nastavku naziva biljne vrste

6.5.7.3. Određivanje minimalnog perioda ekspozicije

Na osnovu prethodno prikazanih rezultata, četiri etarska ulja origana za koja su utvrđene najniže MLC vrednosti odabrano je za utvrđivanje minimalnog perioda ekspozicije (MPE) za postizanje letalnog efekta (Tabela 50). Za izolat *C. gloeosporioides* minimalan period ekspozicije za sva ispitana ulja primenjena pri najvišoj koncentraciji od 0,08 µl/ml vazduha iznosi dva dana. Međutim, za izolate *C. acutatum* ulje origana C pri najvišoj koncentraciji dovodi do letalnog efekta posle jednog dana ekspozicije, dok je za isti efekat ostalih ulja pri koncentraciji od 0,08 µl/ml potrebno izlaganje u trajanju od dva dana. Samo za ulje origana C utvrđen je MPE od sedam dana pri najnižoj koncentraciji primene (0,02 µl/ml) za sva tri izolata, dok je kod ulja origana D ovo slučaj samo kod izolata *C. acutatum* (MI-21).

Tabela 50. Prikaz rezultata utvrđivanja minimalnog perioda ekspozicije (MPE) izolata *Colletotrichum* spp. za različita etarska ulja origana

Koncentracija (µl/ml vazduha)	Minimalni period ekspozicije (dani)								
	<i>C. acutatum</i> (MI-21)			<i>C. acutatum</i> (Č-13)			<i>C. gloeosporioides</i> (AVO 374B)		
	0,08	0,04	0,02	0,08	0,04	0,02	0,08	0,04	0,02
<i>Origanum vulgare</i> A	2	4	>7	2	4	>7	2	4	>7
<i>Origanum vulgare</i> B	2	3	>7	2	3	>7	2	4	>7
<i>Origanum vulgare</i> C	1	2	7	1	2	7	2	2	7
<i>Origanum vulgare</i> D	2	2	7	2	2	>7	2	3	>7

7. DISKUSIJA

7.1. Prikupljanje uzoraka, izolacija patogena, izdvajanje monosporijalnih izolata

Kao što je navedeno u rezultatima, uzorkovanje plodova sa simptomima truleži je izvršeno u 18 objekata širom R. Srbije, tokom četvorogodišnjeg perioda. Prema Borve i Stensvand (2007) i Agrios (2005), antraknoza na plodovima jabuke se obično intenzivno razvija posle skladištenja plodova na niskim temperaturama, prilikom iznošenja plodova na tržište, i pri skladištenju u neadekvatnim prostorima. Ovi navodi govore u prilog činjenici da su u ovom istraživanju plodovi sa simptomima truleži (koji su upućivali na *Colletotrichum* spp.) pretežno pronalazeni po iznošenju plodova iz rashladnih komora, u podrumskim i improvizovanim skladištima i na plodovima plasiranim na tržište (pijačne tezge i u hipermarketi).

Iz uzoraka plodova jabuke iz svakog objekta izolovan je najmanje jedan izolat *Colletotrichum* spp., osim iz objekta Futoška pijaca. Ovo potkrepljuje navod Broad (2010) da je gotovo svaki usev ili zasad širom sveta osetljiv na jednu ili više vrsta iz roda *Colletotrichum* spp. kao i Sutton-a (1990) prema kome je antraknoza ploda jabuke uzrokovana *Colletotrichum* spp. prisutna u gotovo svakoj zemlji gde se ova vrsta komercijalno gaji. Budući da su *Colletotrichum* spp. utvrđene na 17 od ukupno 18 objekata uzorkovanja, pri čemu se odsustvo u jednom objektu može pripisati manjem broju uzorkovanih plodova u odnosu na ostale lokacije, ove fitopatogene gljive mogu se smatrati čestom pojavom u skladištima širom R. Srbije. Međutim, njihova zastupljenost među prouzrokovateljima truleži jabuke koja se u periodu 2010 - 2013. godine kretala u intervalu 7,8 - 10% ukazuje na činjenicu da ove vrste nisu dominantni prouzrokovajući truleži plodova jabuke u skladištima R. Srbije.

7.2. Patogenost izolata *Colletotrichum* spp.

Sva 33 dobijena izolata koja su izgledom kolonija i spora upućivali na pripadnost rodu *Colletotrichum* spp. prouzrokovali su na jabukama simptome karakteristične za prouzrokovaoče ovog roda i time su potvrdili patogenost na plodovima jabuke. Iz veštački inokulisanih plodova dobijeni su reizolati koji su izgledom odgovarali izolatima kojima je izvršena inokulacija. Patogenost reizolata je potvrđena na plodovima jabuke, te je formirana kolekcija od 33 monosporijalna izolata *Colletotrichum* spp. i četiri reprezentativna reizolata.

Izgled simptoma koje su izolati i reizolati prouzrokovali na plodovima posle sedam dana inkubacije bio je sličan kod svih izolata, s tim što su acervule na nekim plodovima bile guste a na pojedinim retke, raspoređene u koncentričnim krugovima ili nepravilno što je u saglasnosti sa navodima Anonimus (2005), Lewis Ivey (2004), Freeman i sar. (1998). Simptomi su ispoljeni u vidu tamno mrkih, ulegnutih, nekrotičnih pega, sa narandžastom masom konidija koje cure iz acervula, što navode i Sutton (1990), Freeman i sar. (1998), Lewis Ivey (2004), Borve i Stensvand (2007) i Živković (2011). Kod većine izolata došlo je do konusnog širenja nekroze prema jezgru ploda, u obliku slova „V“, što Anonimus (2005) navodi kao čestu pojavu u slučaju infekcije plodova jabuke ovim patogenima.

Primećene su značajne razlike u virulentnosti dobijenih izolata, tj. brzini kolonizacije egzokarpa i mezokarpa ploda. Bez obzira na ispoljene razlike između izolata, brzina kolonizacije egzokarpa ploda 1,9 do 3,2 mm/dan i mezokarpa ploda 0,74 - 1,9 mm/dan, ukazuje da su pojava i širenje antraknoznih simptoma, pri optimalnim uslovima, veoma brzi i intenzivni, što je u saglasnosti sa navodima Biggs i Miller (2001) i Kim i Hong (2008).

7.2.1. Uticaj uslova skladištenja plodova jabuke na patogenost *Colletotrichum* spp.

Na veštački inokulisanim plodovima sa nehromogenim i hromogenim izolatima *C. acutatum* (HA-3 i K-4) i izolatom *C. goeosporioides* (MR-1), nije došlo do pojave simptoma tokom skladištenja plodova u ULO hladnjači (dva meseca), hladnjači sa normalnom atmosferom (šest meseci), i na temperaturama $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ i $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ (21 dan). Pojava simptoma tokom 21 dana skladištenja na $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ primećena u slučaju veštačke inokulacije izolatom *C. goeosporioides* nakon sedam dana inkubacije plodova na ovoj temperaturi.

Nakon skladištenja plodova, dodatnom inkubacijom na sobnoj temperaturi četvrtog dana je došlo do ispoljavanja simptoma na većini plodova. Međutim, simptomi su izostali na plodovima inokulisanim sa izolatom *C. goeosporioides* i to u slučaju skladištenja u ULO i hladnjači sa normalnom atmosferom. Izostanak micelijskog rasta izolata *C. goeosporioides* u kulturi na KDA podlozi, pri temperaturi od 5°C u ovom istraživanju, kao i pomenuta osetljivost *C. goeosporioides* na niske temperature (Everett, 2003), u skladu je sa dobijenim rezultatom. Potpuni izostanak simptoma nakon tri nedelje inkubacije na sobnoj temperaturi ukazuje da izlaganje niskim temperaturama u trajanju

dva ili šest meseci u slučaju ove vrste ima fungicidno, a ne samo fungistatično delovanje. Ova činjenica je od izuzetnog značaja, budući da je u poslednje vreme od kada se u našoj zemlji plodovi jabuke sve intenzivnije skladište na vrlo niskim temperaturama u savremenim hladnjačama, prisustvo ovog patogena redukovano, dok je druga vrsta ovog roda koja se javlja na jabukama (*C. acutatum*) postala dominantna. Kako navode Talhinhos i sar. (2005), mnogi autori navode da *C. acutatum* postaje sve dominantnija vrsta poslednjih godina i to sa učešćem od >97% dok infekcije uzrokovane vrstom *C. gloeosporioides* čine svega oko 3%.

Na plodovima inokulisanim nehromogenim izolatom *C. acutatum* (HA-3) simptomi su izostali u slučaju skladištenja plodova na $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. Dobijeni rezultat u skladu je sa rezultatima dobijenim u ogleđima ispitivanja uticaja različitih temperatura na micelijski rast izolata *Colletotrichum* spp. u kulturi na KDA podlozi, u kojima nije utvrđen rast izolata HA-3 pri temperaturi od $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. Međutim, hromogeni izolat *C. acutatum* je ispoljio simptome nakon 21 dana inkubacije plodova na sobnoj temperaturi koji su prethodno čuvani na $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. Ovi simptomi nisu bili na statistički značajno višem nivou u odnosu na kontrolu, ali se ne može doneti zaključak da temperatura od $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ima fungicidno delovanje na sve *C. acutatum* izolate. Pojava simptoma može se pripisati variranju temperature $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ prilikom inkubacije plodova, budući da je u kulturi na KDA podlozi utvrđen rast micelije svih *C. acutatum* izolata na 33°C , a izostanak rasta na 35°C , dok temperatura od 34°C nije ispitana, što ostavlja prostor za dalja istraživanja i diskusiju. Pojava simptoma može ukazivati da su hromogeni *C. acutatum* izolati manje osetljivi na visoke temperature od nehromogenih i da na temperaturi od 34°C i dalje ispoljavaju micelijski rast, za šta su potrebna dodatna istraživanja. Na opravdanost budućih istraživanja u ovom pravcu ukazuje i utvrđena genetička varijabilnost vrsta *C. acutatum* tj. njihovo odvajanje u tri genetička klastera filogenetskom analizom sprovedenom u ovom istraživanju.

Generalno, razvijeni simptomi na plodovima nakon skladištenja na $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ i inkubacije na sobnoj temperaturi, bili su na istom nivou značajnosti sa kontrolom, nezavisno od vrste *Colletotrichum* kojom je izvršena inokulacija. Dobijeni podatak ukazuje na visok potencijal toplotnih tretmana kao potencijalne fizičke mere za suzbijanje ovih patogena, uz uvažavanje uticaja visokih temperatura na kvalitet plodova.

Veoma značajan podatak iz sprovedenog istraživanja je i činjenica da je skladištenje plodova na niskoj temperaturi dva i šest meseci (u ULO i hladnjači sa

normalnom atmosferom, respektivno) dovelo do značajno slabijeg razvoja nekroze na plodovima koji su kasnije inkubirani na sobnoj temperaturi, u odnosu na plodove koji su odmah nakon inokulacije inkubirani na sobnoj temperaturi, nezavisno od izolata. Međutim, skladištenje plodova na $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ tri nedelje, dovelo je do značajno jačeg razvoja nekroze na plodovima koji su nakon skladištenja inkubirani na sobnoj temperaturi u odnosu na nekrozu na plodovima koji su odmah nakon inokulacije inkubirani na sobnoj temperaturi, nezavisno od izolata.

7.3. Morfološke i fiziološke osobine izolata *Colletotrichum* spp.

Autori Thind i Jhooty (1990) ukazuju na vezu između veličine konidija, brzine rasta micelije u kulturi i virulentnosti *Colletotrichum* spp. Međutim, u ovim istraživanjima nije utvrđeno postojanje veze između ova tri parametra što su utvrdili i Sangdee i sar. (2011).

7.3.1. Morfologija vegetativnih organa

Utvrđena je velika varijabilnost u izgledu kolonija ispitana 33 monosporijalna izolata, na podlogama KDA, MPA, V8, SDA i OA. Međutim, izolate je bilo moguće grupisati u četiri morfološke grupe. U I morfološkoj grupi primećeno odstupanje izolata TUT137A u nekim karakteristikama na podlogama KDA, MPA, V8 i OA i izolata MI-23 na podlozi MPA. Budući da se radi o odstupanjima dva izolata u samo pojedinim karakteristikama, a da je u ovu morfološku grupu svrstan najveći broj izolata (52%), grupa je dovoljno homogena da se posmatra kao celina. Morfološke grupe II, III i IV bile su potpuno homogene.

Veliku morfološku varijabilnost izgleda kolonija izolata *Colletotrichum* spp. navode brojni autori (Freeman i sar., 1998; Dong i sar., 2007; Živković, 2011). Prema Freeman i sar. (1998) boja kolonije nije dovoljno pouzdan pokazatelj za diferencijaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Međutim, u slučaju hromogenih tipova, ružičasta boja kolonije upućuje na hromogene izolate *C. acutatum* (Trkulja, 2004; Gonzales i Sutton, 2004; Peres i sar., 2005, Živković, 2011).

Smith i Black (1990) ukazuju na morfološku varijabilnost kolonija *Colletotrichum* spp., naročito *C. acutatum* za koju navode da formira miceliju, bele, bež, narandžaste, ružičaste ili svetlo roze boje. Isti autori opisuju kolonije *C. gloeosporioides* kao tamno sive. Sonoda i Pelosi (1988) su utvrdili prisustvo dve morfološke grupe *Colletotrichum*

spp. Jedna grupa izolata je brzorastuća sive boje, a druga spororastuća narandžaste boje. Xie i sar. (2010) navode da na KDA podlozi *C. acutatum* formiraju u početku beličaste a kasnije sive kolonije, dok su kolonije *C. gloeosporioides* bele, a kasnije maslinaste boje.

U našem istraživanju, molekularnim ispitivanjima (PCR metoda primenom prajmera specifičnih za vrstu) utvrđeno je da izolati I, II i III morfološke grupe pripadaju vrsti *C. acutatum*, dok su izolati IV morfološke grupe identifikovani kao *C. gloeosporioides*. Dakle, izražena varijabilnost u morfologiji kolonije uočena je za vrstu *C. acutatum*, dok su kolonije izolata *C. gloeosporioides* dobijenih sa plodova jabuke bile ujednačenog izgleda, kao i referentni izolat ove vrste, što je potvrđeno i filogenetskom analizom. Naime, izolati *C. acutatum* svrstani su u tri klastera (A1, A2 i A3), dok su svi *C. gloeosporioides* izolati pripali jednom klasteru (klaster B).

Razlikovanje izolata vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* bilo je moguće na osnovu fenotipskih karakteristika kolonije, nezavisno od morfološke grupe u koju su svrstani izolati vrste *C. acutatum*. Micelija svih *C. gloeosporioides* izolata, na svim ispitanim podlogama je bila snežno bela, dok je boja micelije *C. acutatum* varirala u okviru morfološke grupe i u odnosu na podlogu na kojoj su izolati kultivisani, ali izolati ni u jednom slučaju nisu formirali snežno belu miceliju. Bela boja kolonije vrste *C. gloeosporioides* nije bila fenotipska karakteristika ove vrste u istraživanjima Smith i Black (1990) i Xie i sar. (2010). Međutim, Smith i Black (1990) navode da je boja kolonije svih *C. gloeosporioides* izolata bila jednaka, dok je boja kolonije izolata *C. acutatum* bila veoma varijabilna. Dakle, na osnovu uniformnosti izgleda kolonija izolata *C. gloeosporioides* i varijabilnosti kod *C. acutatum* bilo moguće razlikovati ove dve vrste u našim, i istraživanjima drugih autora. Međutim, različite boje kolonija koje se pripisuju vrsti *C. gloeosporioides* od istraživanja do istraživanja ukazuje da ova fenotipska karakteristika samostalno nije dovoljna kao kriterijum za identifikaciju do nivoa vrste.

Izolati III morfološke grupe bili su najmanje brojni (8% od ukupnog broja izolata) i filogenetskom analizom nisu se odvojili od nehromogenih *C. acutatum* tj. I morfološke grupe. Ovo ukazuje da ispoljene fenotipske karakteristike I i III morfološke grupe nemaju značaja kao kriterijum za identifikaciju vrste *C. acutatum*.

Izolati svrstani u II morfološku grupu se na osnovu fenotipskih odlika na podlozi KDA mogu svrstati u hromogene tipove vrste *C. acutatum*. Hromogene *C. acutatum* izolate kao posebnu morfološku grupu ove vrste izdvajaju i drugi autori (Freeman i sar., 1998; Trkulja, 2004; Gonzales i Sutton, 2004; Peres i sar., 2005; Živković, 2011). Isti

autori navode da iako boja kolonije nije dovoljno pouzdan pokazatelj za diferencijaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* u slučaju hromogenih tipova može se sa priličnom sigurnošću tvrditi da se radi o vrstama *C. acutatum*, što je bio slučaj i u ovom istraživanju. Međutim, treba imati na umu da je intenzivna ružičasta boja kolonije ovih izolata koja se koristi kao fenotipski kriterijum, u ovim istraživanjima ispoljena samo na podlozi KDA, dok je na ostalim podlogama, boja bila puno slabijeg intenziteta i varirala je od krem, narandžaste, do svetlo roze.

Takođe, prilikom filogenetske analize sekvenci rDNK-ITS regiona izolata iz različitih morfoloških grupa, utvrđeno je da se hromogeni izolati *C. acutatum* izdvajaju u poseban klaster, što ukazuje da je ružičasta boja kolonije na KDA podlozi pouzdan kriterijum za identifikaciju vrste *C. acutatum*.

U okviru I morfološke grupe, referentni izolat *C. acutatum* (TUT 137A) ispoljio je izvesna odstupanja u odnosu na ostale izolate ove grupe na pojedinim podlogama, što se može povezati sa rezultatima dobijenim prilikom molekularne analize sekvenci rDNK-ITS regiona, budući da se ovaj izolat izdvojio od ostalih nehromogenih izolata vrste *C. acutatum*.

Mikroskopskim pregledom vegetativnih organa nisu uočene razlike između ispitivanih izolata, te mikroskopski izgled vegetativnih organa nije značajan u razlikovanju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*.

7.3.2. Morfologija konidija

Morfologija konidija ispitana je za 33 dobijena izolata, kao i za referentne izolate. Konidije su jednoćelijske, bezbojne, hijalinske, glatke, prave, ili blago povijene. Prema obliku konidija izolati su svrstani u tri grupe: izolati sa fuziformnim konidijama, zaoštrenim na oba kraja (F), izolati sa cilindričnim konidijama zaoštrenim na jednom kraju (C1) i izolati sa cilindričnim konidijama zaobljenim na oba kraja (C2). Najveći broj izolata (19) formiralo je fuziformne konidije. Izolati su formirali konidije istog oblika bez obzira na to da li je do sporulacije dolazilo u kulturi ili na plodovima, osim što su pojedini izolati u kulturi formirali dva tipa konidija.

Konidije izolata identifikovanih kao *C. acutatum* bile su varijabilnog oblika. Samo su konidije izolata III morfološke grupe bile ujednačene (fuziformne, zaoštrene na oba kraja). Izolati II morfološke grupe obrazovali su fuziformne konidije, zaoštrene na oba

kraja i cilindrične konidije zaoštrene na jednom kraju. Izolati I morfološke grupe formirali su sva tri tipa konidija.

Ujednačen oblik konidija primećen je za izolate IV morfološke grupe koji su molekularno identifikovani kao *C. gloeosporioides*. Konidije svih izolata ove vrste bile su cilindrične, zaobljene na oba kraja. Rezultati filogenetske analize takođe su ukazali na homogenost ove grupe izolata koji su svrstani u jedan klaster (klaster B).

Dužina konidija je varirala među *C. acutatum* izolatima, dok su ove vrednosti kod izolata *C. gloeosporioides* bile ujednačenije. Vrednosti širine konidija bile su ujednačene kod svih izolata. Prosečna dužina i širina konidija bila je veća na veštački inokulisanim, u odnosu na konidije formirane u kulturi, na KDA podlozi.

Vrednosti prosečne dužine konidija pokazale su se kao pouzdan kriterijum za razlikovanje vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Prosečne vrednosti dužine konidija za nehromogene izolate (morfološka grupa I i III) *C. acutatum* su se kretale u opsegu od 12,9 µm do 15,7 µm i od 11,65 µm do 14,22 µm (na plodovima i u kulturi, respektivno), a za hromogene izolate (morfološka grupa II) od 13,39 do 15,7 µm i od 12,89 do 14,8 µm (na plodovima i u kulturi, respektivno). Dobijene vrednosti odgovaraju vrednostima koje se za *C. acutatum* navode u literaturi, nezavisno od domaćina (Sutton, 1980; Lewis i sar., 2004; Trkulja, 2004; Živković, 2011). Prosečne vrednosti dužine konidija za *C. gloeosporioides* su iznosile od 17,71 µm do 19,59 µm i od 16,42 µm do 18,98 µm (na plodovima i u kulturi, respektivno), što je u slaganju sa vrednostima dostupnim u literaturi (Sutton, 1980; Baxter i sar., 1983; Trkulja, 2004; Živković, 2011).

U istraživanjima Živković (2011) morfologija konidija pokazala se kao zadovoljavajući kriterijum za razlikovanje vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Na osnovu rezultata ovog istraživanja, veličina konidija se takođe pokazala kao zadovoljavajući kriterijum za razlikovanje ove dve vrste, budući da su prosečne vrednosti dužine konidija kod *C. acutatum* bile niže. Međutim, oblik konidija pokazao se nedovoljno pouzdanim, budući da su tri *C. acutatum* izolata formirala cilindričan oblik konidija zaobljen na oba kraja, kao i svi *C. gloeosporioides* izolati.

7.3.3. Obrazovanje teleomornog stadijuma

Čuvanjem kultura i veštački inokulisanih plodova do potpunog iscrpljivanja nije uočeno formiranje peritecija, te je zaključeno da ni jedan od ispitivanih izolata nije formirao teleomorni stadijum *Glomerella* spp. Odsustvo polnog stadijuma *Glomerella*

navode brojni autori (Freeman i sar., 1998; Trkulja, 2004; Živković, 2011). Kako navode Wharton i Dieguez-Uribeondo (2004), polna rekombinacija kod većine *Colletotrichum* vrsta je retka u prirodi.

Polni stadijum vrste *C. acutatum* nije nikada pronađen u prirodi. Ipak, ispitivanja su pokazala da postoji velika genetska raznolikost i heterogenost u okviru ove vrste (Johnston i Jones, 1997; Freeman i sar., 2001). Jedna od hipoteza za objašnjenje ove raznolikosti je polna rekombinacija među različitim sojevima gljive. Dokazi o postojanju polne rekombinacije kod vrste *C. acutatum* dobijeni su u istraživanjima Guerber i Correll (2001) u kojima je teleomorf, *G. acutata*, dobijen u veštačkoj kulturi ove vrste na podlozi sa minimalnim sadržajem nutrijenata „Minimal Salts Medium“. Naime, na podlogu su zasejavana po dva izolata za koje je u preliminarnim istraživanjima utvrđeno da su kompatibilni (podaci o metodici primenjenoj u preliminarnim istraživanjima se ne navode). Između izolata su postavljani sterilni drveni štapići. Izolati su se susretali na štapićima, gde je dolazilo do oplodnje, i na sredini štapića su formirane peritecije. U istim istraživanjima je utvrđeno da su izolati vrste *C. acutatum* poreklom iz istih domaćina autosterilni, međutim oplodnja sa izolatima *C. acutatum* iz različitih domaćina vrlo brzo je dovela do pojave teleomorfa *G. acutata*. Odsustvo polnog stadijuma *G. acutata* u našem istraživanju može se objasniti poreklom izolata iz istog domaćina (jabuke) i pojavom autosterilnosti između istih.

Postojanje polnog stadijuma *C. gloeosporioides* (*G. cingulata*) na plodovima jabuke utvrđeno je u prirodi, pri čemu je izvršena izolacija iz ploda na hranljivu podlogu (Latham i Williams 1983; Camilo i sar., 1988; Sutton, 1990; Borge i Stensvand, 2007), gde je potvrđeno formiranje peritecija. Takođe, kako navode Xie i sar., (2010) u veštačkoj kulturi ovih gljiva, *in vitro* na KDA podlozi, utvrđeno je formiranje peritecija bez obezbeđivanja posebnih uslova. Uzrok odsustva polnog stadijuma vrste *C. gloeosporioides* u ovom istraživanju je verovatno isti kao i u slučaju sa *C. acutatum*.

Autori koji su od 2000. godine na ovim prostorima istraživali rod *Colletotrichum* (Trkulja, 2004; Živković, 2011) takođe nisu zabeležili prisustvo polnog stadijuma ove dve vrste *in vivo* i *in vitro*. Njihova istraživanja su bila usmerena na različite domaćine, te su raspolagali izolatima *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* za koje se može pretpostaviti da nisu autosterilni i da bi njihova polna rekombinacija mogla dovesti do pojave teleomorfa *in vitro*. Međutim, ni jedan od dva pomenuta autora nije ispitao mogućnost polne rekombinacije.

7.3.4. Uticaj hranljivih podloga na rast izolata

Ispitane hranljive podloge pokazale su se kao značajan izvor variranja rasta kolonija izolata *Colletotrichum* spp. Na svim ispitanim podlogama izolati IV morfološke grupe, molekularno identifikovani kao *C. gloeosporioides*, ispoljili su intenzivniji rast od izolata I, II i III morfološke grupe, koji su molekularno identifikovani kao *C. acutatum*. Veći broj autora navodi brži rast *C. gloeosporioides* u odnosu na *C. acutatum*, kao karakteristiku taksonomskog značaja koja može poslužiti za razlikovanje ove dve vrste (Smith i Black, 1990; Bernstein i sar., 1995; Shi i sar., 1996; McKay i sar., 2009), što je i u ovom istraživanju potvrđeno.

Rast izolata *C. acutatum* bio je najizraženiji na podlozi V8, dok je najslabiji bio na podlozi SDA koja se pokazala najpogodnijom za rast *C. gloeosporioides* izolata. SDA podloga se i u drugim istraživanjima pokazala najnepovoljnijom za rast drugih *Colletotrichum* vsta, kao na primer u slučaju vrste *C. capsici* gde je u odnosu na podloge KDA, Czapek Dox Agar podlogu (CDA) i Peptone Yeast Extract Dextrose Agar podlogu (PYDA) ova vrsta ispoljila najslabiji rast (Roy i sar., 2013). Međutim, suprotno rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, Taisval i Benagi (2009) navode slabiji rast izolata *C. gloeosporioides* na SDA podlozi u odnosu na rast na OA, V8 i PDA podlozi. Iz navedenih razloga, uočena razlika u rastu vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* na SDA podlozi se ne može preporučiti kao pouzdan kriterijum za razlikovanje ove dve vrste.

Sporulacija je kod većine izolata primećena na svim ispitanim podlogama. Međutim, na podlozi SDA, kod svih izolata IV morfološke grupe, molekularno identifikovanih kao *C. gloeosporioides*, sporulacija je izostala, što je saglasno navodima Taisval i Benagi (2009). Intenzivan micelijski rast na ovoj podlozi koji je zabeležen u ovom istraživanju, govori u prilog izostanka sporulacije kod ove vrste.

7.3.5. Uticaj temperature i svetlosti na rast izolata

Temperatura se pokazala kao izuzetno značajan izvor variranja micelijskog rasta izolata *Colletotrichum* spp. Najintenzivniji rast svih izolata utvrđen je na 25°C, sa izuzetkom dva izolata *C. acutatum* (ME-7 i TUT 137A) za koje je najintenzivniji rast zabeležen na 20°C. Na 25°C najveću brzinu rasta ispoljili su izolati *C. gloeosporioides* (IV morfološka grupa), zatim nehromogeni *C. acutatum* izolati (III morfološka grupa), hromogeni *C. acutatum* (II morfološka grupa), a najslabiji rast zabeležen je kod nehromogenih *C. acutatum* izolata (I morfološka grupa). Ovaj podatak je još jednom

ukazao na pouzdanost kriterijuma brzine rasta micelije za razlikovanje ove dve vrste što navode i Smith i Black (1990), Bernstein i sar. (1995), Shi i sar. (1996), McKay i sar. (2009).

Rast svih izolata utvrđen je u intervalu od 6 do 33°C. Utvrđene su razlike u graničnoj minimalnoj i maksimalnoj temperaturi rasta izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Minimalna i maksimalna temperatura na kojoj prestaje rast izolata *C. acutatum* iznosila je 4 i 35°C (respektivno). Za *C. gloeosporioides* minimalna temperatura na kojoj prestaje rast iznosila je 5°C, a na 35°C izolati ove vrste su još uvek rasli. Kako navodi Everett (2003) *C. acutatum* je tolerantniji na niske temperature od *C. gloeosporioides* čija osetljivost se ispoljava već na 5,5°C, dok se osetljivost *C. acutatum* na niske temperature ispoljava pri 4,1°C. Utvrđene razlike ukazuju da rast izolata *Colletotrichum* spp. na ekstremnim temperaturama može poslužiti kao kriterijum za razlikovanje dve ispitivane vrste, na šta su ukazali i autori Adaskaveg i Hartin (1997).

7.4. Molekularna identifikacija izolata *Colletotrichum* spp.

Molekularna identifikacija izolata izvršena je primenom PCR metode, pomoću prajmera specifičnih za vrstu, kao i kloniranjem rDNK-ITS regiona pomoću univerzalnih prajmera i analizom dobijenih sekvenci.

7.4.1. Identifikacija primenom prajmera specifičnih za vrstu

Primenom prajmera specifičnih za vrstu 28 izolata identifikovano je kao *C. acutatum*, a pet izolata kao *C. gloeosporioides*. Referentni izolati TUT 137A i AVO 374B identifikovani su kao *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, respektivno. Screenivasaprasad i sar. (1996), Lewis Ivey i sar. (2004), Martinez i sar. (2009), Živković (2011), Liu i sar. (2012) i mnogi drugi navode specifične forward prajmere CaInt2 i CgInt u kombinaciji sa revers univerzalnim prajmerom ITS4, kao visoko pouzdane za identifikaciju *Colletotrichum* spp. do nivoa vrste primenom metode PCR.

Činjenica da je od 33 identifikovana izolata, samo pet molekularno identifikovano kao *C. gloeosporioides* govori u prilog tome da je *C. acutatum* postala dominantna vrsta na jabuci kod nas u odnosu na *C. gloeosporioides*. Kako navode Talhinhos i sar. (2005), vrsta *C. acutatum* je sve češći uzročnik antraknoze sa učešćem od >97% dok oboljenja uzrokovana vrstom *C. gloeosporioides* čine svega oko 3%.

Molekularna analiza primenom prajmera specifičnih za vrstu je potvrdila da neke od primećenih razlika u morfološkim i fiziološkim odlikama izolata imaju taksonomski

karakter i mogu se koristiti u identifikaciji do nivoa vste. Ovo se odnosi na izgled kolonija koji kod *C. acutatum* varira u okviru tri morfološke grupe (I, II i III), od svetlo sive do ružičaste, dok su kod *C. gloeosporioides* kolonije snežno bele (IV morfološka grupa). Oblik spora *C. acutatum* je varirao i pojedini izolati su formirali spore cilindričnog oblika zaobljene sa obe strane koje su specifične za sve *C. gloeosporioides*, te je molekularnom identifikacijom potvrđeno da ovaj kriterijum ne može pouzdano diskriminisati pomenute vrste. Međutim, intenzivniji rast *C. gloeosporioides* na podlogama KDA, MPA, V8, SDA i OA i osetljivost *C. acutatum* na visoku temperaturu (35°C), a *C. gloeosporioides* na nisku (5°C) u saglasnosti su sa rezultatima molekularne identifikacije, te ovi kriterijumi mogu doprineti razlikovanju vrsta. Primenom prajmera specifičnih za vrstu nije bilo moguće objasniti morfološke razlike između izolata u okviru vrste *C. acutatum*.

7.4.2. Kloniranje sekvenci rDNK-ITS regiona

Primenom univerzalnih prajmera ITS1 i ITS4 amplifikovani su produkti rDNK-ITS regiona čija je veličina bila oko 600 bp, što je bilo i očekivano u odnosu na literaturne podatke dostupne za ovaj region rDNK za *Colletotrichum* spp. (Freeman i sar., 2001; Culebras i sar., 2003). Dobijeni produkti su prečišćeni i poslani na dvosmerno sekvencioniranje.

7.4.3. Filogenetska analiza

Filogenetskoj analizi dobijenih sekvenci pristupljeno je nakon što je utvrđeno da su sekvence dobrog kvaliteta (pikovi su dobro vidljivi, ne dolazi do njihovog preklapanja). Sekvence su poravnate i određena je konsenzus sekvencu dužine 545 bp. Izrađena su filogenetska stabla za koje je izvršena analiza sopstvenih replikacija grananja i prosečne bootstrap vrednosti iznosile su 92,8% (metoda maksimalne sličnosti) i 95% (metoda maksimalne parasimonije), što ukazuje na visoku stabilnost dobijenih grananja i pouzdanost zaključaka koji se donose analizom stabla, jer kako navode Crouch i sar. (2009), bootstrap vrednosti >75% obezbeđuju pouzdano analiziranje izrađenih filogenetskih stabala.

Primenom metode maksimalne parasimonije dobijeni su jasniji rezultati o genetičkoj divergentnosti ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. Svi *Colletotrichum* spp. izolati se sa 100% bootstrap vrednosti odvajaju od vrste *M. fructigena* (broj u Gen Banci: HF678389) koja je korišćena kao outgroup vrsta. Analizom dendograma zaključujemo da se svi izolati *C. acutatum* sa 100% bootstrap vrednosti odvajaju od *C. gloeosporioides*.

Dobijeni rezultat u skladu je sa rezultatima dobijenim identifikacijom izolata primenom prajmera specifičnih za vrstu. Na izrađenom stablu, u okviru *C. acutatum* se jasno izdvajaju tri klastera, što je u skladu sa izraženim morfološkim razlikama koje su u istraživanju ispoljili izolati *C. acutatum*. Jedan klaster čine izolati BV-6, Č-13 i TUT 137A sa visokom bootstrap vrednošću od 90% u okviru koga se izdvaja još jedan klaster sa visokom bootstrap vrednošću od 92% koji čine hromogeni izolati *C. acutatum* (BV-6 i Č-13). Treći klaster sa visokom bootstrap vrednošću od 93% čini sekvenca *C. acutatum* koja je preuzeta iz GenBanke (Broj u Gen Banci: AJ749688) i nehromogeni izolati *C. acutatum* B-7, SB-12, MR-10, MI-23 i LP-8. Izolati *C. gloeosporioides* pripadaju istom genetičkom klasteru zajedno sa sekvencom *C. gloeosporioides* koja je preuzeta iz Gen Banke (Broj u Gen Banci: KF053199) sa 100% bootstrap vrednosti. U okviru klastera *C. gloeosporioides* nije došlo do formiranja drugih klastera, što je u skladu sa ujednačenim odlikama koje su ovi izolati ispoljili u morfološkim i fiziološkim ispitivanjima.

Najveća genetička udaljenost utvrđena je između klastera koji čine hromogeni *C. acutatum* izolati i klastera koji čine izolati *C. gloeosporioides* (0,100 U).

Crouch i sar. (2009) ukazuju na nedostatak analize rDNK-ITS i tvrde da razlikovanje manjih podgrupa samo na osnovu ITS gena nije dovoljno pouzdano i da su bootstrap vednosti obično ispod 50%. Slično, manje podgrupe primenom metode parasimonije u okviru *Colletotrichum* spp., sa bootstrap vrednošću ispod 75% navodi više autora (Lu i sar., 2004; Du i sar., 2005; LoBuglio i Pfister, 2008).

Kako navode Crouch i sar. (2009), svetska mikološka zajednica teži da sastavi univerzalnu platformu sa barkodovima zasnovanim na ITS sekvenci za čitavo carstvo gljiva (vidi www.allfungi.com/its-barcode.php). Iz ovog razloga, od suštinskog je značaja utvrditi da li se ITS sekvence za rod *Colletotrichum* mogu primenjivati kao precizne, jeftine i lako primenljive metode za identifikaciju u okviru roda *Colletotrichum*. Na osnovu rezultata ovog istraživanja, i dobijenih visokih bootstrap vrednosti, može se odgovoriti da je ova metoda pouzdana za razlikovanje do nivoa vrste i osnovnih grupa (hromogene i nehromogene) u okviru vrste *C. acutatum* koje su već definisane na bazi morfoloških razlika (Freeman i sar., 1998; Gonzales i Sutton, 2004; Peres i sar., 2005). Međutim, odvajanje grupa u okviru nehromogenih sojeva ove vrste bi se moralo podržati sa multilokusnom molekularnom filogenetskom analizom koja će pored ITS sekvence analizirati i neki dodatni gen (na primer β – tubulin, TUB₂) (Damm i sar., 2012). Ovo je svakako u budućnosti zadatak svakog mikologa koji se dotakao istraživanja roda

Colletotrichum, kako bi se doprinelo pouzdanom rešavanju ovih dilema. Takođe, isti autori navode da isključivanje primene ITS sekvence u molekularnim istraživanjima roda *Colletotrichum* spp. svakako nije opcija, naročito što istraživanje ovog regiona omogućava i utvrđivanje povezanosti ovog roda sa ostalim rodovima iz carstva gljiva.

Filogenetska stabla izrađena na osnovu metoda kao što su maksimalna sličnost, maksimalna parasimonija i Bayesian interference, uparena isključivo sa autentičnim sekvencama iz baze podataka, što je u ovom istraživanju bio slučaj, trenutno predstavlja najbolju opciju kako bi se greške u identifikaciji *Colletotrichum* spp. na osnovu ITS sekvence svele na minimum (Crouch i sar., 2009).

7.5. Biološka zaštita plodova jabuke od *Colletotrichum* spp.

7.5.1. Antifungalno delovanje *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* i *L. mesenteroides* na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* in vitro

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su ispitivani mikroorganizmi bili značajan izvor variranja inhibicije rasta micelije nehromogenog (HA-3) i hromogenog (K-4) izolata *C. acutatum* i izolata MR-1 *C. gloeosporioides*. Najveću inhibiciju porsta micelije izolata u odnosu na sve ostale ispitane mikroorganizme, kao i u odnosu na kontrolu uzrokovao je *S. hygroscopicus*. Međutim, inhibicija rasta micelije oba izolata *C. acutatum* bila je značajno veća u varijanti u kojoj je primenjen sintetički fungicid Zato 50-WG u odnosu na *S. hygroscopicus*. Kod *C. gloeosporioides* postignuta inhibicija rasta sa *S. hygroscopicus* i Zato 50 WG bila je na istom nivou značajnosti.

Kako navode Doumbou i sar. (2001), većina ispitanih aktinomiceta iz roda *Streptomyces* koje ispoljavaju antifungalno delovanje postižu zadovoljavajući nivo zaštite u laboratorijskim uslovima, što upućuje na konstataciju da bi mogli biti alternativa, ili dopuna hemijskim fungicidima. Prema Shimizu i sar. (2009), inhibicione zone postignute u *in vitro* oglecima koje iznose preko 11 mm upućuju na potencijalno efikasnog antifungalnog agensa čiju aktivnost svakako treba uvažiti i ispitati i *in vivo*. U istraživanjima Prapagdee i sar. (2008), prečnik zone inhibicije rasta micelije izolata *C. gloeosporioides* primenom različitih aktinomiceta iz roda *Streptomyces* kretao se u opsegu od 5 do preko 20 mm, pri čemu su sojevi kod kojih je postignut prečnik inhibicije bio ispod 5 mm okarakterisani kao sojevi koji ne ispoljavaju antifungalnu aktivnost. U ovom istraživanju, poluprečnih inhibicije izolata *Colletotrichum* spp. postignut primenom *S. hygroscopicus* kretao se od 15 do 18,5 mm, te prečnik iznosi od 30 do 37 mm, što je u

nivou sojeva sa najvišom antifungalnom aktivnošću u istraživanjima Prapagdee i sar. (2008) koje je obuhvatilo 146 različitih sojeva aktinomiceta izolovanih iz zemljišta, pri čemu je samo 21 soj ispoljio ovakav nivo antifungalnog delovanja na *C. gloeosporioides*. Primenom kriterijuma Shimizu i sar. (2009) i Prapagdee i sar. (2008), za antifungalnu aktivnost postignutu sa *S. aureus* može se reći da je na granici zadovoljavajuće (poluprečnik inhibicije 2,34 mm kod nehromogenog *C. acutatum*, 3,83 mm kod hromogenog *C. acutatum* i 4,00 mm kod *C. gloeosporioides*). Primenom istih kriterijuma, antifungalna aktivnost *B. cereus* na *C. gloeosporioides* postignuta u ovom istraživanju (poluprečnik zone inhibicije 9,67 mm) svakako ukazuju na visok potencijal i ovog agensa, međutim njegovo delovanje na nehromogeni i hromogeni izolat vrste *C. acutatum* čija je zastupljenost na jabukama u godinama istraživanja bila značajno veća, a što su na različitim kulturama zabeležili i istraživači širom sveta, nije bilo zadovoljavajuće. Aktivnost *P. aeruginosa* zabeležena je samo u slučaju nehromogenog *C. acutatum* izolata, međutim, na osnovu pomenutih kriterijuma, ona se ne može uzeti u obzir kao antifungalna (poluprečnik 0,34 mm). Nezavisno od kriterijuma koji bi se primenio, mikroorganizmi *S. cervisae* i *L. mesenteroides* nisu ispoljili antifungalno delovanje na oba izolata *C. acutatum* i izolat *C. gloeosporioides*.

7.5.2. Antifungalno delovanje *B. subtilis* (sojevi N 146, ST 1/III, Č 13 i QST 713) na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* in vitro

Ispitani sojevi *B. subtilis* (N146, ST 1/III, Č13 i QST 713) uzrokovali su značajno veću inhibiciju rasta micelije nehromogenog (HA-3) i hromogenog (K-4) izolata *C. acutatum* i izolata MR-1 *C. gloeosporioides* u odnosu na kontrolu, ali značajno manju u odnosu na fungicid Zato 50 WG. Nije utvrđena statistički značajna razlika u inhibiciji između različitih sojeva *B. subtilis*.

U istraživanjima Kelemu i Badel (1994), izolat *B. subtilis* izolovan iz zemljišta u Peruu uzrokovao je značajnu inhibiciju rasta micelije *C. gloeosporioides* koja je bila na istom nivou, a ponekad i veća od inhibicije uzrokovane primenom benomila (količina 530 µg/ml). Aktivnost različitih sojeva *B. subtilis* na različite vrste iz roda *Colletotrichum* navode i Havenga i sar. (1999), Collins i Jacobsen (2003), Ongena i sar. (2005), Demoz i Korsten (2006), Kupper (2009), Živković i sar. (2010), Fu i sar. (2010) i Cawoy i sar. (2011). Međutim, u istraživanjima Rajput (2011), među četiri ispitana mikrobiološka agensa, izolat *B. subtilis* je uzrokovao najslabiju inhibiciju rasta micelije *C. capsici* (41,02%). U istraživanjima sa izolatima *Colletotrichum* spp. nije utvrđena značajna razlika

u antifungalnom delovanju različitih sojeva *B. subtilis* međutim, u istraživanjima Tanović i sar. (2012) soj N 146 ispoljio je jače inhibitorno delovanje na izolat *Monilia fructicola* od sojeva *B. subtilis* koji predstavljaju aktivnu komponentu biopreparata (ST 1/III, Č 13 i QST 713).

Inhibicija rasta micelije izolata *Colletotrichum* spp. primenom četiri različita soja *B. subtilis* u ovom istraživanju bila je slabija od inhibicije postignute primenom *S. hygroscopicus*. Međutim, prema već pomenutim kriterijumima Shimizu i sar. (2009) i Prapagdee i sar. (2008), postignut nivo inhibicije bio je zadovoljavajući, iako značajno niži u odnosu na varijantu sa sintetičkim fungicidom. Iz navedenog razloga, antifungalno delovanje sva četiri soja *B. subtilis* ispitano je u *in vivo* ogledima.

7.5.3. Antifungalno delovanje *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *B. cereus* i *P. aeruginosa* na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* *in vivo*

Na osnovu dobijenih rezultata u *in vitro* ogledima, *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *B. cereus* i *P. aeruginosa* su odabrani za testiranje *in vivo*. Razvoj nekroze na plodovima jabuke tretiranim sa *S. hygroscopicus* i veštački inokulisanim sa nehromogenim (HA-3) i hromogenim (K-4) izolatom *C. acutatum* i izolatom MR-1 *C. gloeosporioides* bio je na istom nivou kao i kod plodova koji su pre inokulacije tretirani sa fungicidom Zato 50 WG. Razvijena nekroza na plodovima tretiranim *S. hygroscopicus* bila je na statistički značajno nižem nivou u odnosu na plodove tretirane sa *S. aureus*, *B. cereus* i *P. aeruginosa* i plodove u kontroli. Ostvareni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima zabeleženim *in vitro*. Na plodovima tretiranim sa *S. aureus*, *B. cereus* i *P. aeruginosa* razvoj nekroze je uglavnom bio na nižem nivou u odnosu na kontrolu, ali na višem u odnosu na plodove tretirane hemijskim fungicidom i *S. hygroscopicus*. Otuda, *S. hygroscopicus* izabran je kao mikroorganizam za oglede u kojima je cilj bio maksimizacija njegove antifungalne aktivnosti na vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, određivanje načina delovanja i trajanja kultivacije.

Kako navodi Doumbou (2001) identifikacija aktinomiceta koje imaju sposobnost kolonizacije biljnog tkiva i ispoljavaju antagonističko delovanje na biljne patogene su od izuzetnog značaja. Podataka o antagonističkom delovanju *Streptomyces* spp. na *Colletotrichum* spp. je malo (Prapagdee i sar. 2008, 2008a; Shimizu i sar., 2009; Živković i sar., 2010; Ismet i sar., 2012), jer su pretežno izučavani kao antagonisti zemljišnih patogena. Shimizu i sar. (2009) utvrdili su zadovoljavajuće antifungalno delovanje nekih

sojeva *Streptomyces* sp. na kotiledonima i listovima krastavca veštački inokulisanih sa prouzročivačem antraknoze *C. orbiculare*, kao i Prapagdee i sar. (2008a) za različite sojeve *S. hygroscopicus* na listovima orhideje veštački inokulisanim sa *C. gloeosporioides*. Značajno redukovane simptome nekroze na plodovima banane tretiranim sa *Streptomyces* sp. i veštački inokulisanim sa *C. musae* registrovali su Ismet i sar. (2012). Međutim, u literaturi nema podataka o antifungalnom delovanju *S. hygroscopicus* direktno na plodovima jabuke te dobijeni rezultati imaju veliki praktičan i naučni značaj.

7.5.4. Antifungalno delovanje *B. subtilis* (sojevi N 146, ST 1/III, Č13 i QST 713) na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* *in vivo*

Svi ispitani sojevi *B. subtilis* uzrokovali su značajno slabiji razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima sa nehromogenim (HA-3) i hromogenim (K-4) izolatom *C. acutatum* i izolatom *C. gloeosporioides* (MR-1) u odnosu na kontrolu, ali značajno jači razvoj nekroze u odnosu na plodove u koji su tretirani fungicidom Zato 50 WG. Dobijeni rezultati u *in vivo* ogledu su u saglasnosti sa rezultatima ostvarenim u *in vitro* testovima.

Korsten i sar. (1995) i Van Dyk i sar. (1997) navode izuzetan potencijal *B. subtilis* (soj ATCC55466/B246) kao tretman pred berbu u cilju zaštite plodova od antraknoze posle berbe, kao i antagonistu koji se primenjuje posle berbe plodova. Compant i sar. (2005) navode da bakterije roda *Bacillus* antifungalno delovanje ispoljavaju sekrecijom antibiotika i kompleksom degradacionih enzima, širokog spektra delovanja. Različiti sojevi roda *Bacillus* a naročito vrste *B. subtilis* su danas komercijalizovani u obliku biopesticida. Prem Cawoy i sar. (2011), oko polovine komercijalno dostupnih bakterijskih preparata za biološku zaštitu je na bazi bakterija iz ovog roda. Konkretno primere za primenu *B. subtilis* u različitim usevima za suzbijanje prouzročivača antraknoze iz roda *Colletotrichum* navode različiti autori: Ongena i sar. (2005) – *C. lagenarium* na krastavcima; Demoz i Korsten (2006) – suzbijanje *C. gloeosporioides* na avokadu; Fu i sar. (2009) – *C. musae* na banani; Kupper (2009) – *C. acutatum* na citrusima. Podataka o *in vivo* delovanju *B. subtilis* na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* direktno na plodovima jabuke nema u dostupnoj literaturi, te rezultati ovog istraživanja predstavljaju značajan doprinos naučnim i praktičnim saznanjima.

U *in vitro* i *in vivo* ogledima u ovom istraživanju ispitani sojevi *B. subtilis* ispoljili su snažno antifungalno delovanje na *Colletotrichum* spp. i pokazali da imaju visok

potencijal za primenu u biološkoj zaštiti plodova jabuke od prouzrokovača truleži iz roda *Colletotrichum*.

Međutim, *S. hygroscopicus* je ispoljio najsnažnije antifungalno delovanje od svih mikroorganizama (*S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* sojevi N 146, ST 1/III, Č 13 i QST 713) testiranih *in vivo*, vrlo često na nivou hemijskog fungicida, te je izabran za oglede u kojima je cilj bio maksimizacija njegove antifungalne aktivnosti na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, određivanje načina delovanja i optimalnog trajanja kultivacije.

7.5.5. Optimizacija sastava hranljive podloge za kultivaciju *S. hygroscopicus*

U sprovedenim istraživanjima, analizom varijanse je utvrđeno da je simultano variranje izvora ugljenika i azota statistički visoko značajan izvor variranja antifungalnog delovanja *S. hygroscopicus* na izolate *C. acutatum* (HA-3) i *C. gloeosporioides* (MR-1). Ovaj rezultat je u skladu sa tvrdnjama Doumbou i sar. (2001) da sastav podloge koji se koristi prilikom kultivacije *Streptomyces* spp. ima ključnu ulogu u određivanju njegove antifungalne aktivnosti.

Utvrđeno je da glicerol (izvor ugljenika) i ekstrakt kvasca (izvor azota) obezbeđuju najjače antifungalno delovanje testiranog izolata *S. hygroscopicus* na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Najpovoljniji izvori ugljenika i azota u podlozi za kultivaciju *Streptomyces* sp. u cilju maksimalne antifungalne aktivnosti razlikuju se u zavisnosti od vrste aktinomicete do patogena na kogjem se ispituje antifungalno delovanje. Na primer, u istraživanjima Chattopadhyay i Sen (1997) najjača antifungalna aktivnost *S. rochei* G 164 postignuta je pri primeni saharoze kao izvora ugljenika i peptona kao izvora azota. Za drugi soj (ACTA1551) iste vrste ove aktinomicete, autori Kanini i sar. (2013) navode glukozu kao najpovoljniji izvor ugljenika i pepton iz soje kao najbolji izvor azota za maksimalno antifungalno delovanje na *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. S obzirom na različite zahteve za izvorom ugljenika kod različitih sojeva iste vrste streptomiceta, rezultat da glicerol predstavlja najpovoljniji izvor ugljenika za vstu *S. hygroscopicus* kada se on posmatra kao antifungalni agens, nije iznenađujući. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa navodom Singh i sar. (2011) da je glicerol značajan sastojak podloga koje se koriste u biotehnološkim procesima proizvodnje antifungalnih materija. Takođe, kako navode Zhanyou i sar. (2007) otpadni glicerol, primarni nusproizvod u proizvodnji biodizela, može se koristiti kao izvor ugljenika u industrijskoj mikrobiologiji za proizvodnju

različitih metabolita. Velike količine sirovog glicerola su dostupne na tržištu budući da je suviše skupo prečišćavati ih u proizvode većeg stepena čistoće. Uzevši ovu činjenicu u obzir, kao i dokazanu sposobnost *S. hygroscopicus* da koristi glicerol i pretvori ga u antifungalne metabolite ukazuje na značaj dobijenog rezultata i u ekonomskom smislu.

Primenom Box-Benkenovog eksperimentalnog plana dobijeno je 15 kombinacija sastava podloge koje su sadržale različite količine glicerola (izvor ugljenika), ekstrakta kvasca (izvor azota) i fosfata (tri faktora, na tri nivoa). Ispitan je uticaj kultivacije u ovako pripremljenim podlogama na antifungalno delovanje *S. hygroscopicus* na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Primenom jednačine polinoma drugog reda, dobijena je matematička zavisnost inhibicije rasta *C. acutatum* (HA-3) i *C. gloeosporioides* (MR-1) od sadržaja glicerola, ekstrakta kvasca i fosfata u podlozi za kultivaciju *S. hygroscopicus*. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije (0,973 i 0,958) ukazali su na adekvatno fitovanje eksperimentalnih podataka polinomom drugog reda, tj. da je izabrani matematički model odgovarajući za ispitivanje zavisnosti inhibicije rasta *Colletotrichum* spp. od variranja sadržaja glicerola, ekstrakta kvasca i fosfata u podlozi po Box-Benkenovom planu. Ova zavisnost je grafički prikazana metodom odzivnih površina. Sa povećanjem sadržaja ekstrakta kvasca u podlozi, antifungalno delovanje na *C. acutatum* (HA-3) se smanjuje, što ukazuje da povećanje sadržaja ovog nutrijenta u podlozi stimuliše rast biomase proizvodnog mikroorganizma. Ovaj rezultat se podudara sa navodima Suutary i sar. (2002) da ekstrakt kvasca deluje stimulatивно umnožavanje biomase proizvodnog mikroorganizma u pogledu brzine i količine. Najjača antifungalna aktivnost na *C. acutatum* zabeležena je u slučaju primene količine ekstrakta kvasca 5 - 10 g/l što obezbeđuje dovoljno azota za umnožavanje biomase, ali ograničava trajanje eksponencijalne faze. Pri primenjenim većim količinama ekstrakta kvasca, usled dužeg trajanja eksponencijalne faze, dolazi do značajnog iscrpljenja hranljive podloge pre početka stacionarne faze rasta tokom koje se odvija produkcija sekundarnih proizvoda metabolizma. Jasno je da sadržaj glicerola u posmatranom opsegu, koji je kao izvor ugljenika značajan za primarni i sekundarni metabolizam, ima značajno slabiji uticaj na posmatrani odziv u odnosu na sadržaj ekstrakta kvasca. Sa konstantnim sadržajem fosfata (1 g/l), maksimalna antifungalna aktivnost na *C. acutatum* se postiže sadržajem glicerola 12-16 g/l.

Pri malim količinama glicerola u podlozi, povećanje sadržaja fosfata u primenjenom opsegu nema značajan uticaj na posmatrani odziv. Međutim, pri većim

količinama glicerola sa povećanjem sadržaja fosfata dolazi do značajnog povećanja zone inhibicije, i maksimalne vrednosti ovog odziva postižu se sa sadržajem glicerola 14-20 g/l i fosfata 1,3-1,5 g/l. Prema Li i sar. (2007), neorganski fosfor ispoljava negativan uticaj na proizvodnju nekih sekundarnih metabolita, dok proizvodnja drugih nije inhibirana viškom neorganskog fosfora. U ovom istraživanju, maksimalna inhibicija rasta izolata *C. acutatum* postignuta je pri relativno velikom sadržaju fosfata, te se može zaključiti da ovaj nutritijent ne utiče negativno na proizvodnju antifungalnih metabolita izolata *S. hygroscopicus* u primenjenim uslovima.

Pri sadržaju ekstrakta kvasca 5-10 g/l, rast biomase je vidno ograničen malom količinom izvora azota te količina fosfata ima neznatan uticaj na antifungalnu aktivnost na *C. acutatum*. Štaviše, i minimalne primenjene količine fosfata u primenjenom opsegu obezbeđuju dovoljnu količinu ovog nutritijenta za potrebe sekundarnog metabolizma. Prema tvrdnjama Sanchez i Demain (2002), neorganski fosfati generalno negativno utiču na proizvodnju sekundarnih metabolita budući da inhibiraju fosfataze potrebne za biosintezu. Međutim, Ripa i sar. (2009) navode da postoje i slučajevi u kojima fosfati ispoljavaju pozitivan uticaj na antimikrobnu aktivnost *S. hygroscopicus*.

Variranje sastava podloge za kultivaciju *S. hygroscopicus* ima gotovo identičan uticaj na njegovu antifungalnu aktivnost usmerenu i ka vrsti *C. gloeosporioides*. Jedina značajna razlika se uočava u uticaju sadržaja glicerola i fosfata pri srednjem primenjenom sadržaju ekstrakta kvasca. Naime, maksimalno antifungalno delovanje na *C. gloeosporioides* postignuto je pri manjoj količini glicerola u odnosu na *C. acutatum* (12-18 g/l). Budući da je tokom kultivacije česta pojava više sporednih proizvoda pored ciljanog metabolita, te se može pretpostaviti da je inhibitorno delovanje *S. hygroscopicus* na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* posledica delovanja različitih inhibitornih komponenata.

Izolati gljiva na koje je ispitana antifungalna aktivnost *S. hygroscopicus* pripadaju različitim *Colletotrichum* vrstama, te je otuda moguća različita osetljivost na antifungalne metabolite ovog mikroorganizma. Razlika u osetljivosti *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* na hemijske fungicide (posebno iz grupe benzimidazola) već je ranije utvrđena. Osetljivost na benomil (fungicid iz grupe benzimidazola) Shabi i sar. (1994) i Rueda i sar. (2013) navode i kao jedan od kriterijuma za razlikovanje vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*.

Utvrđeno je da se visoka inhibicija rasta *Colletotrichum* spp. postiže pri niskom sadržaju ekstrakta kvasca (5-7 g/l) i sadržaju glicerola 10-17,5 g/l. Budući da su dobijeni

optimumi za dva izolata različiti, primenom softverskog paketa Design-Expert izvršena je simultana optimizacija. Programom je predviđeno da se pri sadržaju glicerola 15,07 g/l, ekstrakta kvasca 5,28 g/l i fosfata 0,81 g/l, mogu očekivati poluprečnici inhibicije 22,80 mm za *C. acutatum* i 23,38 mm za *C. gloeosporioides*. Predviđene vrednosti inhibicije su eksperimentalno proverene i dobijene su inhibicije od 22,21±0,56 mm (za *C. acutatum*) i 23,13±0,47 mm (za *C. gloeosporioides*) što ukazuje na dobro slaganje predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti i potvrdilo efikasnost modela primenjenog za optimizaciju sastava kultivacione podloge u cilju maksimizacije antifungalnog delovanja *S. hygroscopicus* na *Colletotrichum* spp. Visoka antifungalna aktivnost *S. hygroscopicus*, proizvedenog pod utvrđenim optimalnim uslovima potvrđena je *in vivo* na veštački inokulisanim plodovima jabuke na kojima je obezbedila efikasnost od 99,3% za *C. acutatum* i 99,8% za *C. gloeosporioides*.

Optimizacija kultivacione podloge za proizvodnju biološkog agensa je od suštinskog značaja, jer sastav podloge značajno utiče na prinos ciljanog metabolita. Takođe, Nunes (2012) navodi da je za formulisanje biofungicida komercijalnog značaja, potrebno smanjiti troškove proizvodnje u najvećoj mogućoj meri. Budući da 30–40% troškova biotehnološkog procesa odlazi na podlogu za kultivaciju, optimizacija sastava podloge je izuzetno značajna i sa ekonomskog stanovišta. Podatak da otpadni glicerol predstavlja izvor ugljenika u podlozi koja omogućava najjače antifungalno delovanje *S. hygroscopicus*, govori u prilog ekonomičnosti proizvodnje ovog agensa.

7.5.6. Utvrđivanje načina delovanja i optimizacija trajanja kultivacije

Utvrđivanje načina delovanja *in vitro* i *in vivo*. Budući da nije utvrđeno postojanje statistički značajnih razlika u poluprečniku zone inhibicije rasta micelije izolata *Colletotrichum* spp. koju su uzrokovale kultivacione tečnosti iz kojih su odstranjene ćelije proizvodnog mikroorganizma i tečnosti koje su sadržale ćelije mikroorganizma, utvrđeno je da je antifungalno delovanje *S. hygroscopicus* zasnovano na proizvodnji ekstracelularnih metabolita. Ovo je potvrđeno i u *in vivo* ogleđima, na plodovima jabuke, gde takođe nije registrovana razlika u prečniku nekroze na plodovima koje su tretirane kultivacionim tečnostima sa i bez ćelija *S. hygroscopicus*. Dobijeni rezultat je u skladu sa tvrdnjama Prapagdee i sar. (2008a) prema kojima se antifungalna aktivnost roda *Streptomyces* najčešće se vezuje za proizvodnju različitih antifungalnih materija i ekstracelularnih, hidrolitičkih enzima.

Kako navodi Behal (2000), aktinomicete proizvode niz antibiotika različite hemijske strukture, kao i razne druge sekundarne metabolite koji ispoljavaju antifungalno, antitumorno i imunosupresivno delovanje. Jedna od antifungalnih supstanci koju proizvode aktinomicete iz roda *Streptomyces* je kasugamicin koji deluje kao inhibitor biosinteze proteina kod mikroorganizama, ali ne i kod sisara te se njegova toksikološka svojstva smatraju izuzetno povoljnim. Takođe, polioksin B i D su izolovani kao metaboliti *S. cacaoi* var. *asoensis*. Ovi metaboliti utiču na sintezu ćelijskog zida gljiva, inhibirajući sintezu hitina. Zatim, validamicin A, takođe proizvod metabolizma *Streptomyces* spp., se smatra profungicidom koji unutar ćelija gljiva prelazi u toksičan oblik validoksilamin A i deluje kao snažan inhibitor trehalaze. Budući da kičmenjaci ne zavise od hidrolize ovog disaharida, validamicin A se takođe smatra toksikološki povoljnim. Još jedan poznat proizvod metabolizma streptomiceta je i mildiomicin koji je snažan inhibitor biosinteze proteina kod gljiva, a ispoljava nisku toksičnost na kičmenjake. Ovo je samo nekoliko primera od niza toksikološki povoljnih metabolita koje proizvode streptomicete a koji ispoljavaju antifungalno delovanje (Doubou i sar., 2001), što govori u prilog potrebe za njihovim uključivanjem u programe biološke zaštite bilja.

Trajanje kultivacije. Antifungalna aktivnost termički tretirane (100°C) i netretirane kultivacione tečnosti *S. hygroscopicus* iz koje su odstranjene ćelije ovog mikroorganizma na izolate *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* praćena je na dnevnom nivou u trajanju od deset dana. Nultog dana kultivacije (oko 2 h nakon inokulacije optimalne podloge proizvodnim mikroorganizmom) nije utvrđena inhibicija rasta *Colletotrichum* spp. što se tumači odsustvom antifungalnih metabolita u kultivacionoj tečnosti. Nakon 24 h počinje njihova proizvodnja, a nakon dva dana prisustna količina metabolita prema kriterijuma Shimizu i sar. (2009) i Prapagdee i sar. (2008) uzrokuje zadovoljavajuću inhibiciju rasta micelije *Colletotrichum* spp. (≥ 11 mm). Proizvodnja antifungalnih metabolita najintenzivnija je tokom trećeg i četvrtog dana kultivacije, a zatim dolazi do smanjenja sadržaja metabolita, ali je njihovo prisustvo na zadovoljavajućem nivou i desetog dana kultivacije, budući da poluprečnik zone inhibicije iznosi preko 11mm. Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u inhibiciji rasta micelije između trećeg i četvrtog dana kultivacije, kao ni između termički tretiranih i netretiranih metabolita *S. hygroscopicus*.

U istraživanjima Prapagdee i sar. (2008a) filtrati kultivacione tečnosti *S. hygroscopicus* u eksponencijalnoj fazi ispoljili su slabije antifungalno delovanje na

C. gloeosporioides od filtrata koji su dobijeni tokom stacionarne faze, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, budući da stacionarna faza *S. hygroscopicus* počinje posle drugog dana inkubacije (Prapagdee i sar., 2008). Isti autori navode da dobijeni rezultati ukazuju da *S. hygroscopicus* soj SRA 14 antifungalno delovanje ne postiže isključivo povećanom sintezom hitinaze (koja se sintetiše tokom eksponencijalne faze), što su isti autori utvrdili prethodnim istraživanjem (Prapagdee i sar., 2008), već i proizvodnjom sekundarnih antifungalnih metabolita. Ova konstatacija može se primeniti i na *S. hygroscopicus* obuhvaćen ovim istraživanjima.

Na osnovu iznetog, može se konstatovati da optimalno trajanje kultivacije *S. hygroscopicus* u cilju maksimizovanja proizvodnje antifungalnih metabolita iznosi 3-4 dana, kao i da su metaboliti sa antifungalnim delovanjem iz grupe termostabilnih jedinjenja.

7.5.7. Uticaj niskih temperatura na aktivnost kultivacionih tečnosti mikroorganizama i formulisanih biopreparata na *Colletotrichum* spp. *in vivo*

Na plodovima tretiranim metabolitima *S. hygroscopicus* proizvedenim u podlozi optimalnog sastava, kultivacionom tečnošću *B. subtilis* soj N 146, zatim 5% SE formulacijom *B. subtilis* soj N 146, 1% rezrednjima preparata F-Stop, Extrasol i Serenade, preporučenom dozom primene fungicida Clarinet, Merpan 50WP, Bellis i Zato 50 WG, i veštački inokulisanim nehromogenim *C. acutatum* (HA-3), hromogenim *C. acutatum* (K-4) i *C. gloeosporioides* (MR-1) izolatima, praćen je razvoj nekroze posle 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi i posle dva meseca provedenih u hladnjači sa normalnom atmosferom i dodatne inkubacije 14 dana na sobnoj temperaturi.

Prilikom skladištenja plodova na sobnoj temperaturi, najviši nivo zaštite plodova veštački inokulisanih sa *C. acutatum* obezbedili su *S. hygroscopicus*, preparat Extrasol, SE formulacija *B. subtilis* soj N146 (samo nehromogeni izolat), F-Stop (samo hromogeni izolat) i svi ispitani hemijski fungicidi. Kod izolata *C. gloeosporioides* svi ispitivani tretmani (osim kultivacione tečnosti *B. subtilis* soj N146) obezbedili su zaštitu plodova na nivou sintetičkih fungicida. Svi primenjeni tretmani obezbedili su značajno slabiji razvoj nekroze na svim veštački inokulisanim plodovima u odnosu na kontrolu.

Na plodovima čuvanim dva meseca u hladnjači sa normalnom atmosferom ($2\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) nije došlo do razvoja nekroze tokom skladištenja na niskoj temperaturi. Po iznošenju iz hladnjače, posle šest dana uočena je pojava nekrotičnih promena na

plodovima. Na plodovima veštački inokulisanim sa nehromogenim i hromogenim *C. acutatum* najslabija pojava nekroze uočena je na plodovima tretiranim sa *S. hygroscopicus*, na nivou sa hemijskim fungicidima Bellis i Merpan 50WP koji su zadržali svoje delovanje i posle dva meseca skladištenja plodova u hladnjači. Kultivaciona tečnost *B. subtilis* soj N 146 kao i svi primenjeni preparati na bazi *B. subtilis* obezbedili su značajno slabiji razvoj nekroze u odnosu na kontrolu. Posle 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi, na svim plodovima inokulisanim sa *C. gloeosporioides* nije uočena pojava nekrotičnih promena, nezavisno od primenjenih tretmana, uključujući i kontrolu. Izostanak simptoma na plodovima inokulisanim sa *C. gloeosporioides* objašnjava se već utvrđenom osetljivošću ove vrste na niske temperature koju su zabeležili Adaskaveg i Hartin (1997) i Everett (2003). Takođe, osetljivost ovog izolata na niske temperature utvrđena je i u ovim istraživanjima prilikom ispitivanja uticaja temperature na rast izolata *in vitro* i uticaj uslova skladištenja na ostvarivanje i razvoj infekcije sa *Colletotrichum* spp. Naime, rast micelije *C. gloeosporioides* u *in vitro* ogledu je u potpunosti izostao na 4° i 5°C, dok na plodovima jabuke inokulisanim ovom vrstom nije došlo do razvoja simptoma nakon 6 meseci skladištenja u klasičnoj hladnjači, kao i posle 2 meseca skladištenja u ULO hladnjači. Na osnovu ovih rezultata, kao i navoda u literaturi, izostanak simptoma na ovim plodovima bio je očekivan.

Kod preparata Extrasol, Clarinet i Zato 50 WG uočeno je slabljenje fungicidnog delovanja nakon skladištenja plodova na 2±0,5°C u trajanju od dva meseca.

Poređenjem efekta bakterije *B. subtilis* (soj N 146) primenjene u obliku submerzne kulture i SE formulacije, utvrđeno je da je formulisanje pojačalo antifungalno delovanje tokom skladištenja plodova na sobnoj temperaturi i u hladnjači. Intenzivnije antifungalno delovanje SE formulacije soja N 146, u odnosu na submerznu kulturu, uočili su i Tanović i sar. (2013) na plodovima jabuke veštački inokulisanim sa izolatom *M. fructicola*. Međutim, postoje i suprotni rezultati. Havenga i sar. (1990) ukazali su da formulisanje izolata *B. subtilis* za primenu u komercijalne svrhe rezultuje nezadovoljavajućom inhibicijom antraknoznih promena na površini plodova voća. Pomenuti autori ne navode o kojoj je formaciji reč i koji bi mogli biti uzroci nezadovoljavajućeg delovanja *in vivo*.

U literaturi nema podataka o efikasnosti bioloških agenasa na plodovima jabuke nakon dugoročnog skladištenja na niskim temperaturama, te sprovedena ispitivanja predstavljaju veliki doprinos, kako nauci, tako i praksi. Utvrđeno je da skladištenjem plodova na 2±0,5°C u trajanju od dva meseca antifungalna aktivnost *S. hygroscopicus*

ostaje nepromenjena, na nivou sintetičkih fungicida i obezbeđuje skoro 100% zaštitu plodova i nakon inkubacije od preko šest nedelja na sobnoj temperaturi. Sve izneto ukazuje na izuzetno visok potencijal ovog mikroorganizma za primenu u biološkoj zaštiti plodova jabuke od prouzrokovala truleži iz roda *Colletotrichum*.

7.5.8. Aktivnost isparljive faze etarskih ulja na izolate *Colletotrichum* spp.

Rezultati istraživanja pokazali su da od ispitanih 56 etarskih ulja, samo pet ulja origana i ulje timijana potpuno zaustavljaju rast micelije nehromogenog *C. acutatum* (MI-21), hromogenog *C. acutatum* (Č-13) i *C. gloeosporioides* (AVO 374B), kao i da je origano toksičniji od timijana za obe vrste. Minimalna inhibitorna koncentracija ulja origana iznosi 0,02-0,08 µl/ml vazduha za sva tri izolata, a timijana 0,02 µl/ml (nehromogeni i hromogeni izolat *C. acutatum*) i 0,04 µl/ml (*C. gloeosporioides*).

Od pet ulja origana i jednog ulja timijana, najnižu letalnu koncentraciju na sva tri izolata ispoljilo je ulje origana C (0,02 µl/ml vazduha). Isto ulje je pri koncentraciji od 0,08 µl/ml vazduha ispoljilo letalan efekat na nehromogeni i hromogeni izolat *C. acutatum* pri ekspoziciji jedan dan, a pri najnižoj koncentraciji (0,02 µl/ml) za postizanje letalnog efekta mu je bilo potrebno sedam dana, za sva tri izolata.

Nehromogeni i hromogeni izolat *C. acutatum* ispoljili su veću osetljivost na ulje timijana u odnosu na izolat *C. gloeosporioides*.

Wilson i sar. (1997), Suhr i Nielsen (2003) i Tanović i sar. (2004) utvrdili su izraženo antimikrobno delovanje za etarska ulja mnogih biljaka. Autori Muller Riebau i sar. (1995) i Soković i sar. (2009) utvrdili su da postoji značajna razlika u osetljivosti različitih vrsta gljiva na isto etarsko ulje. S obzirom da Tanović i sar. (2004) navode da bi ulja koja ispoljavaju letalni efekat pri koncentraciji od 0,16 µl/ml vazduha, mogla biti odabrana za dalja istraživanja mogućnosti njihove praktične primene, u ovom istraživanju je pomenuta koncentracija korišćena kao najviša. Otuda je od 56 ulja odabrano šest perspektivnih, poreklom od dve biljne vrste – *O. vulgare* i *T. vulgaris*. Treba napomenuti da se od pet ulja origana, poreklom od različitih proizvođača, sa različitih geografskih područja, origano C izdvaja kao najtoksičnije iako preostala četiri ulja takođe imaju zadovoljavajuću toksičnost. Pretpostavlja se da su male razlike u toksičnosti posledica razlike u hemijskom sastavu ulja što su pokazala i istraživanja Soković i sar. (2009) i

Vale-Silva i sar. (2012). Takođe, razlikama u toksičnosti verovatno doprinosi i geografsko poreklo osnovnih sirovina.

Antifungalnu aktivnost etarskog ulja timijana zabeležili su Hammer i sar. (1999), Soto-Mendivil i sar. (2006), Yang i Clausen (2007) i Bosquez-Molina (2010). Bosquez-Molina i sar. (2010) su eksperimentalno dokazali da ulje timijana inhibira rast micelije *C. gloeosporioides* kada je inkorporirano u KDA podlogu u koncentraciji 0,06%. Takođe su utvrdili da potapanje plodova papaje u ulje timijana koncentracije 0,12% obezbeđuje 50% manju pojavu truleži u odnosu na kontrolu. U istraživanjima Paster i sar. (1995) etarska ulja origana i timijana primenjena su u vidu para u suzbijanju micelije i spora *Aspergillus* spp. na uskladištenoj pšenici, pri čemu je samo ulje origana ispoljilo fungicidan efekat. Wilson i sar. (1997) su utvrdili da ulja crvenog timijana, lista cimeta i pupoljaka karanfilića ispoljavaju jako antifungalno delovanje na *B. cinerea*, dok ulje origana ima zadovoljavajući efekat. Kako navode Daferera i sar. (2003) ulje origana uticalo je na smanjenje produkovanja fumozina B₁ kod *F. proliferatum* u zrnju kukuruza (Velluti i sar., 2003). U skrining testovima sa 11 etarskih ulja origano je bio efikasan inhibitor rasta micelije vrste *Bacillus cereus*, humanog patogena koji se prenosi hranom (Valero i Salmeron, 2003).

Na osnovu navedenog može se konstatovati da etarska ulja iz biljnih vrsta *O. vulgare* i *T. vulgaris* ispoljavaju visok potencijal za primenu u biološkoj borbi protiv *Colletotrichum* spp. Budući da je u sprovedenom istraživanju ispitano delovanje isparljive faze ulja, pretpostavlja se da upravo skladišta sa modifikovanom atmosferom predstavljaju najpogodniji prostor za njihovu primenu.

8. ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovednih istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

- *Colletotrichum* spp. su redovno prisutni patogeni na uskladištenim plodovima jabuke u Vojvodini i delovima zapadne, centralne i jugoistočne Srbije. Zastupljenost ovih patogena u periodu 2010 – 2013. godine, od prisutnih fitopatogenih gljiva na uskladištenim plodovima, iznosila je 7,8-10%.
- Na plodovima jabuke veštački inokulisanim sa *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* tokom skladištenja dva meseca u ULO hladnjači na $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ i šest meseci u hladnjači sa normalnom atmosferom na $2\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ i tri nedelje skladištenja na $5\pm 1^{\circ}\text{C}$, ne dolazi do razvoja nekroze.
- Po iznošenju plodova na sobnu temperaturu, nakon skladištenja dva meseca u ULO hladnjači na $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ i šest meseci u hladnjači sa normalnom atmosferom na $2\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, ne dolazi do razvoja nekroze na plodovima inokulisanim sa *C. gloeosporioides*, dok je razvoj nekroze uzrokovan *C. acutatum* značajno inhibiran. Zbog osetljivosti *C. gloeosporioides* na niske temperature i sve više zastupljenom skladištenju plodova jabuke u hladnjačama, vrsta *C. acutatum* postaje sve dominantnija. Po iznošenju plodova skladištenih tri nedelje na $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ na sobnu temperaturu, dolazi do značajno jačeg razvoja nekroze u odnosu na plodove koji nisu izlagani niskoj temperaturi, nezavisno od vrste izolata.
- *Colletotrichum* spp. poreklom sa plodova jabuke na KDA podlozi formiraju vazdušaste ili vunaste kolonije svetle do tamno sive, maslinaste, ružičaste ili bele boje, ravne ivične zone. Konidije su jednoćelijske, bezbojne, hijalinske, glatke, prave ili blago povijene cilindričnog do fuziformnog oblika, prosečne dužine 7,96-19,87 μm u kulturi, i 8,4-24 μm na veštački inokulisanim plodovima. Ne formiraju teleomorfni stadijum. Optimalna temperatura za rast je 25°C , minimalna 6°C , a maksimalna 33°C .
- Razlikovanje vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* na osnovu boje kolonija na KDA podlozi moguće je samo u slučaju hromogenih izolata *C. acutatum* koji formiraju ružičaste kolonije. Izolati vrste *C. acutatum* su morfološki varijabilni, a *C. gloeosporioides* su morfološki ujednačeni. Prosečna dužina konidija *C. acutatum* je manja od *C. gloeosporioides* i može se koristiti za razlikovanje vrsta, dok je oblik konidija nedovoljno pouzdan. Sporiji rast *C. acutatum* na hranljivim podlogama KDA, MPA, V8, SDA i OA je pouzdan za razlikovanje od *C. gloeosporioides*.

Najpovoljnija podloga za razvoj *C. acutatum* je V8, a za *C. gloeosporioides* SDA. Rast izolata na ekstremnim temperaturama, *C. acutatum* na 4°C, a *C. gloeosporioides* na 35°C, može poslužiti kao kriterijum za razlikovanje dve ispitivane vrste.

– PCR metodom, primenom prajmera specifičnih za vrstu (CaInt2 i CgInt), pouzdano se identifikuju vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* poreklom iz ploda jabuke. Primenom univerzalnih prajmera ITS1 i ITS4 amplifikuje se rDNK-ITS sekvenca čija analiza omogućava pouzdanu identifikaciju *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* i nižih taksona u okviru vrste *C. acutatum* (nehromogeni i hromogeni izolati).

– Za pouzdanu identifikaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* neophodna je primena klasičnih, fitopatoloških i više od jedne molekularne metode.

– *S. hygroscopicus*, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* i *B. subtilis* sojevi N 146, ST 1/III, Č 13 i QST 713 ispoljavaju antifungalnu aktivnost na *Colletotrichum* spp. *in vitro* i *in vivo*. Međutim, *S. hygroscopicus* obezbeđuje zaštitu plodova na nivou sa hemijskim fungicidima (trifloksistrobin, boskalid+piraklostrobin, pirimetanil+flukvinkonazol, kaptan).

– Kultivacijom *S. hygroscopicus* u podlozi sa 15,07 g/l glicerola, 5,28 g/l ekstrakta kvasca i 0,81 g/l neorganskog fosfata, u trajanju 3-4 dana, postiže se maksimalno antifungalno delovanje na *Colletotrichum* spp. Box-Behnkenov eksperimentalni plan i metod odzivne površine, uz primenu softverskog paketa DESIGN-EXPERT 7.1.5. su pogodni modeli za optimizaciju sastava podloge mikroorganizma u cilju maksimizovanja antifungalne aktivnosti. Antifungalno delovanje *S. hygroscopicus* zasnovano je na produkciji ekstracelularnih, termostabilnih, sekundarnih metabolita.

– Visoka efikasnost metabolita *S. hygroscopicus in vivo* na sobnoj temperaturi i nakon dvomesečnog skladištenja plodova na 2±0,5°C, kao i sposobnost mikroorganizma da kao izvor ugljenika koristi otpadni glicerol, ukazuje na opravdanost njegove primene u zaštiti plodova jabuke od *Colletotrichum* spp.

– Etarska ulja origana i timijana ispoljavaju fungicidno delovanje na *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Minimalna letalna koncentracija isparljive faze ovih ulja na *Colletotrichum* spp. je 0,02-0,16 µl/ml.

9. LITERATURA

1. Abd-Alla, M., Haggag, W. (2013): Use of some plant essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of anthracnose disease of mango fruits (*Mangifera indica* L.) caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz). International Journal of Agriculture and Forestry, 3(1): 1-6.
2. Adaskaveg, J. E., Hartin, R. J. (1997): Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. Phytopath., 87, 979-987.
3. Adaskaveg, J.E., Forster, H. (2010): New developments in postharvest fungicide registrations for edible horticultural crops and use strategies in United States. In: Prusky D., Gullino, L.M. (eds.), Post-harvest athenology series: Plant pathology in the 21st century, Springer, 2:107-111.
4. Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., Freeman, S. (2002): Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Columbia and identification of unique species from the genus. Ecology and Population Biology, 93(5): 579-587.
5. Agrios (2013): Guidelines for Integrated Pome Cultivation 2013. http://www.agrios.it/doc/guidelines_2013_english.pdf
6. Agrios, N. (2005): *Agrios*, Plant Pathology. Academic press, San Diego, USA.
7. Anonimus (2005): Bitter rot of apple. University of Illinois. Online. http://web.aces.uiuc.edu/vista/pdf_pubs/818.pdf. Datum pristupa stranici: 10.10.2011.
8. Anrade, E., Uesugi, C., Ueno, B., Ferreira, M. (2007): Morphocultural and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenic to papaya. Fitopatol. bras. 32(1): 21-31.
9. Antoun, H., Prevost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria., In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z.A. (eds), pp. 1-38, Springer. Dordrecht
10. Anwar, A.A. (1949): Factors affecting the survival of *Helminthosporium sativum* and *Fusarium Uni* in soil. Phytopathology 39: 1005-1019.
11. Arsenijević, M. (1984): *Glomerella cingulata* (Ston.) Splaud & Schrenk (konidijski stadijum *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.) kao parazit plodova višnje. Jugoslovensko voćarstvo, 18: 45-49.
12. Arsenijević, M., Draganić, M., Trkulja, V. (1996): Vrste roda *Colletotrichum* utvrđene na teritoriji prethodne i sadašnje Jugoslavije. Zaštita bilja, 47 (1) 215: 5-25.
13. Babović, M. Perišić, M., Mihajlović, J., Stojiljković, Ž., Aleksandrović, B. (1984): *Glomerella cingulata* (Ston). Splaud & Schrenk parazit višnje. Glasnik zaštite bilja, 9-10: 332-333.
14. Bailey, J.A., Jeger, M.J. (1992): *Colletotrichum. Biology, Pathology and Control*. CABI, Wallingford, UK.
15. Barrera-Necha, L., Bautista-Banos, S., Flores-Moctezuma, H., Estudillo, A. (2008): Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. i Sacc. and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). Plant Pathology Journal, 7 (2): 174-178.
16. Baxter, A.P., van der Westhuizen, G.C.A., Eicker, A. (1983): Morphology and Taxonomy of South African Isolates of *Colletotrichum*. South African J. Bot., 2: 259-289.
17. Behal, V. (2000): Bioactive products from, *Streptomyces*. Adv. Appl. Microbiol. 47 : 113-157.
18. Berbee, M.L., Taylor, J.W. (1992): Detecting morphological convergence in true fungi, using 18S rRNA gene sequence data. BioSystems 28: 117-125.

19. Bernstein, B., Zehr, I., Dean, A., Shabi, E. (1995): Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Dis.*, 79:478-482.
20. Biggs, A., Miller, S. (2001): Relative susceptibility of selected apple cultivars to *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 85: 657-660.
21. Borve, J. (2005): Bitter rot of apple. Pages 113-117 in: *Plantemtet Vestlandet 2005*. Vangdal, E. ed. Grønn kunnskap 9 (4).
22. Borve, J., Stensvand, A. (2006): *Colletotrichum acutatum* overwinters on sweet cherry buds. *Plant Dis.* 90:1452-1456.
23. Borve, J., Stensvand, A. (2007): *Colletotrichum acutatum* Found on Apple Buds in Norway. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0522-01-RS.
24. Bosquez-Molina, E., Ronquillo de-Jesus, E., Bautista-Banos, S., Verde-Calvo, J., Morales-Lopez, J. (2010): Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 57: 132-137.
25. Broad (2010): *Colletotrichum* Database. Broad Institute <http://www.broadinstitute.org/>
26. Brown, E., Sreenivasaprasad, S., Timmer, W. (1996): Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86:523- 527.
27. Burgess, L.W., Summerell, A.B., Bullock, S., Gott, P.K., Backhouse, D. (1994): *Laboratory for Fusarium research*. Third Edition. University of Sydney and Royal Botanic Gardens, 133.
28. Burr, T.J., Schroth, N.M., Suslow, T. (1978): Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* 68: 1377-1383.
29. Caesar, A.J., Burr, J.T. (1987): Growth promotion of apple seedlings and rootstocks by specific strains of bacteria. *Phytopathology* 77: 1583-1588.
30. Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Waller, J.L. (2009): A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183–204.
31. Camilo, P., Lamb, C., Aldwinckle, S. (1998): Genetic resistance to bitter rot incited by *Glomerella cingulata* (Stoneman.) Spaulding & Von Schrenk in apple (*Malus domestica* (Borkh.)). *Acta Hort.*, 232: 37-45.
32. Cannon, F.P., Damm, U., Johnston, R.P., Weir, S.B. (2013): *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181–213.
33. Cannon, P.F. (1991): A revision of *Phyllachora* and some similar genera on the host family *Leguminosae*. *Mycological Papers*, 163: 302.
34. Cannon, P.F., Bridge, P.D., Monte, E. (2000): Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum: Host specificity, Pathology, and Host-pathogen interaction*. (Prusky D, Freeman S, Dickman, M, eds). APS Press, St Paul, USA: 1–20.
35. Cannon, P.F., Buddie, A.G., Bridge, P.D., de Neergard, E., Lubeck, M. (2012): *Lectera* a new genus of the *Plectosphaerellaceae* for the legume pathogen *Volutella colletotrichoides*. *Myckeys*, 3: 23-36.
36. Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Sung, G.H., Hyten, A.S., Spatafora, J.W. (2004): Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycological research*, 108: 864-872.
37. Cawoy, X., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011): *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management* (Ed. Stoytcheva, M.), 273-302.

38. Chalutz, E., Droby, S. (1997): Biological control of postharvest diseases. In: Boland, J.G., Kuykendall, D.L. (eds.): Plant-microbe interactions and biological control. New York – Dekker, 157-170.
39. Chattopadhyay, D., Sen, S.K. (1997): Optimisation of cultural conditions for antifungal antibiotic accumulation by *Streptomyces rochei* G164. , 39 (1-4): 64-71.
40. Collins, D., Jacobsen, B. (2003): Optimizing *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological control*, 26: 153-161.
41. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., Barka, E.A. (2005): Use of plant-growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 4951-4959.
42. Crawford, D.L., Lynch, M.J., Whipps, M.J., Ousley, A.M. (1993): Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3899-3905.
43. Crouch, A.J., Clarke, B.B., Hillman, I.B. (2009): What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case-study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia*, 101 (5): 648-656.
44. Crusius, L.U., Forcelini, C.A., Valdebenito-Sanhueza, R.M., Fernandes, J.M.C. (2002): Epidemiology of apple leaf spot. *Fitopatologia Brasileira* 27, 65–70.
45. Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (2003): The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22: 39-44.
46. Damm, U., Cannon, F.P., Woudenberg, C.H.J., Johnston, R.P., Weir, S.B., Tan, P.Y., Shivas, G.R., Crous, W.P. (2012): The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73: 1–36.
47. Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Crous, P.W. (2012a): The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 37-113.
48. Damm, U., Woudenberg, J.H.C., Cannon, P.F., Crous, P.W. (2009): *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity*, 39: 45–87.
49. De Man, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E. (1960): A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135.
50. De Marsay, A. (2005): Anthracnose fruit rot of highbush blueberry: Biology and epidemiology. Ph.D. thesis, Rutgers, The State Univ. of New Jersey, New Brunswick, NJ.
51. Demoz, B.T., Korsten, L. (2006): *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control*, 37 (1): 68-74.
52. Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. (1995): Basic plant pathology methods. Boca Raton, USA, 61.
53. Dong, H.L., Dae-Ho, K., Young-Ah, J., Jae, Y.U., Seung-Beum, H. (2007): Molecular and cultural characterization of *Colletotrichum* spp. causing bitter rot of apples in Korea. *Plant Pathol. J.*, 23(2): 37-44.
54. Doumbou, C., Hamby Salove, M., Crawford, D., Beaulieu, C. (2001): Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and promote plant growth. *Phytoprotection*, 82 (3): 85-102.
55. Du, M., Schardl, C.L., Nuckles, E.M., Vailancourt, L. (2005): Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia*, 97: 641-658.
56. Duduk, N., Obradović, A., Ivanović, M. (2010): Uticaj etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na porast micelije *Colletotrichum acutatum*. *Pesticidi i fitomedicina*, 25 (2): 151-156.

57. Eckert, J.W. (1990): Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. In: Green, M.B., LeBaron, H.M., Moberg, W.K. (Eds.): *Managing Resistance to Agrochemicals*, American Chemical Society Symposium Series 421, pp. 286–302.
58. Elles, R., Mountford, R. (2003): *Molecular diagnosis of genetic disease* 2nd edn. Humana Press, New Jersey.
59. EPA (2011): Regulating biopesticides. <http://www.epa.gov/opppd1/biopesticides/index.htm>. February 27
60. Everett, K. (2003): The effect of low temperatures on *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing body rots of avocados in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 32 (4): 441-448.
61. Everett, R., Timudo-Torrevilla, E., Shaw, P., Wallis, R., Mundy, D., Scheper, R., Wood, P., Butcher, M. (2006): Sustainable solutions for *Colletotrichum* apple fruit rot. *Waikato Fruitgrowers Newsl.* August: pages 13-15.
62. Faedda, R., Agosteo, E.G., Schena, L., Mosca, S., Frisullo, S., Magnano di San Lio, G., Cacciola, O.S. (2011): *Colletotrichum calvatum* sp.nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathol. Mediterr.*, 50: 283-302.
63. Ferreira, I., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007): Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 4: 1511-1516.
64. Freeman, S., Katan, T. (1997): Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87:516-521.
65. Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998): Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82: 596-605.
66. Freeman, S., Minz, D., Maymon, M., and Zveibil, A. (2001): Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology* 91:586-592.
67. Freeman, S., Minz, D., Maymon, M., Veibil, A. (2001): Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology* 91: 586-592.
68. Freeman, S., Shabi, E. (1996): Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49:395-404.
69. Freeman, S., Shalev, Z., Katan, J. (2002): Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C.gloeosporioides* pathogenic on strawberry. *Plant Disease*, 86:965-970.
70. Fu, G., Huang, S.L., Ye, Y.F., Wu, Y.G., Cen, Z.L., Lin, S.H. (2010): Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacy in controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. *Biological Control*, 55: 1-10.
71. Giaretta, R.D., Bogo, A., Coelho, M.M.C., Guidolin, F.A., Dantas, A., Gomes, A.E. (2010): ITS-rDNA phylogeny of *Colletotrichum* spp. causal agent of apple glomerella leaf spot. *Ciência Rural*, 40 (4): 806-812.
72. Gilden, R. C., Huffling, K., Sattler B. (2010): Pesticides and Health Risks. *JOGNN*, 39, 103–110.
73. Gillet, J., Schilder, A. (2009): Environmental requirements for infection of blueberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. *ISHS Acta Horticulturae* 810: IX International Vaccinium Symposium.
74. Grahovac, M., Inđić, D., Vuković, S., Hrustić, J., Gvozdenac, S., Mihajlović, M., Tanović, B. (2012): Morphological and ecological features as differentiation criteria for *Colletotrichum* species. *Žemdirbyste=Agriculture*, vol. 99, No. 2, 189-196.
75. Grahovac, M., Tanović, B., Hrustić, J., Inđić, D., Vuković, S. (2010): Patogeni iz roda *Colletotrichum* na uskladištenim plodovima jabuke. X Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik radova, 29.
76. Gregori, R., Guidarelli, M., Mari, M. (2010): Preliminary studies on partial reduction of *Colletotrichum acutatum* infection by proteinase inhibitors extracted from apple skin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74: 303-308.

77. Guerber, C., Correll, C. (2001): Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia* 93: 216-229.
78. Gvozdenović, D., Davidović, M. (1990): *Berba i čuvanje voća*. Nolit, Beograd.
79. Gvozdenović, D., Keserović, Z. (2002): Kvalitet, skladištenje i plasman plodova jabuke u novim uslovima poslovanja. *Savremena poljoprivreda*, 51 (1-2): 29-33.
80. Hadar, Y., Harman, E.G., Taylor, G.A., Norton, M.J. (1983): Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and seed treatment with *Entorobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. *Phytopathology* 73: 13322-13325.
81. Hall, T.A., (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41: 95–98.
82. Hammer, K. A., Carson, C. F. and Riley, T. V. (1999), Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985–990.
83. Harp, L.T., Pernezny, K., Lewis Ivey, M., Miller, A.S., Kuhn, J.P., Datnoff, L. (2008): The etiology of recent pepper anthracnose outbreaks in Florida. *Crop Protection*, 27, 1380– 1384.
84. Harrington, T.C., Wingfield, B.D. (1995): A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* 87: 280-288.
85. Hassan , A. A.; El-Barawy, A. M. and El Mokhtar M. Nahed (2011): Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases, *Journal of American Science*, 7(4):752-760
86. Havenga, W., De Jagger, S.E., Korsten, L. (1999): Factors affecting biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* against *Colletotrichum gloeosporioides*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 22:12-20.
87. Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. (1995): *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th Edn. CABI, Kew.
88. Hawksworth, D.L., Sutton, B.C., Ainsworth, G.C. (1983): *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 7th Edn. CABI, Kew.
89. Hoch, J., Sonenshein, A., Losick. A (Eds). (1993): *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria : biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC.
90. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event. Datum pristupa stranici: 11.02.2014.
91. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32008R0889:en:NOT>. Datum pristupa stranici: 14.02.2014.
92. Huhndorf, S.M., Miller, A.N., Fernandez, F.A. (2004): Molecular systematics of the *Sordariales*: the order and the family *Lasiosphaeriaceae* redefined. *Mycologia* 96: 368-387.
93. Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W. (2009b): *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147–182.
94. Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. (2009a): *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39: 1–17.
95. Illingworth, C.A., Andrews, J.H., Bibeau, C., Sogin, M.L. (1991): Phylogenic placement of *Athelia bombacina*, *Aureobasidium pullulans* and *Colletotrichum gloeosporioides* inferred from sequence comparisons of small subunit ribosomal RNAd. *Experimental Mycology* 15: 65-75.
96. Isman, M.B. (2000): Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.*, 19: 603–608.
97. Ismet, A., Rizwana, H., Al-Othman, R.M., Bakir, A.M. (2012): Studies of actinomycetes for biological control of *Colletotrichum musae* pathogen during post

- harvest anthracnose of banana. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(17): 3879-3886.
98. Ivanović, M., Ivanović, D. (1992): Study of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose on sour cherry and effects of some fungicides on fungi *in vitro*. Plant Protection, 201: 211-218.
 99. Ivanović, M., Ivanović, D. (2001): Mikoze i pseudomikoze biljaka. De-eM-Ve, Beograd.
 100. Ivanović, M., Ivanović, M., Duduk, B., Trkulja, V., Stojanović, G. (2005): Antraknoza – nova bolest jagode u Srbiji. Zbornik rezimea VII savetovanja o zaštiti bilja, Soko Banja, 119-120.
 101. Janisiewicz, W., Korsten, L (2002): Biological control of postharvest diseases of fruits. Annual Review of Phytopathology, 40: 411-441.
 102. Johnston, P.R., Jones, D. (1997): Relationships among *Colletotrichum* isolates form fruit-rots assessed using rDNA sequences. Mycologia 89:420-430.
 103. Kanini, G., Katsifas, E., Savvides, A., Karagouni, A. (2013): *Streptomyces rochei* ACTA1551, an Indigenous Greek Isolate Studied as a Potential Biocontrol Agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Volume 2013, Article ID 387230, 10 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/387230>
 104. Katan, T., Shabi, E. (1996): Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from almond in Israel. Eur. J. Plant Pathol. 102:597-600.
 105. Kelemu, S., Badel, J. (1994): *In vitro* inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and other phytopathogenic fungi by an Amazonian isolate of *Bacillus subtilis* and its cell-free culture filtrate. Australasian Plant Pathology, 23 (2): 41-45.
 106. Khayet M., Cojocarú C., Zakrzewska-Trznadel G. (2008): Response surface modelling and optimization in pervaporation, Journal of Membrane Science, 321: 272–283.
 107. Kim, G. W., Hong, K., S. (2008): Occurrence of anthracnose on peach tree caused by *Colletotrichum* species. Plant Pathol. J. 24(1): 80-83.
 108. Kim, M.K., Choi, G.J., Lee, H.S. (2003): Fungicidal Property of *Curcuma longa* L. Rhizome-Derived Curcumin against Phytopathogenic Fungi in a Greenhouse. J. Agric. Food Chem., 51: 1578–1581.
 109. Kirk P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A. (2001): Ainsworth and Bisbys's Dictionary of the Fungi. 9th Edn. CABI, Egham, UK.
 110. Kirk P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008): Ainsworth and Bisbys's Dictionary of the Fungi. 10th Edn. CABI, Wallingford, UK.
 111. Korabecna, M. (2007): The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, A. Méndez-Vilas(Ed.), 783-787.
 112. Korsten, L., De Jager, E.S., De Villiers, E.E., Lourens, A., Kotzé J.M., Wehner, F.C. (1995): Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado post-harvest diseases. Plant Disease 79:1149-1156.
 113. Kupper, K.C. (2009). Controle biológico de doenças de flores e frutos jovens de citros, In: Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Bettiol, W., Morandi, M.A.B. (eds): 289-297., Embrapa.Jaguariúna.
 114. Lardner, R., Johnston, P.R., Plummer, K.M., Pearson, M.N. (1999): Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. Mycol Res, 103:275-285.
 115. Latham, J., Williams, J.C. (1983): Cultural characteristics and pathogenicity of *Glomerella cingulata* isolates from apples in Alabama. Plant Dis., 67: 1065-1068.

116. Lazić, Ž. (2004): Design of Experiments in Chemical Engineering: a practical guide. Moristown, USA.
117. Leandro, S., Gleason, L., Nutter, W., Wegulo, N., Dixon, M. (2001): Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology* 91:659-664.
118. Lee, H.S., Lee, S.W., Cho, K.Y., Kim, M.K.; Ahn, Y.J. (2001): Fungicidal activities of 51 fruit extracts against six phytopathogenic fungi. *Agric. Chem. Biotechnol.*, 44: 147–153.
119. Lević, J. (2005): Vrste roda *Fusarium*. Institut za kukuruz Zemun Polje i Društvo genetičara Srbije, 771-841.
120. Lewis Ivey, M., Nava-Diaz, C., Miller, S. (2004): Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. *Plant Disease*, 88: 1198-1204.
121. Li, L., Li, S.M., Sun, J.H., Zhou, L.L., Bao, X.G., Zhang, H.G., Zhang, F.S. (2007): Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 11192–11196.
122. Liu, B., Louws, F., Sutton, T., Correll, J. (2012): A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *European Journal of Plant Pathology*, 132 (4): 593-607.
123. Liu, D., Anderson, A.N., Kinkel, L.L. (1995): Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* 85: 827-831.
124. Liyanage, D., McMillan, T., Jr., Kistler, C. (1992): Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82:1371-1376.
125. LoBuglio, K.F., Pfister, D.H. (2008): A *Glomerella* species phylogenetically related to *Colletotrichum acutatum* on Norway maple in Massachusetts. *Mycologia*, 100: 710–715.
126. Locquin, M. (1984): *Mycologie Generale et Structurale*. Masson, Paris.
127. Lolloo, R., Maharaih, D., Görgens, J., Gardiner, N. (2010): A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 499-508.
128. Lu, G., Cannon, P.F., Reid, A., Simmons, C.M. (2004): Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological Research*, 108: 53–63.
129. Martínez, P.E., Hío, C. J., Osorio, A. J., Torres, F.M. (2009): Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. *Agronomía Colombiana* 27(2): 211-218.
130. Martinez-Culebras, P. V., Querol, A., Suarez-Fernandez, M. B., Garcia-Lopez, M. D., Barrio, E. (2003): Phylogenetic Relationships Among *Colletotrichum* Pathogens of Strawberry and Design of PCR Primers for their Identification. *Journal of Phytopathology*, 151: 135–143.
131. Mayers, R. H., Montgomery, D. C. (2002): *Response Surface Methodology: Processes and Product Optimization Using Designed Experiments* (2nd ed.). Wiley - Interscience.
132. McKay S. F., Freeman S., Minz D. (2009): Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of anthracnose of almond in Australia. *Phytopathology*, 99: 985-995.
133. Mills, P.R., Hodson, A., Brown, A.E. (1992): Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (Bailey JA, Jeger MJ, eds). CABI, Wallingford, UK:269–288.
134. Montgomery, D. C. (2005): *Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

135. Muller Riebau, F., Berger, B., Yegen, O. (1995): Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (8): 2262-2266.
136. Munda, A., Gerič Stare, B. (2011): Glive iz rodu *Colletotrichum*, povzročiteljice antraknoze na sadnem drevju in jagodičevju v sloveniji. Zbornik predavanj in referatov 10. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, 57-61.
137. Nakano, M., Hulett, M. (1997): Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *Microbiologie*, 157 (1): 1-7.
138. Nunes, C. (2012): Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 181-196.
139. Olsson, K. (1965): A study of the biology of *Gloeosporium album* and *G. perennans* on apple. *Statens Växtskyddsanstalt Med.* 13:189-259.
140. Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommès, J., Thonart, P. (2005): *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67 (5): 692-698.
141. Oxenham, S. K., Svoboda, P.K., Walters, R.D. (2005): Antifungal Activity of the Essential Oil of Basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Phytopathology*, 153 (3): 174–180.
142. Padman, M., Janardhana, R. (2011): Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. the causal organism of leaf spot disease of *Murraya koenigii* L. *New York Science Journal*, 4 (7): 80-84.
143. Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., Juven, B. (1995): Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*, 58: 81-85.
144. Peres, A., Timmer, W., Adaskaveg, E., Correll, C. (2005): Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 89:784-796.
145. Peres, N., Kuramae, E., Dias, M., Souza, N. (2002): Identification and Characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *J. Phytopatology*, 150: 128-134.
146. Piggot, P., Hilbert, D. (2004): Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7 (6): 579-586.
147. Popov, S. (2000): Osnovi biohemijskog inženjerstva. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
148. Prapagdee, B., Akrapikulchart, U., Mongkolsuk, S. (2008a): Potential of soil-borne *Streptomyces hygroscopicus* for biocontrol of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in orchid. *Journal of Biological Sciences*, 8 (7): 1187-1192.
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C., Mongkolsuk, S. (2008): Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4 (5): 330-337.
149. Priya, S., Jagannathan, N., Kalaichelvan, T. (2011): Production of chitinase by *Streptomyces hygroscopicus* VMCH2 by optimisation of cultural conditions. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2 (2): B210-B219.
150. Rajput, R. (2011): Organic management of anthracnose of chilli caused by *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler and Bisby. Master thesis, University of agricultural sciences, Dharwad.
151. Reblova, M., Gams, W., Seifert, K.A. (2011): *Monilochaetes* and allied genera of the *Glomerellales*, and a reconsideration of families in the *Microscuales*. *Studies in Mycology*, 68: 163-191.
152. Ripa, F., Nikkon, F., Zaman, S., Khondkar, P. (2009): Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New *Streptomyces* sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil. *Mycobiology*, 37(3): 211–214.

153. Rothrock, C.S., Gottlieb, D. (1984): Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30: 1440-1447.
154. Roy, A., Saha, K.A., Das, P. (2013): Studies on *Colletotrichum capsici* - a Plant Pathogenic Fungus: Selection of Culture Medium for Growth And Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Fungicide. *International journal of scientific research*, 2 (4): 17-18.
155. Rueda-Hernández, K. R., Cardona, A. S., Cadavid-Restrepo, G. E., Benjumea, C. I. S., Gutierrez, G. P. C. and 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. doi: 10.1111/jph.12040
156. Sanchez, S., Demain, A. (2002): Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 895–906.
157. Sangdee, A., Sachan, S., Khankhum, S. (2011): Morphological, pathological and molecular variability of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose of chilli in the North-east of Thailand. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (25): 4368-4372.
158. Screenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A.E., Mills, P.R. (1996): PCR – based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*, 45: 650-655.
159. Segy, I. (1983): Methods of soil microbiology. Moskva - Mir.
160. Sekulić, S.J., Jeličić, N.S. (2013): Sredstva za Zaštitu bilja u prometu u Srbiji. *Biljni lekar, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet*, godina 41, broj 1-2, str. 179-188.
161. Shabi, E., Freeman, S., Katan, T., Teviotdale, B. (1996): Almond anthracnose in Israel and California. (Abstr.) *Phytoparasitica* 24:138-139.
162. Shabi, E., Katan, T., Gera, H., Elisha, S. (1994): Taxonomic determination of pathogenic *Colletotrichum gloeosporioides* of almond, anemone and avocado according to fungicide sensitivity. (Abstr.) *Phytoparasitica* 21:130-131.
163. Shi, Y., Correll, C., Guerber, C., Rom, R. (1996): Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. *Plant Disease* 80:692-696.
164. Shimizu, M., Yazawa, S., Ushijima, Y. (2009): A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. *Journal of General Plant Pathology*, 75 (1): 27-36.
165. Singh, M., Srivastava, R. (2011): Sequencing batch reactor technology for biological wastewater treatment: a review. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, (6): 3-13.
166. Smith, B. J., Black, L. L. (1990): Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*, 74:69-76.
167. Soković, M., Vukojević, J., Marin, P., Brkić, D., Vajs, V., van Griensven, L. (2009): Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14: 238 – 249.
168. Sonoda, M., Pelosi, R. (1988): Characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian river area of Florida. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.*, 101: 36-38.
169. Soto-Mendivil, J.F. Moreno-Rodríguez, M. Estarrón-Espinosa, J.A. García-Fajardo, E.N. Obledo-Vásquez (2006): Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. *e-Gnosis*, 4: 1–7.
170. Sreenivasaprasad S, Talhinas P. (2005): Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology*, 6(4): 361–378.

171. Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R., Meehan, B.M., Brown, A.E. (1996a): Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*, 39: 499-512.
172. Statistica (2011): Data Analysis Software System, version 11. – Tulsa, USA.
173. Stojanović, S., Gavrilović, V., Starović, M., Pavlović, S., Živković, S. (2002): Novi domaćini gljiva iz roda *Colletotrichum* u Srbiji. *Zaštita bilja*, 243: 171-179.
174. Suhr, I., Nielsen, V. (2003): Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 665-674.
175. Sutton, B. (1990): Bitter rot. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. A. L. Jones and H. S. Aldwinckle, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 15-16.
176. Sutton, B.C. (1980): *The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. CABI, Kew, UK.
177. Sutton, B.C. (1992): The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (Bailey JA, Jeger MJ, eds). CABI, Wallingford, UK: 1–26.
178. Suutar, M., Lignell, U., Hyvärinen, A., Nevalainen, A. (2002): Media for cultivation of indoor streptomycetes, 51(3): 411-6.
179. Tahvonen, R. (1982): Preliminary experiments into the use of *Streptomyces* spp. isolated from peat in the biological control of soil and seedborne disease in peat culture. *J. Agric. Sci. Finl.* 54: 357-369.
180. Tahvonen, R. (1982): Preliminary experiments into the use of *Streptomyces* spp. isolated from peat in the biological control of soil and seedborne diseases in peat culture. *J. Agric. Sci. Finl.*, 59: 199-208.
181. Talhinhos, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., Oliveira, H. (2005): Molecular and Phenotypic Analyses Reveal Association of Diverse *Colletotrichum acutatum* Groups and a Low Level of *C. gloeosporioides* with Olive Anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (6): 2987-2998.
182. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood Evolutionary Distance and Miximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*, 28: 2731-2739.
183. Tanović B., Kolomiets E., Gašić S., Kuptsov V., Hrustić J., Grahovac M., Molchan O., Sverchkova N., Mihajlović M. (2013): Effects of various formulations of N146 strain of *Bacillus subtilis* on *Monilinia fructicola*. *Сборник научных трудов Микробны Биотехнологии: Фундаментальные и прикладные аспекты*, том 5, Minsk, Belorusija, 351-360.
184. Tanović, B., Kolomiets, E., Kuptsov, V., Hrustić, J., Gašić, S., Grahovac, M., Molchan, O., Sverchkova, N., Mihajlović, M., Stevanović, M. (2012): Soj N146 *Bacillus subtilis* kao potencijalni agens za suzbijanje *Monillinia fructicola*. *Zbornik rezimea radova XIV simpozijuma o zaštiti bilja i IX kongresa o korovima – Zlatibor*, 111.
185. Tanovic, B., Obradovic, A., Potocnik, I. (2004): Effects of thyme essential oil on *Pythium* sp. *Proceedings of ESNA XXXIV Annual Meeting*, Novi Sad, 502-505.
186. Tanovic, B., Obradovic, A., Potocnik, I. (2004): Effects of thyme essential oil on *Pythium* sp. *Proceedings of ESNA XXXIV Annual Meeting*, Novi Sad, p. 502-505.
187. Tasiwal, V. i Benagi, I.V. (2009): Studies on the cultural and nutritional characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal organism of papaya anthracnose. *Karnataka J. Agric. Sci.*, 22 (4): (787-789).

188. Terabe, I., Martins, M., Homechin, M. (2008): Microorganisms associated with fruits of different cultivars of Pecan nut. *Ciênc. agrotec.*, vol.32, n.2, pp. 659-662.
189. Thakore Y. (2006): The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 194-208.
190. Thind, T. S., Jhooty, J. S. (1990): Studies on variability in two *Colletotrichum* species causing anthracnose and fruit rot of chillies in Punjab. *Indian Phytopathology*, 43 (1): 53-58.
191. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997): "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nucleic Acids Research*, 25 (24): 4876-4882.
192. Tian, S. (2007): Management of postharvest diseases in stone and pome fruit crops. In: *General Concepts in Integrated Pest and Disease Management* (Ciancio, A. and Mukerji, K., eds.), Springer, pp. 131-147.
193. Trkulja, V. (2000a): Pojava *Colletotrichum gloeosporioides* prouzrokovala gorke truleži plodova jabuke u voćnjacima u okolini Banja Luke. Naučno-stručno savjetovanje agronoma Republike Srpske: Poljoprivreda Republike Srpske 2000. godine sa pravicima razvoja. Zbornik rezimea: 141-142, Teslic
194. Trkulja, V. (2000b): *Colletotrichum acutatum* - nov parazit jabuke kod nas. XI Jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida. Zbornik rezimea: 34, Zlatibor.
195. Trkulja, V. (2003): Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* spp. prouzrokovala gorke truleži ploda jabuke. Beograd: Poljoprivredni fakultet, doktorska disertacija.
196. Uecker, F.A. (1994): On the ontogeny of ascoma of *Glomerella cingulata*. *Mycologia* 86: 82-88.
197. Valero, M., Salmeron, M.C. (2003) Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndalized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 73-81.
198. Vale-Silva, L., Silva, J., Oliveira, D., Goncalves, J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Pinto, E. (2012): Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare subsp. virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 252-257.
199. Van Dyk, K., De Villiers, E.E. & Korsten, L. (1997): Alternative control of avocado post-harvest diseases. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 20:109 - 112.
200. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egidio, J., Marin, S. (2003): Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 89:145-154.
201. Verma, N., MacDonald, L., Punja, K. (2006): Inoculum prevalence, host infection and biological control of *Colletotrichum acutatum*: causal agent of blueberry anthracnose in British Columbia. *Plant Pathol.* 55:442-450.
202. Vignutelli, A., Hilber-Bodmer, M., Hilber, U. W. (2002): Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*, 106: 329-335.
203. Vojvodić, Đ., Klokočar, Z., Davidović, M. (1975): Suzbijanje najvažnijih skladišnih oboljenja jabuka i krušaka primenom sistemskih fungicida. *Savremena poljoprivreda*, XVII (7-8): 65-70.
204. von Rapp, L., Richter, J. (1990): *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. An Johannisbeerfruchten. *Gesunde Pflanzen*, 42: 173.

205. Wanderlei-Silva, D., Neto, E.R., Hanlin, R. (2003): Molecular systematics of the *Phyllachorales* (*Ascomycota*, *Fungi*) based on 18S ribosomal DNA sequences. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 315-322.
206. Wasantha Kumara K. L. Rawal R. D. (2008): Influence of carbon, nitrogen, temperature and pH on the growth and sporulation of some Indian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing antracnose disease of papaya (*Carrica papaya* L.). *Tropical Agricultural Research and Extension*, 11: 7-12.
207. Weir, B., Johnston, P.R., Damm, U. (2012): The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 115-780.
208. Wharton, P., Dieguez-Uribeondo, J. (2004): The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(1): 3-22.
209. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: *PCR Protocols*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.
210. Wilson, L., Solar, J., El Ghaouth, A., Wisniewski, M. (1997): Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Diseases*, 81(2): 204-210.
211. Winka, K., Eriksson, O.E. (2000): *Papulosa amerospora* accommodated in a new family (*Papulosaceas*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*) inferred from morphological and molecular data. *Mycoscience*, 41: 96-104.
212. www.indexfungorum.com
213. www.ohio.edu/phylocode/
214. Xie, L., Zhang, J., Wan, Y., Hu, D. (2010): Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. *J. Zhejiang Univ Sci B.*, 11(1): 61-70. doi: 10.1631/jzus.B0900174.
215. Xie, L., Zhang, J., Wan, Y., Hu, D. (2010): Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. *J. Zhejiang Univ Sci B.*, 11(1): 61-70. doi: 10.1631/jzus.B0900174.
216. Yang, W., Clausen, A (2007): Antifungal effects of essential oils on southern yellow pine. *International Biodegradation and Biodeterioration*, 59, 302-306.
217. Yuan, W.M., Crawford, L.D. (1995): Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2): 3119-3128.
218. Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bianchi, A., Albasini, A. (1996): Effects of Essential Oils on Phytopathogenic Fungi *In Vitro*. *Journal of Phytopathology*, 144 (9-10): 491-494.
219. Zare, R., Gams, W., Starink-Willems, M., Summerbell, R.C. (2007): *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musciellium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia*, 85: 463-489.
220. Zhang, N., Blackwell, M. (2002): Molecular phylogeny of *Melanospora* and similar pyrenomycetous fungi. *Mycological Research*, 106: 148-155.
221. Zhang, N., Castlebury, L.A., Miller, A.N., Huhndorf, S.M., Schoch, C.L. (2006): An overview of the systematics of the *Sordariomycetes* based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98: 1076-1087.
222. Zhang, R., Wang, S., Cui, J., Sun, G. (2008): First Report of Bitter Rot Caused by *Colletotrichum acutatum* on Apple in China. *Plant Disease*, 92, 10.
223. Zhanyou C., Denver P., Zhiyou W., Craig F., Shulin C. (2007): A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation, *Process Biochemistry* 42, 1537-1545.

224. Živković, S. (2011): Uredna proučavanja izolata *Colletotrichum* spp. prouzrokovana antraknoze. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
225. Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Popović, T., Balaž, J. (2010): Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Archives of Biological Sciences, 62 (3): 611-623.
226. Zulfiqar, M., Bransky, H., Timmer, W. (1996): Infection of flower and vegetative tissue of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. Mycologia 88:121-128.

10. PRILOG

Tabela 51. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika nekroze (\pm Sd) 19 dana posle veštačke inokulacije plodova jabuke sa izolatima *Colletotrichum* spp.

Izolat	Srednje vrednosti prečnika nekroze (mm)
Č-31	36,25 \pm 0,96 a
BV-4	36,50 \pm 2,38 a
SB-1	37,75 \pm 22,54 ab
Č-13	38,25 \pm 0,5 ab
B-4	41,00 \pm 3,51 abc
TV-2	41,00 \pm 2,45 abc
TUT 137A	42,25 \pm 0,50 abcd
Č-30	43,25 \pm 1,50 bcde
I-7	46,25 \pm 0,50 cdef
R-2	47,50 \pm 1,00 defg
BV-6	47,75 \pm 1,5 defg
R-1	48,00 \pm 0,82 defg
K-4	48,25 \pm 2,63 defg
AVO 374B	49,25 \pm 0,96 efgh
LP-9	49,50 \pm 0,58 efghi
Č-3	49,75 \pm 0,50 efghi
MI-23	50,25 \pm 0,96 fghij
Č-2	50,75 \pm 0,96 fghij
MI-21	50,75 \pm 0,50 fghij
BV-11	51,50 \pm 0,58 fghijk
TV-5	51,75 \pm 0,50 fghijk
LP-8	52,50 \pm 0,58 fghijk
SB-12	52,50 \pm 2,38 fghijk
UN-11	53,25 \pm 0,50 ghijk
B-7	54,25 \pm 1,50 ghijkl
MR-1	55,50 \pm 2,38 hijkl
UZ-107	55,75 \pm 0,50 hijkl
KU-14	56,00 \pm 0,00 hijkl
Š-1	56,25 \pm 0,50 ijkl
MR-317	56,25 \pm 2,06 ijkl
HA-3	56,75 \pm 0,96 jkl
ME-7	56,75 \pm 0,50 jkl
KU-1	57,75 \pm 0,50 kl
MR-10	58,25 \pm 2,06 kl
Č-14	60,75 \pm 0,50 l

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) –standardna devijacija

Tabela 52. Dankanov test: srednje vrednosti dubine nekroze (\pm Sd) posle 19 dana od veštačke inokulacije plodova jabuke sa izolatima *Colletotrichum* spp.

Izolat	Srednje vrednosti prečnika nekroze (mm)
TUT 137A	14,00 \pm 0,00 a
Č-31	15,00 \pm 0,00 b
B-4	15,25 \pm 0,50 b
K-4	16,25 \pm 0,50 c
LP-9	18,75 \pm 0,50 d
Č-30	19,00 \pm 0,00 de
MI-23	19,00 \pm 0,00 de
Č-3	19,50 \pm 1,00 ef
Č-13	20,00 \pm 0,00 fg
BV-11	20,25 \pm 0,50 g
BV-6	21,25 \pm 0,50 h
I-7	23,00 \pm 0,00 i
AVO 374B	23,50 \pm 1,00 ij
Č-2	24,00 \pm 0,00 j
MR-10	24,75 \pm 0,50 k
B-7	25,00 \pm 0,00 k
HA-3	25,00 \pm 0,00 k
KU-1	25,00 \pm 0,00 k
TV-2	25,00 \pm 0,00 k
UZ-107	26,00 \pm 0,00 l
LP-8	26,00 \pm 0,00 l
SB-12	26,00 \pm 0,00 l
UN-11	26,00 \pm 0,00 l
TV-5	27,00 \pm 0,00 m
BV-4	27,25 \pm 0,5 mn
Š-1	27,75 \pm 0,50 no
R-2	28,00 \pm 0,00 o
MI-21	29,00 \pm 0,00 p
MR-317	29,00 \pm 0,00 p
R-1	29,25 \pm 0,50 pq
Č-14	29,75 \pm 0,96 qr
SB-1	30,00 \pm 0,00 r
KU-14	32,00 \pm 0,00 s
MR-1	34,75 \pm 0,50 t
ME-7	36,00 \pm 0,00 u

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (\pm Sd) –standardna devijacija

Tabela 53. Dankanov test: srednje vrednosti prečnika kolonije ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. (mm) posle četiri dana inkubacije na različitim hranljivim podlogama

Podloga	Izolat	Morfološka grupa	Prečnik kolonije (mm)
SDA	I-7	I	24,00 ^a
	UZ-107		24,00 ^a
	MI-21		24,33 ^a
	MR-317		24,33 ^a
	MI-23		24,67 ^a
	ME-7		25,00 ^a
	R-1		25,00 ^a
	R-2		25,00 ^a
	SB-12		25,00 ^a
	TV-5		25,00 ^a
	UN-11		25,33 ^{ac}
	KU-1		25,33 ^a
	B-7		28,33 ^{defgh}
	HA-3		28,67 ^{efghi}
	LP-8		28,67 ^{efghi}
	KU-14		29,33 ^{ghijk}
	TUT 137A		29,67 ^{hijkl}
	Š-1		30,00 ^{ijklm}
	B-4		30,67 ^{klmno}
	BV-6		30,67 ^{klmno}
	LP-9		31,33 ^{mnpq}
	K-4		31,33 ^{mnpq}
	Č-30		31,33 ^{mnpq}
	Č-13		31,33 ^{mnpq}
	Č-31		31,33 ^{mnpq}
	Č-14		31,67 ^{nopqr}
	MR-10		31,33 ^{mnpq}
	BV-11		34,67 ^{uvwxy}
	Č-3		38,67 ^{žs}
	BV-4		50,67 ⁶⁷⁸⁹
SB-1	51,00 ⁷⁸⁹		
AVO374B	51,33 ⁸		
MR-1	51,33 ⁸⁹		
TV-2	51,67 ⁸		
Č-2	52,00 ⁸		

Nastavak tabele 53.

	I-7		28,67 ^{efghi}
	UZ-107		28,00 ^{bdefg}
	MI-21		29,67 ^{hijkl}
	MR-317		29,33 ^{ghijk}
	MI-23		29,00 ^{fghij}
	ME-7		28,67 ^{rfghi}
	R-1		29,67 ^{hijkl}
	R-2		29,33 ^{ghijk}
	SB-12		29,33 ^{ghijk}
	TV-5	I	29,67 ^{hijkl}
	UN-11		29,33 ^{ghijk}
	KU-1		29,67 ^{hijkl}
	B-7		30,00 ^{ijklm}
	HA-3		30,33 ^{klmno}
	LP-8		30,67 ^{klmno}
	KU-14		27,00 ^{bd}
	TUT 137A		26,67 ^b
KDA	Š-1		27,00 ^{bd}
	B-4		31,33 ^{mno}
	BV-6		32,33 ^{pqrst}
	LP-9		32,33 ^{pqrst}
	K-4	II	32,33 ^{pqrst}
	Č-30		32,33 ^{pqrst}
	Č-13		33,00 ^{rst}
	Č-31		33,00 ^{rst}
	Č-14		33,33 ^{stuv}
	MR-10		32,33 ^{pqrst}
	BV-11	III	31,33 ^{mno}
	Č-3		32,67 ^{qrst}
	BV-4		47,67 ⁵
	SB-1		47,33 ⁵
	AVO374B	IV	49,67 ⁶⁷
	MR-1		47,00 ⁵
	TV-2		50,00 ⁶⁷⁹
	Č-2		49,33 ⁶

Nastavak table 53.

	I-7		29,33 ^{ghijk}
	UZ-107		29,00 ^{fghij}
	MI-21		35,67 ^{yz}
	MR-317		29,33 ^{ghijk}
	MI-23		29,67 ^{hijkl}
	ME-7		29,67 ^{hijkl}
	R-1		35,00 ^{wyz}
	R-2		35,33 ^{yz}
	SB-12	I	33,00 ^{rst}
	TV-5		34,67 ^{uvwxy}
	UN-11		35,00 ^{wxyz}
	KU-1		33,67 ^{tuvx}
	B-7		32,00 ^{opqrs}
	HA-3		32,33 ^{pqrst}
	LP-8		32,67 ^{qrst}
	KU-14		35,3 ^{3yz}
	TUT 137A		36,00 ^{yz}
V8	Š-1		36,33 ^z
	B-4		39,67 ^{s1}
	BV-6		40,00 ¹
	LP-9		40,33 ¹
	K-4	II	40,67 ¹
	Č-30		40,33 ¹
	Č-13		40,33 ¹
	Č-31		40,67 ¹²
	Č-14		40,67 ¹²
	MR-10		40,33 ¹
	BV-11	III	38,00z ^ž
	Č-3		40,67 ¹
	BV-4		46,67 ⁵
	SB-1		47,33 ⁵
	AVO374B	IV	49,33 ⁶
	MR-1		46,67 ⁵
	TV-2		49,67 ⁶
	Č-2		49,33 ⁶

Nastavak tabele 53.

	I-7		27,00 ^{bd}
	UZ-107		26,67 ^b
	MI-21		28,67 ^{efghi}
	MR-317		26,67 ^{bc}
	MI-23		27,33 ^{bde}
	ME-7		27,33 ^{bde}
	R-1		29,00 ^{fghij}
	R-2		29,00 ^{fghij}
	SB-12	I	29,00 ^{fghij}
	TV-5		29,33 ^{ghijk}
	UN-11		29,33 ^{ghijk}
	KU-1		29,33 ^{ghijk}
	B-7		27,33 ^{bde}
	HA-3		27,67 ^{def}
	LP-8		27,33 ^{bde}
	KU-14		31,67 ^{nopqr}
MPA	TUT 137A		31,33 ^{mnoqp}
	Š-1		31,67 ^{nopqr}
	B-4		30,00 ^{ijklm}
	BV-6		31,00 ^{lmnop}
	LP-9		31,67 ^{nopqr}
	K-4	II	31,67 ^{nopqr}
	Č-30		31,33 ^{mnoqp}
	Č-13		31,33 ^{mnoqp}
	Č-31		31,33 ^{mnoqp}
	Č-14		31,67 ^{nopqr}
	MR-10		31,67 ^{nopqr}
	BV-11	III	32,67 ^{qrst}
	Č-3		32,00 ^{opqrs}
	BV-4		44,67 ⁴
	SB-1		44,33 ⁴
	AVO374B	IV	46,67 ⁵
	MR-1		44,67 ⁴
	TV-2		47,00 ⁵
	Č-2		42,00 ²³

Nastavak tabele 53.

	I-7		29,00 ^{fg hij}
	UZ-107		28,67 ^{efghi}
	MI-21		32,33 ^{pqrst}
	MR-317		29,00 ^{fg hij}
	MI-23		29,33 ^{ghijk}
	ME-7		29,00 ^{fg hij}
	R-1		31,67 ^{nopqr}
	R-2		32,00 ^{opqrs}
	SB-12	I	31,33 ^{mnopq}
	TV-5		32,00 ^{opqrs}
	UN-11		32,33 ^{pqrst}
	KU-1		30,67 ^{klmno}
	B-7		29,67 ^{hijkl}
	HA-3		30,00 ^{ijklm}
	LP-8		29,67 ^{hijkl}
	KU-14		33,33 ^{stv}
	TUT 137A		33,67 ^{tuvwx}
OA	Š-1		33,00 ^{rst}
	B-4		30,33 ^{ijklm}
	BV-6		30,33 ^{ijklm}
	LP-9		31,33 ^{mnopq}
	K-4	II	32,00 ^{opqrs}
	Č-30		31,00 ^{lmnop}
	Č-13		31,00 ^{lmnop}
	Č-31		31,67 ^{nopqr}
	Č-14		31,33 ^{mnopq}
	MR-10		31,33 ^{mnopq}
	BV-11	III	32,33 ^{pqrst}
	Č-3		31,33 ^{mnopq}
	BV-4		40,67 ¹
	SB-1		40,33 ¹
	AVO374B	IV	42,67 ³
	MR-1		40,00 ¹
	TV-2		43,00 ³
	Č-2		42,33 ³

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

Tabela 54. Dankanov test: uticaj trajanja kultivacije na produkciju antifungalnih metabolita *S. hygroscopicus* i temperaturnog tretiranja metabolita na inhibiciju rasta micelije izolata *Colletotrichum* spp.

Tretman	Trajanje kultivacije (dani)	Poluprečnik zone inhibicije (mm) ±Sd			
		Izolat HA-3 (<i>C. acutatum</i>)	Izolat MR-1 (<i>C. gloeosporioides</i>)		
Metaboliti	0	0,01±0,00	q	0,01±0,00	q
	1	1,67±0,52	p	5,00±1,26	n
	2	15,83±1,47	ijklm	17,00±0,89	g
	3	20,50±1,05 b		22,00±0,63a	
	4	20,83±0,75 b		22,33±0,52a	
	5	18,00±0,89 de		18,67±1,21 cd	
	6	17,00±0,63 fg		18,17±0,75 cde	
	7	16,00±0,63	ijkl	16,67±0,82	ghi
	8	15,50±0,55	klm	15,83±0,75	ijklm
	9	15,50±0,55	klm	16,00±0,00	ijkl
	10	15,33±0,52	lm	16,00±0,00	ijkl
Temperaturno tretirani metaboliti (100°C)	0	0,01±0,00	q	0,01±0,00	q
	1	1,67±0,52	p	2,50±0,55	o
	2	15,67±0,82	klm	16,83±1,47	gh
	3	20,33±0,82 b		21,67±0,52a	
	4	20,67±0,82 b		21,67±0,52a	
	5	18,17±0,75 cde		18,83±0,41 c	
	6	16,67±0,52	ghi	17,67±0,52	ef
	7	16,17±0,41	hijk	16,50±0,55	ghij
	8	15,17±0,41	m	15,83±0,75	ijklm
	9	15,50±0,55	klm	16,00±0,00	ijkl
	10	15,17±0,41	m	16,00±0,00	ijkl
Kontrola	Svi dani	0,01±0,00	q	0,01±0,00	q

*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (±Sd) –standardna devijacija